



HAL
open science

Caractérisation du rôle de la Nétrine-3 dans la progression du cancer bronchique à petites cellules

Maëva Hervieu

► **To cite this version:**

Maëva Hervieu. Caractérisation du rôle de la Nétrine-3 dans la progression du cancer bronchique à petites cellules. Biologie cellulaire. Université Claude Bernard - Lyon I, 2024. Français. NNT : 2024LYO10184 . tel-04903808

HAL Id: tel-04903808

<https://theses.hal.science/tel-04903808v1>

Submitted on 21 Jan 2025

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**

**Ecole Doctorale ED340
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire**

Discipline : Biologie Cellulaire et Moléculaire

Soutenue publiquement le 17/10/2024, par :
Maëva HERVIEU

**Caractérisation du rôle de la Nétrine-3
dans la progression du cancer
bronchique à petites cellules**

Devant le jury composé de :

SAINTIGNY Pierre	PU-PH, UCBL1, Lyon	Président
MORO-SIBILOT Denis	PU-PH, CHU Grenoble-Alpes, Grenoble	Rapporteur
NAWABI Homaira	Directrice de recherche, GIN, Grenoble	Rapporteuse
MOULIN Maryline	Enseignante-chercheuse, UPC, Paris	Examinatrice
ORTIZ-CUARAN Sandra	Chargée de projet translationnel, CRCL, Lyon	Examinatrice
GIBERT Benjamin	Chargé de recherche, CRCL, Lyon	Directeur de thèse
MEHLEN Patrick	Directeur de recherche, CRCL, Lyon	Invité

Résumé en français

Titre : Caractérisation du rôle de la Nétrine-3 dans la progression du cancer bronchique à petites cellules

Les protéines de la famille des Nétrines ont initialement été décrites pour leurs rôles majeurs dans le guidage axonal au cours du développement embryonnaire. De nombreuses études ont révélé que ces protéines seraient aussi impliquées dans divers processus physiologiques tels que la survie, la prolifération, la migration cellulaire mais également pathologiques comme la tumorigenèse. La Nétrine-1 est aujourd'hui une cible thérapeutique reconnue pour sa forte expression dans de nombreux cancers. Des essais cliniques de phase 1 et 2 sont en cours avec le NP137, un anticorps monoclonal humanisé et dirigé contre la Nétrine-1. De manière surprenante, la biologie des autres membres de la famille des Nétrines est encore mal comprise, probablement en raison d'un manque d'outils moléculaires. Ce projet de thèse a donc pour but de préciser le rôle du membre le plus proche de la Nétrine-1 chez l'homme, la Nétrine-3, qui fut décrite pour la première fois en 1999 comme facteur de guidage axonal. Nous avons démontré que cette protéine est exprimée dans le cancer bronchique à petites cellules (CBPC), contrairement aux autres sous-types de cette pathologie où elle n'est pas détectable, impliquant une vulnérabilité thérapeutique. Le CBPC est le plus meurtrier des cancers pulmonaires, avec une survie à 5 ans inférieure à 5%, et est associé à un taux élevé de métastases au moment du diagnostic. Depuis les années 1970, peu d'avancées thérapeutiques ont été réalisées et le traitement de référence reste la chimiothérapie. Nous avons pu mettre en évidence que l'expression de la Nétrine-3 est fortement corrélée à l'un des sous-types moléculaires de très mauvais pronostic du CBPC, caractérisé par l'expression d'un facteur de transcription neuronal appelé NEUROD1. De façon intéressante, les métastases distantes sont fortement enrichies en cellules de ce sous-type. La surexpression constitutive de la Nétrine-3 dans des lignées humaines de CBPC a permis de caractériser le premier mécanisme d'action de cette protéine. Nos résultats montrent qu'elle perturbe l'organisation de la matrice extracellulaire des cellules tumorales, modifiant ainsi leur ancrage, ce qui constitue probablement une étape clé lors de la dissémination métastatique et la progression de la maladie.

Mots clés : guidage axonal, cancer du poumon, matrice extracellulaire, progression tumorale, métastase

Summary in English

Title : Uncovering the role of Netrin-3 in the progression of small cell lung cancer

Netrin family proteins were initially described for their major roles in axon guidance during embryonic development. Numerous studies have since revealed that these proteins are involved in various physiological processes such as cell survival, proliferation, and migration, as well as in pathological conditions like tumorigenesis. Netrin-1 has emerged as a therapeutic target due to its elevated expression in a variety of cancers. Phase 1 and 2 clinical trials are currently exploring the efficacy of NP137, a humanized monoclonal antibody directed against Netrin-1. Surprisingly, the biology of other Netrin family members remains poorly understood, likely due to a lack of suitable molecular tools. This thesis project aims to investigate the role of Netrin-3, the closest human homolog of Netrin-1, which was first characterized in 1999 as a guidance cue. Our findings demonstrate that this protein is expressed in small cell lung cancer (SCLC), in contrast to other subtypes of the disease where it is not detectable, suggesting a potential therapeutic vulnerability. SCLC is the deadliest form of lung cancer, with a 5-year survival rate of less than 5% and a high incidence of metastases at diagnosis. Since the 1970s, there have been limited therapeutic advances, and chemotherapy remains the standard of care. We have demonstrated that the expression of Netrin-3 is strongly correlated with a very poor-prognosis molecular subtype of SCLC, defined by the expression of a neuronal transcription factor known as NEUROD1. Interestingly, distant metastases are significantly enriched in cells of this subtype. The constitutive overexpression of Netrin-3 in human SCLC cell lines enabled us to characterize the first mechanism of action for this protein. Our results indicate that Netrin-3 disrupts the organization of the extracellular matrix in tumor cells, thereby altering their anchorage and likely representing a critical step in both metastatic spread and disease progression.

Key words : axon guidance, lung cancer, extracellular matrix, tumor progression, metastasis

Laboratoire

Équipe “Gastroentérologie et Technologies pour la Santé”, sous la co-direction de Benjamin Gibert et Thomas Walter

CRCL - Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon

UMR INSERM 1052 – CNRS 5286

Université Claude Bernard Lyon 1

Centre Léon Bérard – Cheney B

28 rue Laennec, 69373 Lyon Cedex 08

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier les membres de mon jury, Dr Homaira Nawabi, Dr Maryline Moulin, Dr Sandra Ortiz-Cuaran, Pr Denis Moro-Sibilot et Pr Pierre Saintigny, de me faire l'honneur d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie plus particulièrement le Dr Homaira Nawabi et le Pr Denis Moro-Sibilot pour avoir généreusement accepté de consacrer leur temps à la lecture et à l'évaluation de mon manuscrit.

Je tiens également à remercier les membres de mon comité de suivi de thèse, Arnaud Augert et Sandra Ortiz-Cuaran, pour leurs conseils avisés et leur bienveillance. Votre soutien m'a permis de progresser dans mes recherches et d'enrichir ma réflexion à chaque étape.

Patrick, merci pour la confiance que tu m'as accordée et pour m'avoir si bien accueillie dans ton laboratoire pendant ces quatre années de thèse. Je te suis vraiment reconnaissante de m'avoir offert l'opportunité de découvrir la recherche dans un cadre aussi stimulant que le CRCL. Ces années passées dans ton équipe ont été très enrichissantes, et je garde d'excellents souvenirs des moments conviviaux que nous avons partagés, que ce soit lors des barbecues, des retraites d'équipe ou des symposiums. Ces moments ont grandement contribué à instaurer une atmosphère chaleureuse et à renforcer la cohésion au sein de l'équipe.

Benjamin, je tiens à te remercier pour ton accompagnement en tant que directeur de thèse tout au long de mon parcours. Merci de m'avoir fait découvrir le monde de la recherche, avec ses aspects passionnants et ses difficultés. Grâce à toi, j'ai eu l'opportunité de collaborer sur de nombreux projets, ce qui a rendu ces quatre années particulièrement enrichissantes. Je te suis également reconnaissante pour avoir toujours mis en place les ressources nécessaires pour nous permettre de mener des recherches de qualité. Comme quoi, on peut accomplir de belles choses même en venant d'une petite campagne bouronnaise...

Mathieu et Silvia, mes premiers collègues de laboratoire, je tiens à vous remercier pour tous les moments que nous avons partagés. J'ai énormément apprécié notre entraide et notre soutien mutuel. Mathieu, un merci tout particulier pour l'accueil chaleureux que tu nous as réservé à notre arrivée et pour nous avoir rapidement intégrées au sein de l'équipe.

Je remercie sincèrement l'ensemble de la team Mehlen pour ces quatre années formidables passées à vos côtés. Vous êtes des personnes très attachantes avec qui j'ai éprouvé énormément de plaisir à travailler. Nico, merci pour ton aide précieuse et ta gentillesse tout au long de ma thèse. Lisa, un grand merci à toi ma super collègue de bureau. Tu es une personne véritablement inspirante, tant par ta bienveillance que par ta résilience. Je te suis particulièrement reconnaissante pour ton aide, tes conseils et ton engagement au sein du laboratoire. Kristina, merci pour tous les moments passés en ta compagnie, en particulier nos cours de danse du soir qui nous ont permis de surmonter les désespoirs des mauvais résultats de la journée. Sonia, tu feras toujours partie de la team Mehlen, ne t'en fais pas ! Merci pour les éclats de rire et les « moments potins » qui ont égayé nos journées de travail. Nathalie, merci à toi aussi chère collègue de bureau. J'espère sincèrement que tu t'épanouiras dans tes projets futurs. Elisa, je tiens à te remercier chaleureusement pour ta gentillesse et pour les délicieux gâteaux et chocolats que tu as partagés avec nous. Merci également à la relève : Gaëtan et Lia. Je vous souhaite beaucoup de réussite dans vos projets de thèse.

Je tiens bien sûr aussi à remercier l'ensemble de l'équipe Gibert/Walter, une nouvelle équipe pleine d'avenir. Jacqueline, un immense merci pour tes précieux conseils et ta disponibilité, même lors de mes galères du dimanche à l'animalerie (« je ne trouve plus de bouteille d'isoflurane ! »). C'est un vrai plaisir de travailler à tes côtés. Marion, je suis très heureuse que tu aies finalement décidé de faire une thèse parmi nous. Merci encore pour ta contribution au projet lors de ton stage. Laura, même si nous n'avons pas souvent eu l'occasion de travailler ensemble, ta bonne humeur et ton humour m'ont profondément marquée. Marie H, merci infiniment pour tes petits mots doux et ta bienveillance. Je te souhaite beaucoup de réussite pour ton post-doc aux USA !! Marie C, merci pour ton aide et tes encouragements ; je suis ravie de pouvoir continuer à travailler avec toi et Jacqueline après la thèse.

Merci à Céline et Laurent pour la relecture attentive de mon manuscrit et pour avoir toujours été disponibles pour m'aider et répondre à mes questions tout au long de ma thèse.

Merci aux filles de Nétris Pharma, Amélie, Ruxanda et Nerea ; je vous souhaite beaucoup de réussite pour la suite. Une grosse pensée également pour Camille et Mélanie, merci pour votre sourire et votre soutien.

Un grand merci à mes anciens collègues de laboratoire, Anna-Rita, Verena, Thomas et Ambroise, pour tous les moments de rire et de convivialité que nous avons partagés ensemble. Anna-Rita, merci pour ton sourire contagieux et ton enthousiasme sans faille, même après de longues soirées passées à la cytométrie ou à l'animalerie. Verena, merci pour ta bonne humeur qui nous manque tant. Ambroise, merci pour ces moments de rire au laboratoire, lors des pauses café, ainsi que pour les sorties bronzettes et les sorties au marché avec Lisa et Valentin. Thomas, merci pour tes messages d'encouragement, tous les fous rires et les moments de « réflexion sur la vie » dans le bureau des doctorants. Je réalise la chance immense que j'ai eue de travailler avec vous tous.

Je remercie également Hugo Clermidy, chirurgien thoracique, pour m'avoir donné l'opportunité d'assister à une biopsie pleurale au bloc opératoire du service d'oncologie thoracique de l'Hôpital Louis Pradel à Bron.

Merci à la team Kairos : Céline, Léna et David. J'ai beaucoup apprécié les moments passés en votre compagnie et je suis certaine que nous continuerons à nous croiser de temps en temps.

Merci à Jean-Guy, David G, David K, Cyril et Gabriel pour votre contribution à ce projet de thèse. Ce fut un réel plaisir de travailler avec vous. Un grand merci également à Marie et Léa pour avoir accepté de collaborer dans le cadre de l'étude CTC du poumon.

Un grand merci à Claire, Sarah, Céline, Cécile, Cathy et Quynh pour votre écoute et votre disponibilité qui ont grandement contribué à la réussite de mon travail. Claire, un merci particulier pour veiller constamment à notre bien-être.

À mes amis proches Sibylle, Manon F, Julia, Manon R, Juliette, Floriane, Roxane, Margot, Angélique et Tanguy. Vous avez été présents à chaque étape de ce parcours, toujours prêts à m'encourager ou à me remonter le moral lorsque j'en avais besoin. Je suis vraiment reconnaissante de vous avoir à mes côtés.

Je vais finir en remerciant du fond du cœur ma famille, et tout particulièrement mes parents, qui ont toujours cru en moi tout au long de ces années. Merci pour votre amour inconditionnel et pour m'avoir transmis la force de persévérer, même dans les moments les plus difficiles. À Hugo, mon petit frère, si on m'avait dit plus tôt que nous finirions nos études la même année...

Merci d'être toujours là pour moi, je suis très fière de toi. J'en profite aussi pour remercier ma belle-famille pour leur gentillesse et leur soutien.

Cette thèse ne m'a pas seulement permis d'acquérir des connaissances scientifiques, elle m'a également offert la plus belle des rencontres : celle de mon compagnon, Erivan. Merci pour ton amour, ta compréhension et tes mots réconfortants, qui ont toujours su apaiser mes moments de doute. Je te remercie aussi de m'avoir aidée à développer ma confiance en moi et pour tes talents de cuisinier, qui ont grandement nourri mon esprit pendant cette thèse. Je suis extrêmement reconnaissante de partager ma vie avec une personne aussi formidable que toi.

*Je dédie cette thèse à mon tonton Yves,
et à mon grand-père Émile.*

Table des matières

Résumé en français	1
Summary in English	2
Laboratoire	3
Remerciements	4
Table des matières	9
Table des abréviations	12
Table des illustrations	18
Liste des figures	19
Liste des tableaux	20
Introduction	21
Chapitre I. Le Cancer Bronchique à Petites Cellules (CBPC)	21
I. Anatomie et physiologie du poumon	21
II. Épidémiologie et facteurs de risque	22
1. Épidémiologie	22
2. Facteurs de risque	23
III. Classification des cancers broncho-pulmonaires	24
1. La classification de l'OMS	24
2. La classification TNM et grade tumoral	27
IV. Biologie et physiopathologie des cellules neuroendocrines pulmonaires (PNEC)	30
1. Définition et fonctions biologiques	30
2. Origine embryologique	32
3. Pathologies respiratoires	34
V. Le sous-type des cancers bronchiques à petites cellules	35
1. Caractéristiques de la tumorigenèse et variations génétiques	35
2. Classification neuroendocrine	39
3. Classification moléculaire	40
4. Hétérogénéité et plasticité tumorale	44
5. Facteurs et trajectoires des métastases	46
VI. Diagnostic	48
VII. Prise en charge thérapeutique	52
1. Chirurgie	52
2. Chimiothérapies et radiothérapies	54
3. Immunothérapies	56
4. La résistance thérapeutique dans le CBPC	58
5. Essais cliniques et directions futures	59
Chapitre II. La Nétrine-3 comme nouvelle cible thérapeutique contre le cancer	64
I. La famille des Nétrines	64
1. Découverte et évolution	64
2. Caractéristiques structurales des Nétrines	65
3. Les récepteurs de la Nétrine-1	67
3.1. Identification et définition du concept de récepteur à dépendance	67
3.2. Les membres actuels de la famille des récepteurs à dépendance	69

3.3.	Les principaux récepteurs à la Nétrine-1	70
3.3.1	DCC	71
3.3.2	Néogénine	72
3.3.3	La famille des récepteurs UNC	73
3.4.	Les autres récepteurs de la Nétrine-1	75
3.4.1	DSCAM	75
3.4.2	Les intégrines $\alpha 6\beta 4$ et $\alpha 3\beta 1$	76
3.4.3	MCAM (CD146)	76
3.4.4	APP	77
3.4.5	A2b	77
4.	Fonctions des Nétrines au cours du développement embryonnaire et chez l'adulte	78
4.1.	La Nétrine-1	78
4.2.	La Nétrine-4	79
4.3.	La Nétrine-5	81
4.4.	Les Nétrines-G1 et -G2	81
II.	La Nétrine-3, une protéine de guidage axonal au cours du développement embryonnaire	82
1.	Identification et localisation chromosomique	82
2.	Profil d'expression	83
3.	Affinité de la Nétrine-3 avec les récepteurs à dépendance	86
4.	Propriétés fonctionnelles de la Nétrine-3 au cours du développement embryonnaire	87
III.	La Nétrine-3, une cible thérapeutique potentielle	87
1.	La Nétrine-3 comme suppresseur de douleur neuropathique diabétique (DNP)	87
2.	La Nétrine-3 comme indicateur pronostique et cible thérapeutique chez certains cancers	88
Chapitre III. La dissémination métastatique, une étape clé dans la progression du cancer		94
I.	Généralités sur le processus métastatique	94
II.	Implication de la Matrice Extracellulaire	95
1.	Propriétés et caractéristiques	95
2.	Composition	97
2.1.	Les collagènes	98
2.2.	Les glycoprotéines	99
2.3.	Les protéoglycanes	100
3.	Les protéines de l'adhésion cellulaire à la matrice	100
3.1.	Le complexe cellulaire d'adhésion à la matrice (CMAC)	101
3.2.	Les récepteurs cellulaires à la matrice	102
3.3.	Les molécules associées au récepteur	104
3.3.1	Les protéines de liaison au cytosquelette	104
3.3.2	Les protéines à l'origine de l'initiation des voies de signalisation intracellulaires	105
4.	Altérations de la MEC au cours du processus de dissémination métastatique	106
III.	Implication de la voie de signalisation intracellulaire Focal Adhesion Kinase (FAK)	108
1.	Caractéristiques de FAK	108
1.1.	Généralités	108
1.2.	Gène de FAK	108
1.3.	Structure de FAK	108
2.	Activation de FAK	109
3.	Signalisation et fonctions induites par FAK	110
3.1.	Au cours du développement	110
3.2.	Dans les jonctions d'adhérence inter-cellulaires	111
3.3.	Dans le noyau	111
3.4.	Dans les endosomes	112
4.	Rôles de FAK dans les cancers	112
4.1.	Migration et invasion	113
4.2.	Survie et prolifération	114

5. Ciblage thérapeutique de FAK	114
Objectifs du projet de recherche	116
Résultats	118
Discussion et perspectives	156
I. Difficultés rencontrées et limites de l'étude	157
II. Découvertes, interrogations et directions futures	162
III. Perspectives diagnostiques et thérapeutiques	169
Bibliographie	172
Annexes	214
Annexe 1 : "Targeting netrin-3 in small cell lung cancer and neuroblastoma"	214
Annexe 2 : "Netrin signaling mediates survival of dormant epithelial ovarian cancer cells"	215
Annexe 3 : "From netrin-1-targeted SPECT/CT to internal radiotherapy for management of advanced solid tumors"	218
Annexe 4 : "Comprehensive molecular portrait reveals genetic diversity and distinct molecular subtypes of small intestinal neuroendocrine tumors"	221
Annexe 5 : "Netrin-1 blockade inhibits tumor associated Myeloid-derived suppressor cells, cancer stemness and alleviates resistance to chemotherapy and immune checkpoint inhibitor"	223
Annexe 6 : "Hepatic inflammation elicits production of proinflammatory netrin-1 through exclusive activation of translation"	226

Table des abréviations

5-HT : sérotonine

¹¹¹In : Indium-111

¹³¹I : Iode-131

¹⁷⁷Lu : Lutecium-177

²¹³Bi : Bismuth-213

²²³Ra : Radium-223

²²⁵Ac : Actinium-225

⁹⁰Y : Yttrium-90

ADAM : une désintégrine et métalloprotéase

ADAMTS : une désintégrine et métalloprotéase avec motif thrombospondine

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

AJCC : American Joint Committee on Cancer

ALK : anaplastic lymphoma kinase

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

APC : cellule présentatrice d'antigène

APP : protéine précurseur de l'amyloïde

APUD : amine precursor uptake and decarboxylation

ARNm : ARN messenger

ASCL1 : Achaete-scute complex-like 1

AURKA : Aurora kinase A

AURKB : Aurora kinase B

A2b : récepteur adénosine

Bax : Bcl-2-associated X

BLI : interférométrie de bio-couche

BPCO : bronchopneumopathie chronique obstructive

BPD : dysplasie bronchopulmonaire

CAF : fibroblaste associé au cancer

CAM : membrane chlorioallantoïdienne

CAR-T : chimeric antigen-receptor T cell
CBNPC : cancer bronchique non à petites cellules
CBPC : cancer bronchique à petites cellules
CBPC-A : sous-type ASCL1 du cancer bronchique à petites cellules
CBPC-N : sous-type NEUROD1 du cancer bronchique à petites cellules
CBPC-P : sous-type POU2F3 du cancer bronchique à petites cellules
CBPC-Y : sous-type YAP1 du cancer bronchique à petites cellules
CDH : hernie diaphragmatique congénitale
CDH1 : cadhérine-1 ou cadhérine-E
CDON : cell-adhesion associated, oncogene regulated
CHC : carcinome hépatocellulaire
CHGA : chromogranine A
CHIP-seq : immunoprécipitation de la chromatine suivie d'un séquençage
chNTN2 : chicken-NTN2
CK5 : cytokératine 5
CK6 : cytokératine 6
CMAC : complexe d'adhésion cellule-matrice
CMH-I : complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
CO₂ : dioxyde de carbone
Cq : cycle seuil
CREBBP : CREB binding protein
CSC : cellule souche cancéreuse
CTC : cellule tumorale circulante
CTLA-4 : antigène 4 du lymphocyte-T cytotoxique

DCC : deleted in colorectal cancer
DD : domaine de mort
DDR1 : discoïdin domain receptor 1
DDR2 : discoïdin domain receptor 2
DNP : douleur neuropathique diabétique
DSCAM : Down syndrome cell adhesion molecule
DRG : ganglion spinal dorsal

E : jour embryonnaire

EEC : cellule entéroendocrine
EGF : facteur de croissance épidermique
EGFR : récepteur du facteur de croissance épidermique
EMT : transition épithélio-mésenchymateuse
Eph4A : ephrin type A receptor 4
ERM : ezrine radixine moésine

FAK : focal adhesion kinase
FAT : focal adhesion targeting
FDA : Food and Drug Administration
FDG : fluorodésoxyglucose
FFPE : formalin-fixed, paraffin-embedded
FN1 : fibronectine

GAG : glycosaminoglycane
GEMM : modèle de souris génétiquement modifié
GPC-3 : glypican-3
GPCR : récepteur couplé à une protéine G
GPI : glycosylphosphatidylinositol
GRD : ganglion de la racine dorsale
GSEA : gene set enrichment analysis

H&E : hématoxyline-éosine
H3K27ac : acétylation de la lysine 27 de l'histone H3
H3K4me1 : monométhylation de la lysine 4 de l'histone H3
Hes1 : hairy and enhancer of Split 1
HGSOC : cancer ovarien séreux de haut grade

IARC : International Agency for Research on Cancer
ICP : irradiation crânienne prophylactique
Ig : immunoglobuline
IHC : immunohistochimie
INCa : Institut National du Cancer
INSM1 : protéine associée à l'insulinome 1

INSS : International Neuroblastoma Staging System

IPCI : inhibiteur de point de contrôle immunitaire

IRM : imagerie par résonance magnétique

JA : jonction adhérente

JNK : c-Jun N-terminal kinase

KMT2D : lysine-méthyltransférase 2D

KO : knock-out

LCNEC : carcinome neuroendocrine à grandes cellules

LEMS : syndrome myasthénique de Lambert-Eaton

LOX : lysyl-oxidase

MB : membrane basale

MCAM : molécule d'adhésion cellulaire du mélanome

Mdm-2 : mouse double-minute-2

MEC : matrice extracellulaire

MET : MNNG HOS transforming gene

MHC : maladie hépatique chronique

MMP : métalloprotéase matricielle

m-TOR : mammalian target of rapamycin

n-AChR alpha-7 : nicotinic acetylcholine receptor alpha-7

NB : neuroblastome

NCAM : neuronal cell adhesion molecule

NCCN : National Comprehensive Cancer Network

NE : neuroendocrine

NEB : corps neuroépithélial

NEHI : neuroendocrine hyperplasia of infancy

NEO : néogénine

NF-κB : nuclear factor-kappa B

NICD : domaine intracellulaire de Notch

NTN1 : Nétrine-1

NTN2 : Nétrine-2
NTN2L : Nétrine-2-like
NTN3 : Nétrine-3
NEUROD1 : neuronal differentiation 1
NGL-1 : ligand 1 de la Nétrine-G1
NGL-2 : ligand 2 de la Nétrine-G1
NK : natural killer
NNCP : National Comprehensive Cancer Network
NNK : nicotine-derived nitrosamine ketone
NTR : Netrin-like domain

O₂ : dioxygène
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
ORR : objective response rate
OS : survie globale

p75^{NTR} : récepteur à la neurotrophine p75
PAX : paxilline
PD-1 : programmed death-1
PDAC : adénocarcinome canalaire pancréatique
PD-L1 : programmed death-ligand 1
PFS : survie sans progression
PIK3CA : phosphatidylinositol-4,5-biphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha
PKC : protéine kinase C
PMN-MDSC : polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cell
PNEC : cellule neuroendocrine pulmonaire
PTC-1 : Patched-1
PTEN : phosphatase and tensin homolog
PTK2 : protein tyrosine kinase 2
POU3F3 : POU domain 2 homolog 3
PPR : région riche en proline
PYK2 : proline-rich tyrosine kinase 2
RAS : rat sarcoma

RE : réticulum endoplasmique
RET : rearranged during transfection
RGD : arginine-glycine-acide aspartique
RIV : radiothérapie interne vectorisée
ROVA-T : Rovalpituzumab Tesirine
RT-qPCR : réaction de polymérisation en chaîne quantitative après rétrotranscription

SCLC : small cell lung cancer
scRNAseq : séquençage d'ARN de cellules uniques
SEMA3E : sémaphorine 3E
SHH : récepteur au morphogène Sonic HedgeHog
SIADH : syndrome de sécrétion inappropriée d'hormone antidiurétique
siNET : tumeur neuroendocrine de l'intestin grêle
siRNA : small interfering RNA
SLFN11 : Schlaffen11
SNC : système nerveux central
SNP : syndrome paranéoplasique
SNP* : système nerveux périphérique
SPECT/CT : tomographie par émission de photons uniques couplée à un scanner
SQ : carcinome épidermoïde ou carcinome squameux
STAU1 : staufer-1
SYP : synaptophysine

TCGA : The Cancer Genome Atlas
TDM : tomodensitométrie
TEM : microenvironnement tumoral
TEP : tomographie par émission de positrons
TF : facteur de transcription
TIC : cellule initiatrice de tumeur
TK : tyrosine kinase
TLR : récepteur toll-like
TrKA : tropomyosin receptor kinase A
TrKC : tropomyosin receptor kinase C

Unc-5 : Uncoordinated-5

Unc-6 : Uncoordinated-6

UICC : Union Internationale Contre le Cancer

UPA : Unc5-Pidd-Ankyrins

UTR : région non traduite

VALSG : Veterans Administration Lung Study Group

VCL : vinculine

VEGF : facteur de croissance de l'endothélium

VS-6063 : Avutometinib

VS-6266 : Defactinib

WGS : séquençage de génome complet

Y397 : tyrosine 397

Y576/577 : tyrosine 576/577

Y925 : tyrosine 925

YAP1 : Yes-associated protein 1

ZU-5 : Zona Occludens-1/Unc5 homology domain

Table des illustrations

Liste des figures

Figure 1 : Anatomie du poumon

Figure 2 : Histopathologie des CBPC

Figure 3 : Classification des CBPC selon le VALSG

Figure 4 : Représentation schématique de l'organisation des cellules neuroendocrines pulmonaires et des corps neuroépithéliaux au sein de l'épithélium respiratoire

Figure 5 : Détermination du destin cellulaire des progéniteurs épithéliaux respiratoires par la régulation de l'interaction entre Notch/Hes1 et ASCL1

Figure 6 : Hyperplasie des PNEC et maladies respiratoires

Figure 7 : Origines cellulaires et altérations génomiques dans le cancer bronchique à petite cellule

Figure 8 : Tumorigenèse du CBPC

Figure 9 : Phénotype « classique » et « variant » du CBPC selon Adi F. Gazdar en 1985

Figure 10 : Classification hiérarchique des sous-types de CBPC en fonction de l'expression relative de quatre facteurs de transcription clés

Figure 11 : Classification actuelle des CBPC

Figure 12 : Méthodes utilisées pour le diagnostic et la stratification du CBPC

Figure 13 : Stratégies thérapeutiques privilégiées pour le CBPC selon le stade de la maladie

Figure 14 : Domaines d'intérêt thérapeutique actuels dans le CBPC

Figure 15 : Arbre phylogénétique illustrant la relation entre les membres de la famille des Nétrines et des laminines chez l'homme

Figure 16 : Organisation structurale des Nétrines

Figure 17 : Concept des récepteurs à dépendance

Figure 18 : Les membres actuels de la famille des récepteurs à dépendance

Figure 19 : Les récepteurs de la Nétrine-1

Figure 20 : Expression comparative de la Nétrine-1 murine, de la Nétrine-3 murine, de la Nétrine-1 de poulet et de la Nétrine-2 de poulet dans la moelle épinière embryonnaire par hybridation *in situ*

Figure 21 : Expression de la Nétrine-3 et de la Nétrine-1 à différents stades du développement chez l'embryon de souris

Figure 22 : Expression de la Nétrine-3 murine dans la région de la tête de l'embryon de souris aux stades E9.5, E10.5, E11.5 et E12.5

Figure 23 : Influence de la MEC sur les caractéristiques fondamentales du cancer

Figure 24 : La famille des intégrines

Figure 25 : Synthèse et activation « outside-in » des intégrines

Figure 26 : Représentation schématique d'une adhésion focale en maturation

Figure 27 : Structure de FAK

Figure 28 : Schéma hypothétique de la signalisation de la Nétrine-3 dans le CBPC

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification histologique des néoplasies neuroendocrines pulmonaires selon l'OMS en 2021

Tableau 2 : Classification TNM des cancers broncho-pulmonaires

Tableau 3 : Stadification selon la 8^{ème} classification TNM des cancers broncho-pulmonaires

Tableau 4 : Gènes principalement altérés dans le CBPC

Tableau 5 : Essais cliniques évaluant la sécurité et l'efficacité des inhibiteurs de points de contrôle immunitaire chez les patients atteints de CBPC

Tableau 6 : Essais cliniques antérieurs et en cours évaluant la sécurité et l'efficacité des thérapies ciblées chez les patients atteints de CBPC

Tableau 7 : Classification des neuroblastomes selon l'INSS

Tableau 8 : Essais cliniques en cours évaluant des combinaisons avec des inhibiteurs de FAK

Introduction

Chapitre I. Le Cancer Bronchique à Petites Cellules (CBPC)

Le cancer bronchique à petites cellules est une tumeur rare, marquée par une croissance extrêmement rapide et associée à un pronostic très défavorable. En raison de sa mortalité élevée, la gestion de cette maladie représente une urgence thérapeutique.

I. Anatomie et physiologie du poumon

Le poumon est un organe vital du système respiratoire, situé dans la cavité thoracique. Il se compose de plusieurs structures anatomiques essentielles qui permettent la respiration et les échanges gazeux nécessaires au bon fonctionnement du corps humain. Le poumon droit, légèrement plus grand que le poumon gauche, est divisé en trois lobes (supérieur, moyen et inférieur), tandis que le poumon gauche n'en compte que deux (supérieur et inférieur). Les poumons sont séparés par le médiastin, une zone qui contient le cœur, des vaisseaux sanguins majeurs tels que l'aorte, la trachée, l'œsophage et de nombreux ganglions lymphatiques. Ils sont recouverts d'une membrane protectrice solide appelée plèvre et sont séparés de la cavité abdominale par le diaphragme musculaire. La trachée joue le rôle de voie respiratoire principale, assurant le transport de l'air vers et depuis les poumons. À son extrémité distale, la trachée se divise en deux bronches principales, pénétrant chacune dans un poumon au niveau du hile. Ces bronches se ramifient ensuite en bronches lobaires, une pour chaque lobe. Les lobes sont constitués de plus petites entités appelées lobules pulmonaires, qui représentent les unités fonctionnelles fondamentales des poumons. Chaque lobule pulmonaire est traversé par une bronchiole qui, par des divisions successives, engendre les bronchioles terminales responsables de la ventilation des alvéoles. Ces alvéoles, d'une surface totale d'environ 90 m², sont entourées de petits vaisseaux sanguins appelés capillaires et forment ensemble la barrière alvéolo-capillaire indispensable pour les échanges gazeux (**Figure 1**). Leur paroi est extrêmement fine, constituée d'une seule couche de cellules épithéliales, ce qui facilite la diffusion rapide des gaz. À chaque inspiration, le dioxygène (O₂) traverse les parois des alvéoles pour être capté par les globules rouges dans les capillaires. Lorsque les globules rouges délivrent l'oxygène dans les

organes du corps, ils capturent simultanément le dioxyde de carbone (CO_2), un sous-produit métabolique. Ce CO_2 est ensuite transporté vers les poumons où il est libéré dans les alvéoles puis expulsé par le nez ou la bouche lors de l'expiration.

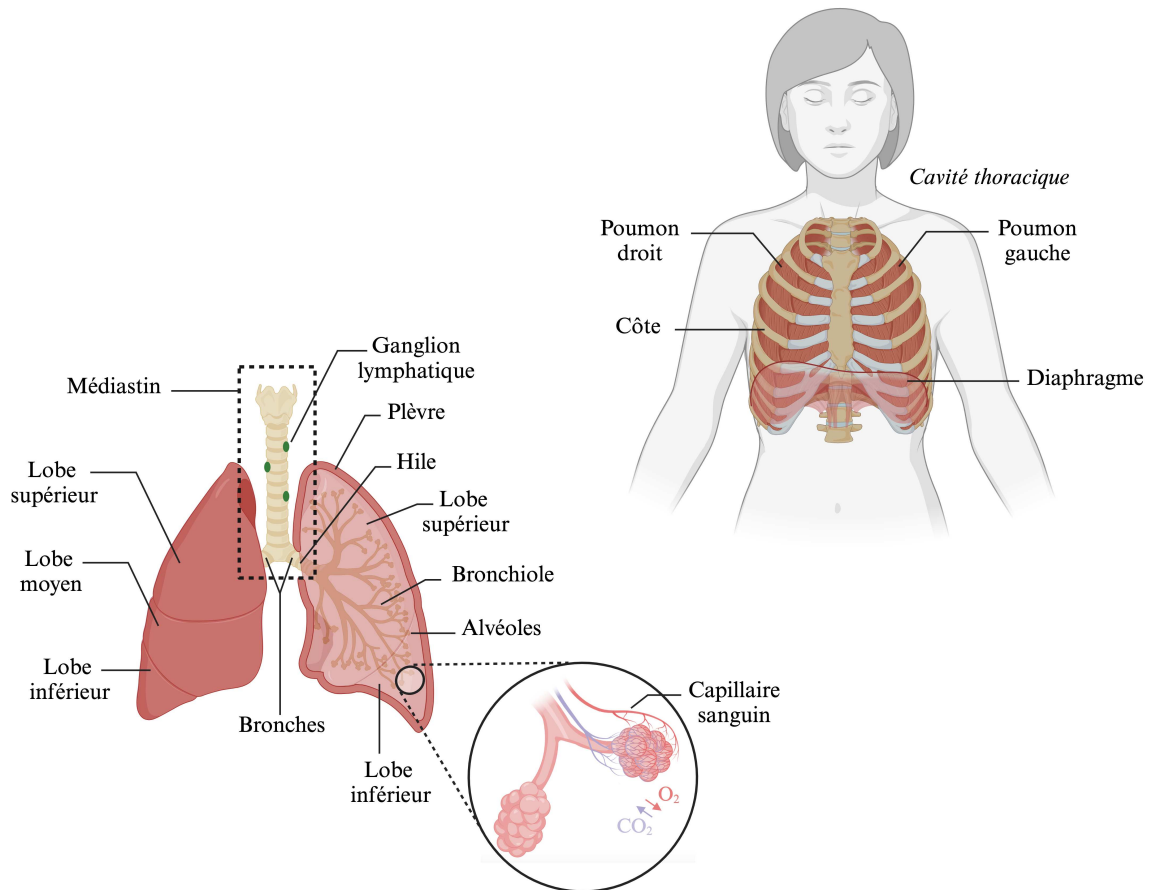


Figure 1 : Anatomie du poumon (adaptée d'Aung et al., 2019).

II. Épidémiologie et facteurs de risque

1. Épidémiologie

Le cancer du poumon constitue une préoccupation majeure de santé publique, entraînant un nombre considérable de décès à l'échelle mondiale. Les données de GLOBOCAN 2022, réunies par l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (IARC), indiquent que le cancer du poumon est la principale cause de décès liés au cancer avec environ 1,8 million de morts (16,8%) estimés en 2022 dans le monde, soit plus que les cancers du sein, du côlon et de la

prostate réunis. Il est également le cancer le plus répandu au monde, avec plus de 2,4 millions de cas diagnostiqués en 2022.

Le cancer bronchique à petites cellules représente environ 13 à 15% des cancers du poumon et demeure le sous-type le plus létal, avec un taux de survie à 5 ans de seulement 7% tous sexes confondus (Gazdar et al., 2017). Il est responsable de près de 250 000 nouveaux cas et d'au moins 200 000 décès chaque année à l'échelle mondiale (IARC). En France, l'Institut National du Cancer (INCa) a estimé à 5007 le nombre de nouveaux cas de CBPC en 2018, dont 3363 chez les hommes et 1644 chez les femmes. L'incidence de ce cancer est légèrement plus élevée chez les hommes que chez les femmes, bien que l'écart entre les sexes se soit réduit au cours des trois dernières décennies, reflétant un changement dans l'exposition aux facteurs de risque, notamment le tabagisme (Ragavan & Patel, 2022). Le taux de mortalité en excès est particulièrement élevé durant la première année suivant le diagnostic, soulignant son agressivité. En effet, la probabilité de décès dans le mois suivant le diagnostic était de 15,7% chez les personnes de 60 ans et atteint 33,6% chez les personnes de 80 ans, selon une étude réalisée sur des patients suivis entre 1989 et 2018. Cette même étude rapporte que l'âge médian au moment du diagnostic est de 67 ans chez les hommes et de 64 ans chez les femmes.

Grâce aux politiques de santé publique visant à réduire l'exposition au tabac, le taux d'incidence du cancer bronchique à petites cellules a diminué en moyenne de 0,9% par an en France entre 1990 et 2018, selon Santé Publique France. Cependant, il est important de noter que la survie globale des patients reste notoirement faible (Wang et al., 2017).

2. Facteurs de risque

L'apparition du cancer bronchique à petites cellules est étroitement liée à une exposition excessive au tabac, plus de 94% des patients atteints ayant fumé au cours de leur vie (Siegel et al., 2021). Comparativement aux autres sous-types de cancers pulmonaires, les patients souffrant de CBPC présentent une consommation de tabac plus élevée (>30 cigarettes par jour) ainsi qu'une durée d'exposition plus longue (≥ 40 ans) (Khuder, 2001). L'exposition des cellules pulmonaires aux agents carcinogènes génotoxiques présents dans la fumée de cigarette, tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les N-nitrosamines et les amines aromatiques, a des effets dévastateurs sur l'acide désoxyribonucléique (ADN), entraînant des mutations dans

des gènes essentiels au contrôle de la croissance cellulaire (Hecht, 2012). Il est intéressant de noter que seulement 2% des cas de CBPC surviennent chez des non-fumeurs, définis comme ayant consommé moins de 100 cigarettes au cours de leur vie (Torres-Durán et al., 2021). En plus de ces rares cas de CBPC *de novo*, certains cas de CBPC chez les non-fumeurs peuvent résulter d'une transformation histologique d'un adénocarcinome pulmonaire caractérisé par des mutations dans le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) ou dans la kinase de lymphome anaplasique (ALK) en CBPC (Quintanal-Villalonga et al., 2020). L'exposition aux radiations provenant du sol (radon) et la pollution de l'air sont très probablement les deuxième et troisième facteurs de risque les plus importants pour le CBPC dans le monde et le principal facteur de risque pour les non-fumeurs (Torres-Durán et al., 2021). En effet, la désintégration du radon, un gaz radioactif, émet des radiations alpha, qui endommagent les cellules de la muqueuse pulmonaire et provoquent des mutations (Rodríguez-Martínez et al., 2018). Les polluants atmosphériques, tels que le dioxyde de carbone et les particules fines de diamètre aérodynamique <10 µm, ont des effets carcinogènes directs, notamment dans le CBPC et les cancers du poumon à cellules squameuses (Hystad et al., 2013). Parmi les comorbidités respiratoires, la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) constitue également un facteur de risque indépendant pour le développement du CBPC (Huang et al., 2015).

III. Classification des cancers broncho-pulmonaires

Actuellement, deux systèmes formels sont utilisés pour caractériser les cancers bronchiques :

- Organisation Mondiale de la Santé (OMS)
- Union Internationale Contre le Cancer (UICC)

Après le diagnostic, ces systèmes de classification permettent d'anticiper l'évolution de la maladie et de définir la stratégie thérapeutique la plus adaptée.

1. La classification de l'OMS

La classification histologique selon l'OMS est un système utilisé pour classer les différents types de cancer en fonction de leurs caractéristiques histologiques, reposant sur l'observation

de caractéristiques morphologiques et sur l'utilisation de critères immunohistochimiques (IHC). Selon l'OMS, deux principales catégories de cancers bronchiques se distinguent :

- Les **Cancers Bronchiques Non à Petites Cellules (CBNPC)**, qui comprennent principalement les adénocarcinomes, les carcinomes épidermoïdes et les carcinomes peu différenciés, tels que le carcinome à grandes cellules. Ils représentent environ 80 à 85% des cas cliniques.
- Les **Cancers Bronchiques à Petites Cellules**, qui se distinguent comme leur nom l'indique par la petite taille de leurs cellules tumorales et leur tendance à se développer et se propager rapidement. L'OMS classe les CBPC parmi les néoplasies neuroendocrines pulmonaires (**Tableau 1**), un sous-groupe de tumeurs épithéliales présentant une différenciation neuroendocrine sur le plan morphologique et immunophénotypique. Ces cancers représentent environ 15% des cas de cancers du poumon.

Tableau 1 : Classification histologique des néoplasies neuroendocrines pulmonaires selon l'OMS en 2021 (adapté de Nicholson et al., 2022). SOI : sauf autre indication.

Classification 2021 des néoplasies neuroendocrines pulmonaires selon l'OMS
Lésions précancéreuses
Hyperplasie neuroendocrine diffuse idiopathique
Tumeurs neuroendocrines
Tumeur carcinoïde, SAI / tumeur neuroendocrine, SAI
Carcinoïde typique / tumeur neuroendocrine, grade 1
Carcinoïde atypique / tumeur neuroendocrine, grade 2
Carcinomes neuroendocrines
Carcinome à petites cellules
Carcinome à petites cellules composite
Carcinome neuroendocrine à grandes cellules
Carcinome neuroendocrine à grandes cellules composite

La classification de l'OMS est régulièrement mise à jour pour refléter les avancées scientifiques et médicales. Dans la nouvelle classification de 2021, une attention particulière est portée sur les progrès en pathologie moléculaire, tels que l'identification de mutations génétiques et

l'évaluation de biomarqueurs spécifiques pour tous les types de tumeurs (Nicholson et al., 2022). Cette classification reconnaît deux sous-types de cancers du poumon à petites cellules :

-Le CBPC « **pur** » (~80% des cas) : caractérisé par des nappes diffuses de petites cellules rondes à fusiformes, avec un cytoplasme rare, des nucléoles peu visibles ou absents et une chromatine nucléaire finement granulaire. Une nécrose intratumorale est souvent observée, ainsi qu'un indice mitotique très élevé (avec une médiane de 80 mitoses par mm²). Ces tumeurs présentent également une forte expression de marqueurs de différenciation neuroendocrine, tels que la molécule d'adhésion cellulaire neuronale (NCAM), la chromogranine A (CHGA), la synaptophysine (SYP), les protéines Achaete-Scute Complex-Like 1 (ASCL1) et Neuronal Differentiation 1 (NEUROD1), ou encore la protéine associée à l'insulinome 1 (INSM1). Des cellules occasionnelles de grande taille peuvent être présentes, mais elles doivent représenter moins de 10% du nombre total de cellules pour le diagnostic de CBPC « pur ».

-Le CBPC « **composite** » (ou hétérogène) (~20% des cas) : défini par une combinaison d'un CBPC avec un autre contingent carcinomateux non à petites cellules. Les contingents les plus fréquemment retrouvés dans les CBPC composites sont les carcinomes à cellules larges ou les carcinomes neuroendocrines à grandes cellules (LCNEC), caractérisés par un cytoplasme plus abondant et l'expression des cytokératines 5 et 6 (CK5 et CK6) ainsi que du marqueur épidermoïde p40 (**Figure 2**). Une association avec un adénocarcinome est également possible. Le CBPC composite est plus couramment reconnu dans les échantillons chirurgicaux que dans les petites biopsies, probablement en raison de l'augmentation des artéfacts de compression et du nombre moindre de cellules dans ces dernières. La présentation clinique, la réponse à la chimiothérapie et le taux de survie des patients atteints d'un CBPC composite sont similaires à ceux des patients touchés par un CBPC pur, bien que la fréquence des tumeurs périphériques et résécables soit plus élevée pour le CBPC composite.

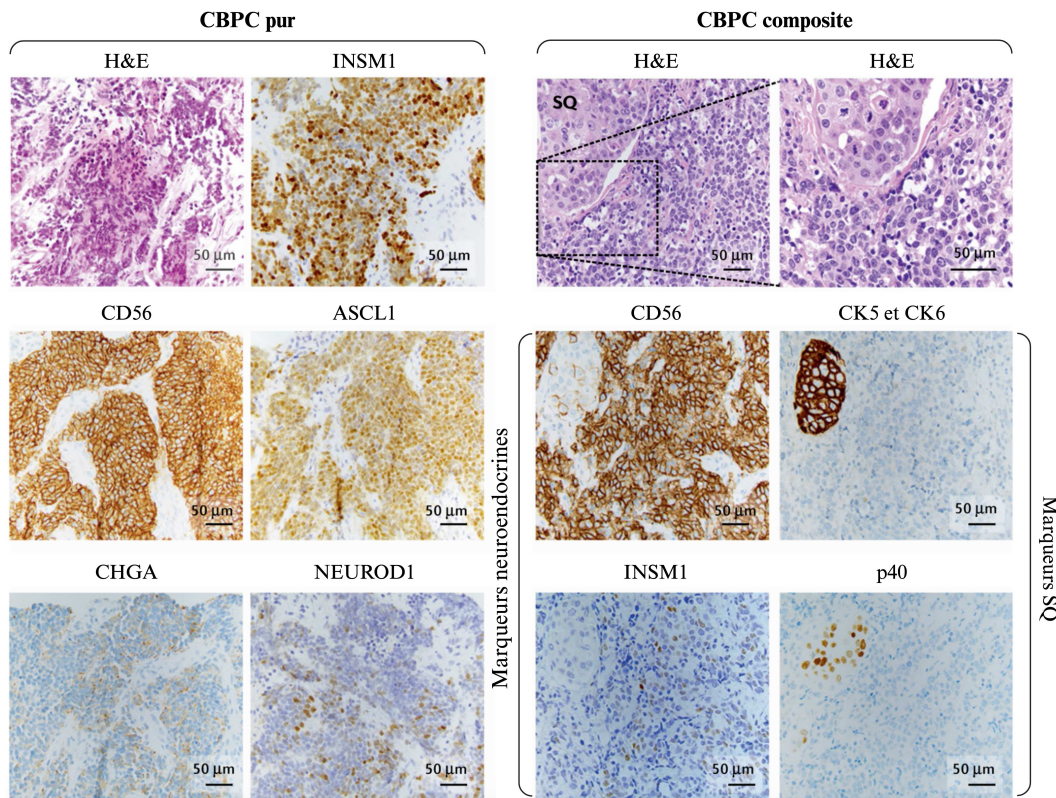


Figure 2 : Histopathologie des CBPC (adaptée de Rudin et al., 2021). H&E : hématoxyline et éosine. SQ : carcinome épidermoïde.

2. La classification TNM et grade tumoral

La classification TNM, développée par l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC) et l'American Joint Committee on Cancer (AJCC), est couramment utilisée pour classer les cancers, y compris ceux du poumon. Cette classification TNM est identique pour les CBNPC et les CBPC et prend en compte trois paramètres principaux :

- Taille et extension de la tumeur primaire (**T**) : classée de T0 à T4. Le chiffre augmente à mesure que la tumeur grossit et se rapproche des structures majeures dans la poitrine, telles que les grandes voies respiratoires des poumons, le cœur, les vaisseaux sanguins ou les tissus situés à l'extérieur des poumons.
- Atteinte des ganglions lymphatiques régionaux (**N**) : classée de N0 à N3, selon le degré d'atteinte des ganglions lymphatiques et leur proximité avec la tumeur.
- Présence de métastases à distance (**M**) : classée de M0 à M1, selon la présence ou non de métastases dans des organes distants.

Une lettre (a, b ou c) peut être ajoutée à chacun des paramètres afin de fournir une plus grande précision sur leur étendue (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Classification TNM des cancers broncho-pulmonaires (adapté de Rami-Porta et al., 2024).

T - Tumeur	Tx	Tumeur primaire non connue ou confirmée par la détection de cellules malignes dans les sécrétions bronchopulmonaires mais non détectables par les examens radiologiques et endoscopiques
	T0	Absence de tumeur identifiable
	Tis	Carcinome <i>in situ</i>
	T1	Une tumeur de 3 cm ou moins, confinée dans le poumon ou la plèvre viscérale, sans indication d'envahissement au-delà des bronches lobaires T1mi adenocarcinome minimalement invasif T1a ≤ 1 cm T1b > 1 cm et ≤ 2 cm T1c > 2 cm et ≤ 3 cm
	T2	Une tumeur mesurant plus de 3 cm mais moins de 5cm, présentant l'un des éléments suivants : -envahissement d'une bronche souche, quelle que soit la distance par rapport à la bifurcation trachéale, mais sans atteindre la bifurcation elle-même, -envahissement de la plèvre viscérale, -présence d'une atélectasie ou d'une pneumonie obstructive s'étendant à la région hilare. T2a > 3 cm mais ≤ 4 cm T2b > 4 cm et ≤ 5 cm
	T3	Une tumeur mesurant plus de 5 cm et moins de 7 cm, ou associée à un(des) nodule(s) tumoral(aux) distinct(s) dans le même lobe, ou présentant au moins l'un des caractères invasifs suivants : -atteinte de la paroi thoracique, -envahissement du nerf phrénique, -atteinte de la plèvre pariétale ou du péricarde.
	T4	Une tumeur mesurant plus de 7 cm ou associée à un(des) nodule(s) pulmonaire(s) distinct(s) présentant un envahissement quelconque parmi les suivants : -médiastin, -cœur ou gros vaisseaux, -trachée, -diaphragme, -nerf récurrent, -oesophage, -corps vertébraux, -carène.
N - Adénopathies	Nx	Invasion locorégionale inconnue
	N0	Absence de propagation aux ganglions lymphatiques régionaux
	N1	Métastases dans les ganglions lymphatiques péri-bronchiques et/ou hilaires ou intrapulmonaires du même hémithorax, y compris une extension directe
	N2	Métastases dans les ganglions lymphatiques médiastinaux ou sous-carénaux du même hémithorax N2a : Métastases dans un seul ganglion médiastinal du même côté ou dans la station ganglionnaire sous-carénaire N2b : Métastases dans plusieurs ganglions médiastinaux ipsilatéraux avec ou sans atteinte de la station ganglionnaire sous-carénaire
N3	Métastases dans les ganglions médiastinaux contralatéraux, hilaires contralatéraux, scalènes ou supraclaviculaires	
M - Métastases	M0	Aucune métastase à distance
	M1	Existence de métastases : M1a : Tumeur avec des nodules pleuraux ou péricardiques ou des épanchements pleuraux ou péricardiques malins, nodules tumoraux séparés dans un lobe controlatéral M1b : Une seule métastase extrathoracique dans un ou plusieurs organes distants M1c : Plusieurs métastases extrathoraciques dans un ou plusieurs organes distants M1c1 : Plusieurs métastases extrathoraciques dans un seul organe distant M1c2 : Plusieurs métastases extrathoraciques dans plusieurs organes distants

L'analyse combinée des coefficients attribués à chacun des trois paramètres permet ensuite de déterminer un stade d'évolution de la maladie. Pour les cancers bronchiques, les stades vont de I à IV (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Stadification selon la 8^{ème} classification TNM des cancers broncho-pulmonaires. Les tumeurs TisN0M0 correspondent au stade 0. Les tumeurs T1a(mi)N0M0 appartiennent au stade IA-1.

	N0	N1	N2	N3	M1a-b Tout N	M1c Tout N
T1a	IA-1	IIB	IIIA	IIIB	IVA	IVB
T1b	IA-2	IIB	IIIA	IIIB	IVA	IVB
T1c	IA-3	IIB	IIIA	IIIB	IVA	IVB
T2a	IB	IIB	IIIA	IIIB	IVA	IVB
T2b	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IVA	IVB
T3	IIB	IIIA	IIIB	IIIC	IVA	IVB
T4	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC	IVA	IVB

La classification TNM est préférée au système de stadification « limité » et « avancé » du CBPC, issu de pratiques cliniques antérieures où la simplicité et l'efficacité dans la prise de décision thérapeutique était primordiales. Cette approche, développée par le Veterans Administration Lung Study Group (VALSG) dans les années 1950, est définie comme suit (Figure 3) :

- Le **stade limité** (*limited stage*) : lorsque le cancer est contenu dans un seul côté de la poitrine. Ce stade inclut également le cancer ayant atteint les ganglions lymphatiques voisins.
- Le **stade avancé** (*extended stage*) : lorsque le cancer s'est largement propagé au-delà du poumon initial, atteignant l'autre poumon, les ganglions lymphatiques éloignés, ou d'autres parties du corps, y compris la moelle osseuse. Cela inclut également les cas où le cancer s'est propagé au liquide autour du poumon (épanchement pleural) ou du cœur (épanchement péricardique).

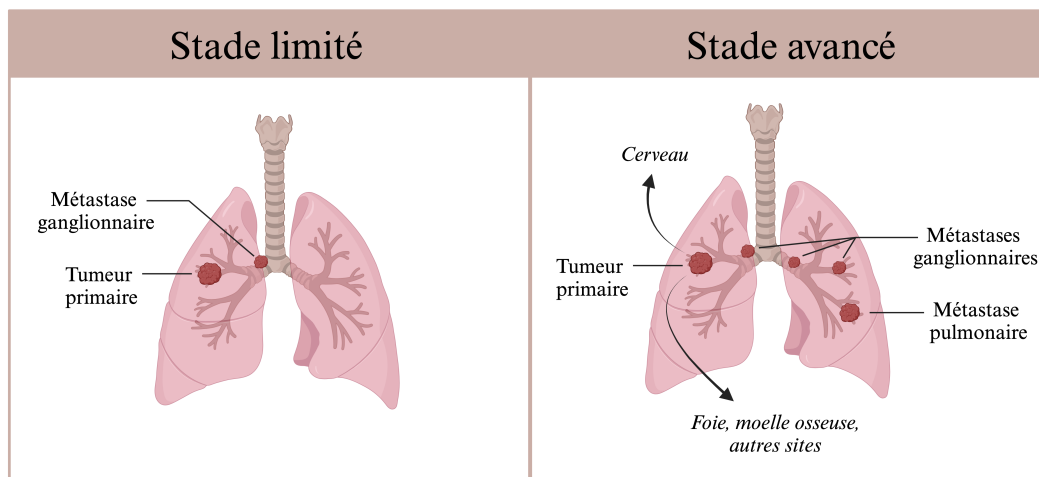


Figure 3 : Classification des CBPC selon le VALSG.

Les cliniciens sont aujourd’hui fortement encouragés à utiliser le système de stadification TNM (Shepherd et al., 2007; Vallières et al., 2009). En effet, ce système offre une meilleure discrimination anatomique de la pathologie ainsi qu’une description ganglionnaire et pronostique plus précise. Par exemple, le système de classification du VALSG ne distingue pas les patients présentant un CBPC à un stade précoce (T1-T2, N0-N1, M0) de ceux atteints d’une maladie localement avancée (tout T, N2-N3, M0).

L’utilisation de la classification TNM est donc largement avantageuse pour définir les stratégies de traitement optimales. Néanmoins, le système de classification du VALSG est encore largement utilisé tant dans la conception des essais cliniques que dans la présentation des données qui en découlent.

IV. Biologie et physiopathologie des cellules neuroendocrines pulmonaires (PNEC)

1. Définition et fonctions biologiques

Une cellule neuroendocrine est une cellule spécialisée qui présente des caractéristiques à la fois des cellules nerveuses (neurones) et des cellules endocrines. Ses principales caractéristiques sont les suivantes :

- **Production et sécrétion d'hormones** : comme les cellules endocrines, les cellules neuroendocrines sont capables de synthétiser et de sécréter une ou plusieurs hormones.
- **Réception et réponse aux signaux neuronaux** : comme les neurones, les cellules neuroendocrines peuvent recevoir des signaux nerveux et possèdent des récepteurs pour divers neurotransmetteurs, ce qui leur permet de répondre aux stimuli neuronaux.
- **Localisation** : elles sont présentes dans tout l'organisme, y compris dans le système nerveux central, le tractus gastro-intestinal, les poumons ainsi que d'autres tissus glandulaires.
- **Fonction** : elles jouent un rôle crucial dans l'intégration des systèmes nerveux et endocrinien, facilitant la coordination de nombreuses fonctions physiologiques telles que le métabolisme, la croissance, la reproduction et la réponse au stress.

Les cellules neuroendocrines pulmonaires sont des cellules épithéliales spécialisées des voies respiratoires, présentes sous forme de cellules isolées ou de groupes appelés corps neuroépithéliaux (NEB) dans l'épithélium respiratoire (**Figure 4**). Elles sont généralement situées à proximité des bifurcations des voies respiratoires (Kuo & Krasnow, 2015) et sont innervées par des fibres nerveuses provenant principalement du système nerveux autonome. Ces fibres nerveuses transmettent des signaux qui régulent l'activité des PNEC, notamment leurs sécrétions de neurotransmetteurs et de substances chimiques telles que la sérotonine (5-HT) ou la calcitonine. Les PNEC peuvent interagir avec d'autres types de cellules pulmonaires, comme les cellules nerveuses, immunitaires et épithéliales telles que les cellules Club et les cellules ciliées, contribuant ainsi à la régulation de divers processus physiologiques des voies respiratoires. De plus, les PNEC possèdent également des propriétés de cellules souches et semblent jouer un rôle crucial dans la réponse régénérative aux lésions graves des voies respiratoires (Hogan et al., 2014).

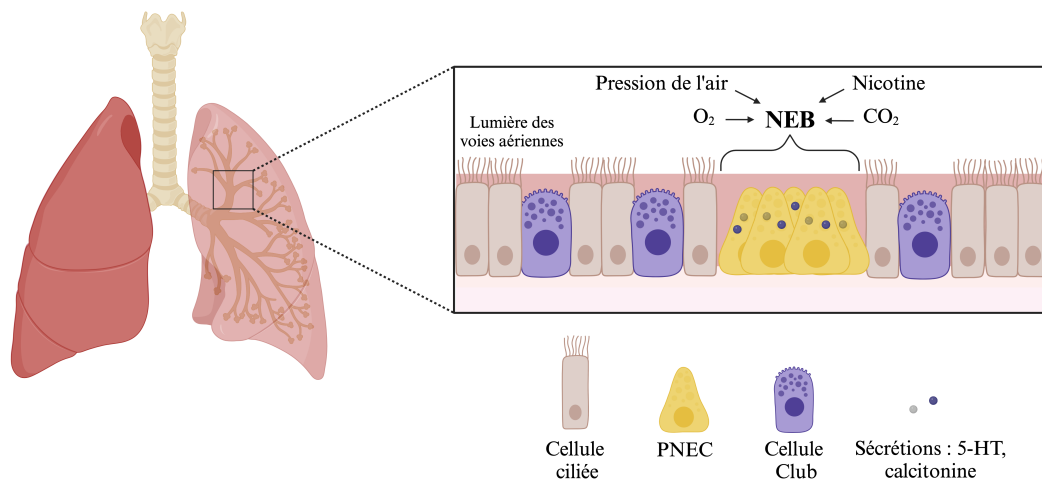


Figure 4 : Représentation schématique de l'organisation des cellules neuroendocrines pulmonaires et des corps neuroépithéliaux au sein de l'épithélium respiratoire (adaptée de Noguchi et al., 2020).

2. Origine embryologique

Les cellules endocrines peuvent s'organiser en organes autonomes, comme la thyroïde ou les glandes surrénales, ou s'associer à d'autres populations cellulaires au sein d'un tissu. C'est le cas des cellules neuroendocrines pulmonaires, qui font partie du tissu endocrinien diffus, situé à proximité des muqueuses respiratoires et digestives. L'origine embryologique de ce système endocrinien diffus est complexe et a longtemps fait l'objet de discussions. Le concept APUD (Amine Precursor Uptake and Decarboxylation) a été proposé pour la première fois par l'anatomiste A. E. Pearse en 1968. Ce concept supposait que toutes les cellules du système endocrinien diffus provenaient de précurseurs issus de la crête neurale, qui migraient ensuite vers les tissus périphériques où elles se localisaient de manière définitive pour former les cellules endocrines dispersées. Il est désormais établi que les cellules constituant le système endocrine diffus ne proviennent pas de précurseurs issus de la crête neurale, mais se forment localement à partir des mêmes cellules progénitrices que les autres cellules épithéliales environnantes (Day & Salzet, 2002).

Les cellules neuroendocrines pulmonaires se développent donc à partir de progéniteurs épithéliaux pulmonaires embryonnaires. Le marquage à la thymidine-3H pendant la gestation tardive du hamster syrien a fourni des preuves expérimentales soutenant l'origine endodermique des PNEC (Hoyt et al., 1990). De plus, d'autres études de traçage de lignage

cellulaire utilisant des souches murines Id2-CreERT2 ont démontré que les PNEC proviennent de progéniteurs de l'épithélium pulmonaire, en particulier des progéniteurs situés dans les bourgeons pulmonaires (Rawlins et al., 2009).

La différenciation des PNEC à partir de progéniteurs épithéliaux et le développement des NEB se produisent simultanément pendant le développement de l'épithélium pulmonaire. Deux facteurs de transcription jouent un rôle primordial dans la détermination du destin cellulaire lors de la différenciation des PNEC : ASCL1 et Hairy and Enhancer of Split 1 (Hes1). ASCL1 présente une distribution dispersée dans les bronches murines dès le début du développement épithélial, à partir du jour embryonnaire (E) 12.5, avant l'apparition d'autres types de cellules épithéliales pulmonaires (Rawlins et al., 2009). De plus, les cellules progénitrices murines mutées pour le gène *Ascl1* ne parviennent pas à se différencier en PNEC, soulignant ainsi le rôle essentiel d'ASCL1 dans leur différenciation (Ito et al., 2000).

Dans l'épithélium pulmonaire en développement, contrairement aux PNEC exprimant ASCL1, les autres cellules voisines se caractérisent par l'expression du répresseur de transcription Hes1 (**Figure 5**). Il a été démontré que la différenciation des PNEC est augmentée chez les souris déficientes en Hes1, ce qui suggère que Hes1 limite la lignée des PNEC (Ito et al., 2000). Il a également été montré que les PNEC de l'épithélium pulmonaire en développement expriment les ligands Notch Delta Like Ligand 1-4 (DLL1, DLL4) et Jagged 1-2 (JAG1 et JAG2) (Post et al., 2000). Chez les souris triple-knockout (KO) pour les récepteurs Notch1, Notch2 et Notch3, le nombre et la taille des NEB sont significativement augmentés, indiquant que les récepteurs Notch limitent également la lignée PNEC pendant le développement pulmonaire. En revanche, les souris transgéniques exprimant le récepteur Notch1 possèdent moins de PNEC (Morimoto et al., 2012).

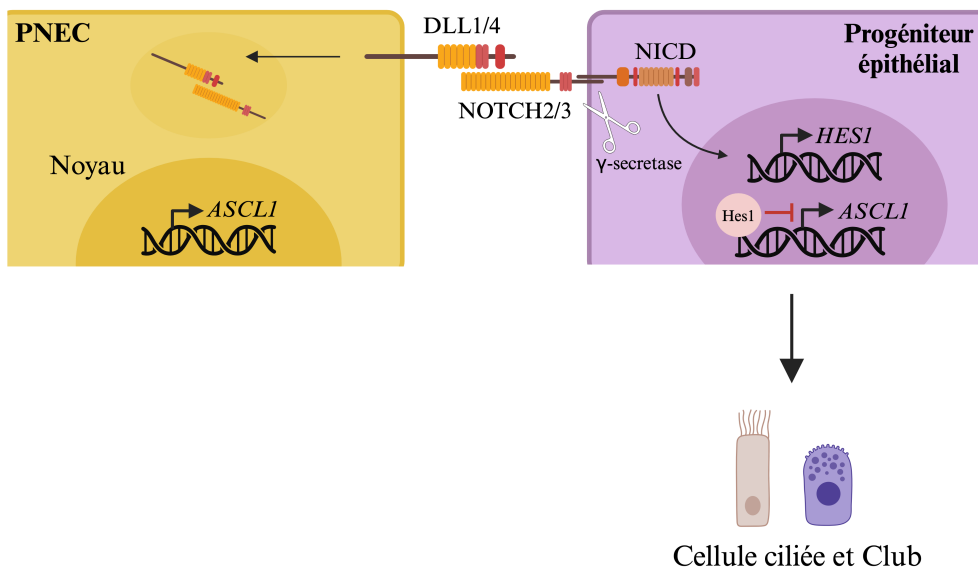


Figure 5 : Détermination du destin cellulaire des progéniteurs épithéliaux respiratoires par la régulation de l'interaction entre Notch/Hes1 et ASCL1 (adaptée de Noguchi et al., 2020). NICD : domaine intracellulaire de Notch.

3. Pathologies respiratoires

De nombreuses études ont démontré que des altérations de la structure histologique et des fonctions physiologiques des PNEC sont retrouvées dans diverses pathologies humaines, notamment les cancers. Par exemple, le cancer bronchique à petites cellules est un type de cancer neuroendocrinien qui partage de nombreuses caractéristiques morphologiques et fonctionnelles avec les PNEC (Bensch et al., 1968). Il a également été démontré que, dans la majorité des cas cliniques, les PNEC sont à l'origine de la formation des CBPC (Sutherland et al., 2011). Nous avons précédemment mentionné que les PNEC sont capables de sécréter divers neurotransmetteurs, dont la 5-HT, qui agit comme un facteur de croissance autocrine et bronchoconstricteur. La libération de ce neurotransmetteur est régulée chez ces cellules par le récepteur nicotinique de l'acétylcholine alpha-7 (nAChR alpha-7). La nicotine et son dérivé carcinogène, la NNK, se lient au récepteur nAChR alpha-7 des cellules neuroendocrines pulmonaires, entraînant la libération de 5-HT et l'activation de cascades de signalisation cellulaire associées à la croissance tumorale médiée par la protéine kinase C (PKC) ainsi que par la protéine kinase activée par les mitogènes Raf-1 (Schuller et al., 2003). L'exposition à un taux élevé de CO₂ agit de manière synergique. L'exposition chronique des PNEC au NKK augmente l'activité du récepteur nAChR alpha-7 et de sa voie de signalisation sérotoninergique, ce qui pourrait favoriser le développement du CBPC chez les fumeurs.

Une hyperplasie des PNEC a également été rapportée dans diverses maladies pulmonaires courantes telles que l'asthme ou la bronchopneumopathie chronique obstructive, mais aussi dans des maladies moins répandues comme la dysplasie bronchopulmonaire (BPD), les hernies diaphragmatiques congénitales (CDH) ou encore l'hyperplasie des cellules neuroendocrines du nourrisson (NEHI) (**Figure 6**).

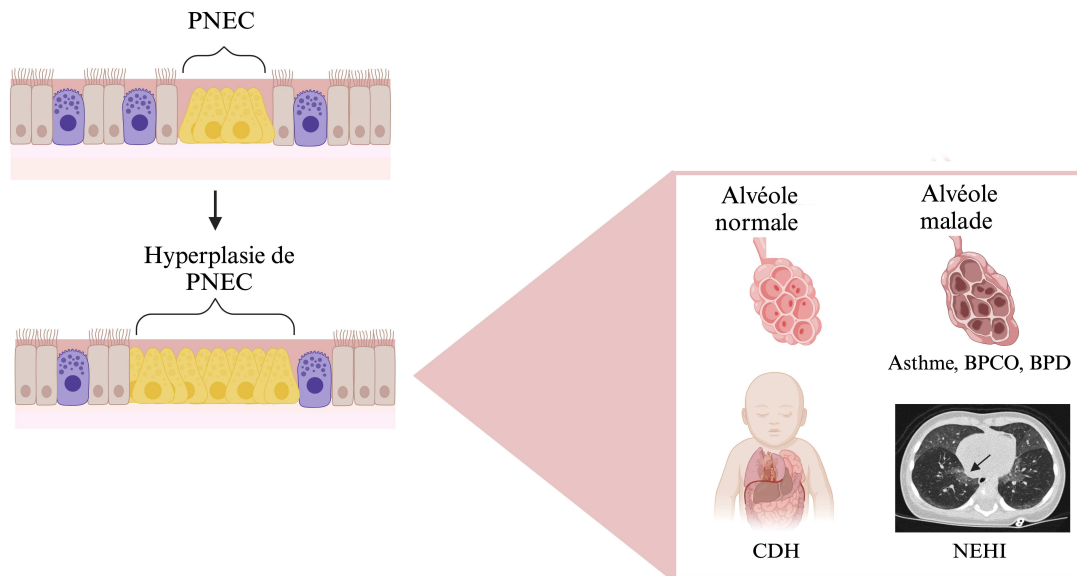


Figure 6 : Hyperplasie des PNEC et maladies respiratoires (adaptée de Noguchi et al., 2020).

V. Le sous-type des cancers bronchiques à petites cellules

1. Caractéristiques de la tumorigenèse et variations génétiques

Contrairement aux CBNPC, pour lesquels les conditions précancéreuses fournissent des informations précieuses sur l'origine des adénocarcinomes pulmonaires et des carcinomes épidermoïdes, la croissance rapide du cancer du poumon à petites cellules empêche la détection de telles lésions précoces. Par conséquent, le processus de formation de ce type de cancer reste mal compris.

Le profilage mutationnel des tumeurs de CBPC révèle une signature claire liée au tabagisme, fournissant une preuve directe que les agents carcinogènes du tabac sont responsables de l'initiation du CBPC (George et al., 2015). En revanche, le profilage génomique n'a pas permis

d'identifier des sous-types évidents de CBPC définis par des mutations spécifiques. Ce résultat pourrait être attribué au faible nombre d'échantillons de tumeurs analysés. Aucune différence mutationnelle cohérente n'a été observée en fonction de l'origine ethnique ou du statut tabagique, bien que l'on puisse s'attendre à une prévalence plus élevée des facteurs oncogéniques chez les rares patients atteints d'un CBPC n'ayant jamais fumé, comparativement aux fumeurs (Zhou et al., 2018a).

Il a été démontré que l'inactivation concomitante des suppresseurs de tumeurs p53 et RB (codés respectivement par *TP53* et *RBI*) est nécessaire à la tumorigenèse chez la majorité des patients atteints de CBPC (George et al., 2015; Harbour et al., 1988; Takahashi et al., 1989). Ces événements de double inactivation ciblent généralement les cellules neuroendocrines pulmonaires exprimant le facteur de transcription (TF) ASCL1, et déclenchent les processus moléculaires nécessaires au développement de la tumeur. Une étude préclinique a suggéré que la perte de *Tp53* et de *Rb1* mène à la transformation des PNEC et des cellules alvéolaires de type 2 en CBPC, bien que la conversion soit moins efficace dans ces dernières. Par conséquent, le CBPC se développe préférentiellement à partir des cellules neuroendocrines pulmonaires, mais il peut aussi, bien que plus rarement, se former à partir d'autres types de cellules épithéliales pulmonaires, telles que les cellules alvéolaires de type 2, les cellules basales ou les cellules Club (Drapkin & Rudin, 2021; Sutherland et al., 2011).

Des études récentes suggèrent également que certaines tumeurs de CBPC présentent des signatures d'expression transcriptionnelle similaires à celles des cellules tuft. Il est donc très probable que ces tumeurs proviennent de ces cellules épithéliales chimiosensorielles des voies respiratoires (**Figure 7**). Ces tumeurs se caractérisent par des morphologies très différentes de la forme neuroendocrine classique de cette maladie (Huang et al., 2018). Il a également été démontré que les cellules souches indifférenciées peuvent donner naissance à des tumeurs de CBPC par l'inactivation de *NOTCH*, *TP53* et *RBI* (Chen et al., 2019).

Enfin, bien que peu fréquents, les adénocarcinomes pulmonaires activés par EGFR ou ALK peuvent également se transdifférencier en un phénotype de CBPC en raison de la plasticité induite par les traitements de thérapies ciblées, telles que les inhibiteurs de tyrosine kinase (Gazeu et al., 2023; Quintanal-Villalonga et al., 2020). Cette transition histologique se manifeste chez environ 15% des adénocarcinomes pulmonaires porteurs de mutations EGFR. Les tumeurs transdifférenciées présentent un comportement clinique similaire à celui des CBPC

primaires, avec une croissance tumorale rapide et une dissémination métastatique précoce. Ainsi, comme mentionné précédemment, les cellules alvéolaires de type 2 (à l'origine des adénocarcinomes pulmonaires), ont également la capacité de se transformer en CBPC (Oser et al., 2015).

Il est important de noter qu'une transdifférenciation similaire peut également se produire dans le cancer de la prostate. Dans ce cas, l'adénocarcinome de la prostate peut acquérir les caractéristiques histologiques d'un cancer neuroendocrine à petites cellules après avoir développé une résistance aux thérapies systémiques traditionnelles. Ces cancers neuroendocrines résistants à la castration ont une origine clonale des adénocarcinomes de la prostate, mais présentent un phénotype neuroendocrine différencié unique, souvent accompagné d'altérations récurrentes des gènes *TP53* et *RBI* (Puca et al., 2019).

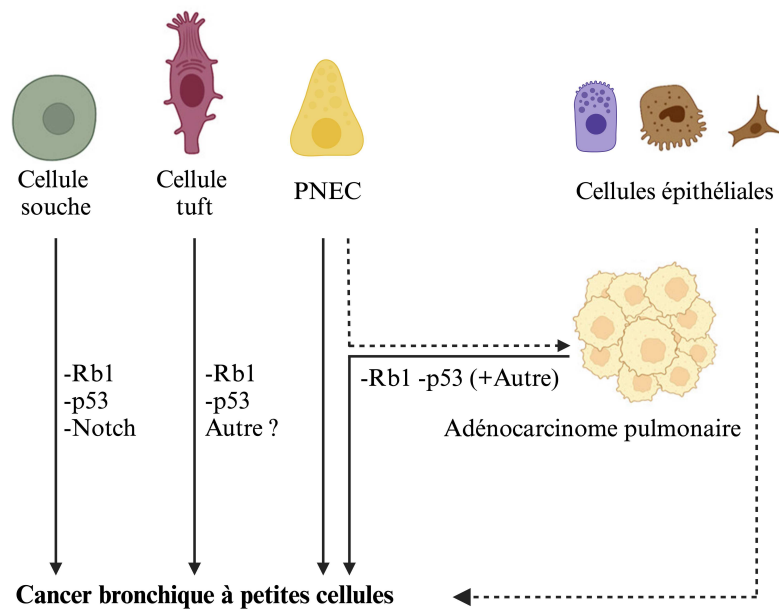


Figure 7 : Origines cellulaires et altérations génomiques dans le cancer bronchique à petite cellule (adaptée de Megyesfalvi et al., 2023).

Les protéines RB et p53 jouent toutes deux un rôle crucial dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire : RB agit comme un frein important à l'entrée en phase S, tandis que p53 intervient dans plusieurs mécanismes de régulation du cycle cellulaire, en déclenchant l'arrêt de la division cellulaire ou en induisant la mort cellulaire programmée en réponse à divers stress cellulaires, tels que des anomalies dans la réplication de l'ADN (Mollaoglu et al., 2017). Cette double inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs se distingue des altérations génétiques

primaires observées dans de nombreux cancers solides, comme les CBNPC, où les mutations oncogéniques activatrices jouent un rôle essentiel dans le développement tumoral (Huang et al., 2015).

En plus de la perte de *TP53* et *RBI*, le séquençage du génome a révélé d'autres altérations génétiques fréquentes dans le CBPC, notamment celles associées à la différenciation neuroendocrine et à la sensibilité ou à la résistance aux traitements thérapeutiques (George et al., 2015). Une proportion réduite mais significative des tumeurs de CBPC se caractérise par une amplification récurrente de *BCL2*, des membres de la famille *MYC*, ainsi que par la perte du suppresseur de tumeur *PTEN* (Peifer et al., 2012). L'expression accrue du gène *MYCL* est associée à une forte expression des marqueurs neuroendocrines et à des niveaux élevés du facteur de transcription ASCL1 (**Figure 8**). En revanche, l'amplification de *MYC* (c-MYC) favorise un phénotype à faible expression des marqueurs neuroendocrines et une morphologie variée, comme nous le détaillerons plus loin (Ireland et al., 2020). La surexpression du gène anti-apoptotique *BCL2* est une caractéristique du CBPC, agissant comme un promoteur de la carcinogenèse et de la progression du cancer en conférant une résistance à la mort cellulaire. Il est également important de noter que *BCL2* est une cible transcriptionnelle régulée par le facteur de transcription ASCL1 (Borromeo et al., 2016).

Les altérations des régulateurs épigénétiques sont également courantes dans le CBPC et pourraient jouer un rôle dans les changements de l'état cellulaire (Gardner et al., 2014). En effet, une délétion du gène *KMT2D*, qui code pour l'histone méthyltransférase 2D, est observée dans environ 8% des tumeurs de CBPC (Hystad et al., 2013).

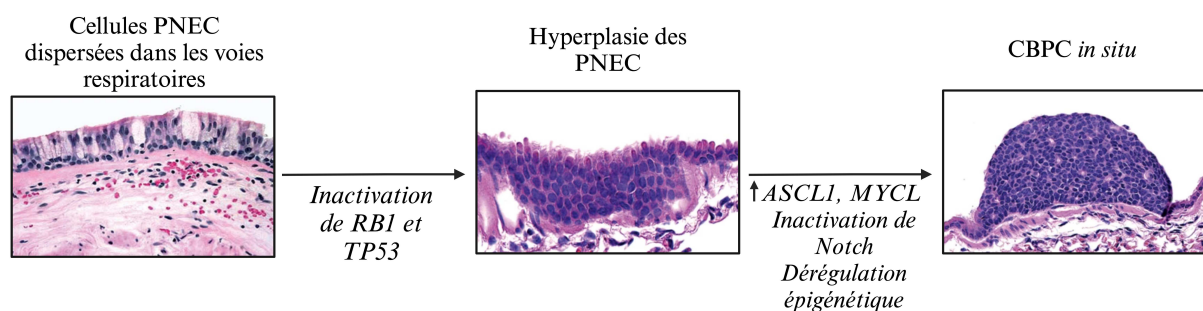


Figure 8 : Tumorigenèse du CBPC (adaptée de Gazdar et al., 2017).

Parmi les autres altérations génétiques fréquentes dans le CBPC, on trouve la mutation activatrice du gène codant pour la sous-unité catalytique α de la phosphatidylinositol-4,5-biphosphate 3-kinase (PIK3CA), ainsi que les délétions des gènes codant la CREB Binding Protein (CREBBP) et pour les membres de la famille des protéines RB, p107 et p130 (**Tableau 4**).

Tableau 4 : Gènes principalement altérés dans le CBPC (adapté de Rudin et al., 2021). RAS : rat sarcoma, mTOR : mammalian target of rapamycin.

Altérations génétiques fréquentes dans le CBPC			
Gène	Fréquence (%)	Altération	Fonctions principales
<i>TP53</i>	89	Délétion	Suppresseur de tumeur ; réponse au stress ; régulation de la transcription
<i>RBI</i>	64	Délétion	Suppresseur de tumeur ; régulation du cycle cellulaire ; répression de la transcription
<i>KMT2D</i>	13	Délétion	Suppresseur de tumeur ; modification des histones ; remodelage de la chromatine
<i>PIK3CA</i>	7	Mutation activatrice	Oncogène ; voie de signalisation PTEN-mTOR
<i>PTEN</i>	7	Délétion	Suppresseur de tumeur ; voie de signalisation PTEN-mTOR
<i>NOTCH1</i>	6	Mutation inactivatrice	Suppresseur de tumeur ; signalisation cellulaire
<i>CREBBP</i>	5	Délétion	Oncogène ; voie de signalisation RAS
<i>EGFR</i>	4	Mutation activatrice	Oncogène ; voie de signalisation RAS
<i>NOTCH3</i>	2.9	Délétion	Suppresseur de tumeur ; signalisation cellulaire

2. Classification neuroendocrine

Comme mentionné précédemment, le cancer du poumon à petites cellules a historiquement été classé comme une tumeur maligne neuroendocrine. Cette classification repose sur la présence, dans la majorité des cellules de CBPC, de granules éparpillés, de petite taille et à noyau dense, caractéristiques ultrastructurales des cellules neuroendocrines pulmonaires (Bensch et al., 1968).

À la fin des années 1970, un grand nombre de lignées cellulaires de CBPC a été établi à partir de tumeurs humaines par les équipes des chercheurs J.D. Minna et A.F. Gazdar (Carney et al., 1985; Gazdar et al., 1985). L'analyse des caractéristiques morphologiques de ces lignées a permis de les classer en deux phénotypes principaux :

-un phénotype « **classique** », plus courant, qui se développe principalement sous forme d'agrégats sphériques de cellules flottantes, avec ou sans nécrose centrale (**Figure 9**). Il est caractérisé par une morphologie typique, avec une forte expression des marqueurs neuroendocrines et un modèle de croissance non-adhérente en culture cellulaire (Carney et al., 1985). Les lignées classiques partagent des similarités histologiques avec les

carcinomes à petites cellules extrapulmonaires, issus des systèmes gastro-intestinal et génito-urinaire (Berniker et al., 2015).

-L'autre phénotype est appelé « **variant** » et correspond aux lignées développées à partir de tissus tumoraux prélevés sur des patients en rechute. Les cellules de ce phénotype sont alors plus grandes, présentant un nucléole proéminent, une perte partielle ou complète des propriétés neuroendocrines, ainsi qu'une signature génétique de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). En culture cellulaire, ces cellules forment une monocouche adhérente (Gazdar et al., 1985). De plus, les cellules variantes présentent des modèles de croissance et des morphologies distinctes *in vivo*, ainsi qu'une résistance relative aux traitements standards (Carney et al., 1985).

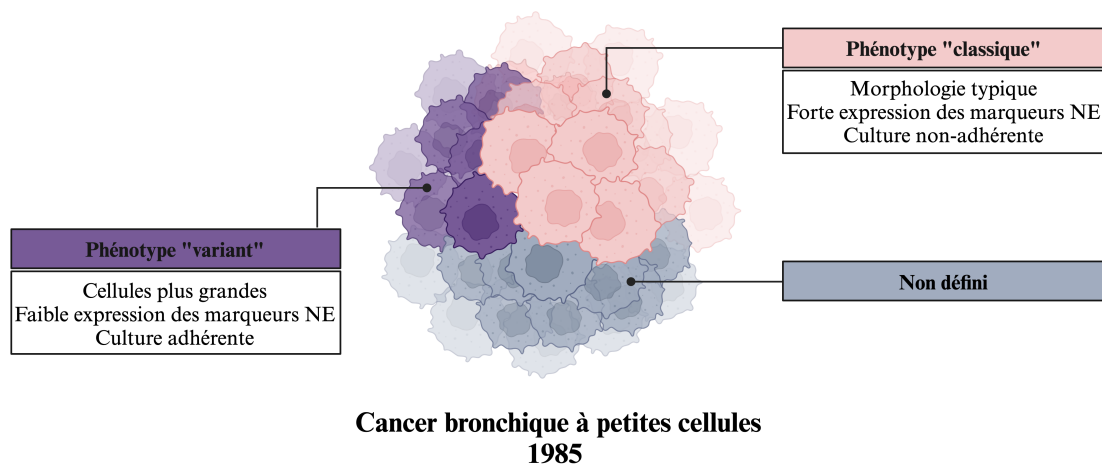


Figure 9 : Phénotype « classique » et « variant » du CBPC selon Adi F. Gazdar en 1985 (adaptée de Megyesfalvi et al., 2023).

3. Classification moléculaire

À l'exception de la classification basée sur le phénotype « classique » ou « variant » établie en 1985, le cancer bronchique à petites cellules a été considéré pendant des décennies comme une entité unique et homogène, tant sur le plan clinique qu'au laboratoire. En conséquence, aucune prédétermination de l'expression de marqueurs moléculaires prédictifs n'était prise en compte dans les protocoles d'étude clinique (Rudin et al., 2019; Schwendenwein et al., 2021).

Cependant, les récentes avancées dans les études de profilage et le développement de modèles précliniques ont permis de préciser la classification des CBPC (Drapkin & Rudin, 2021). Les tumeurs de CBPC peuvent désormais être catégorisées en sous-types basés sur leur profil d'expression de marqueurs neuroendocrines bien connus : hautement neuroendocrine (NE-high), faiblement neuroendocrine (NE-low) et non neuroendocrines (non-NE) pour celles qui ne présentent aucun signe de différenciation neuroendocrine. De plus, ces sous-types peuvent également être définis par des systèmes de notation associés à l'EMT (Gazdar et al., 2017; Jordan et al., 2017; Lohinai et al., 2019; Zhang et al., 2018a). Il convient également de souligner que ces sous-groupes présentent des différences majeures dans leur paysage immunologique. Les tumeurs NE-high et NE-low sont généralement considérées comme des « déserts » immunitaires, caractérisés par un très faible nombre de lymphocytes T infiltrants. En revanche, les tumeurs non-NE affichent une immunogénicité accrue (Dora et al., 2020).

Bien que le paysage mutationnel des tumeurs de CBPC ne semble pas encore permettre une classification précise, les connaissances émergentes suggèrent que les sous-types de CBPC pourraient être déterminés par l'expression de facteurs de transcription spécifiques (Rudin et al., 2019) (**Figure 10**). Les tumeurs de CBPC, qu'elles soient de stade « limité » ou « avancé », ont été stratifiées en quatre principaux sous-types basés sur l'expression élevée des TF suivants : ASCL1 (sous-type CBPC-A), NEUROD1 (sous-type CBPC-N), POU class 2 homeobox 3 (POU2F3, sous-type CBPC-P) et Yes-associated protein 1 (YAP1, sous-type CBPC-Y). Il a également été démontré que les niveaux d'expression de ces facteurs de transcription définissent ces mêmes sous-types distincts dans les ganglions lymphatiques métastatiques (Handa et al., 2023). Ces quatre sous-types sont d'une grande importance clinique car ils sont corrélés à des réponses thérapeutiques, des vitesses de croissance, des modifications génétiques et des pronostics significativement différents (Baine et al., 2020; Poirier et al., 2020).

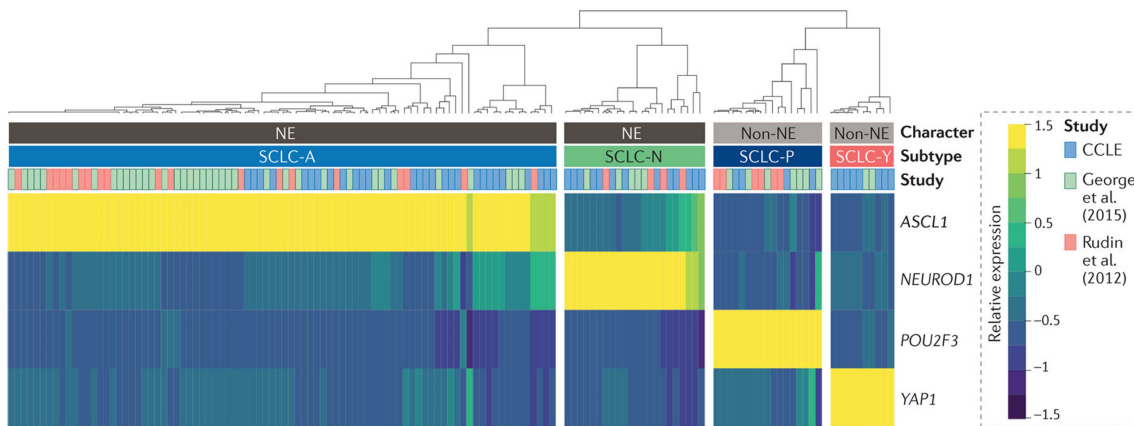


Figure 10 : Classification hiérarchique des sous-types de CBPC en fonction de l'expression relative de quatre facteurs de transcription clés (d'après Rudin et al., 2021).

Le sous-type CBPC-A, défini par l'expression d'ASCL1, est le plus courant, représentant environ 70 % des cas de CBPC. D'un point de vue pathologique, ces tumeurs se caractérisent par une expression élevée des marqueurs NE et une morphologie « classique » (Schwendenwein et al., 2021). Une étude ultérieure a proposé une subdivision des tumeurs guidées par ASCL1 en deux sous-groupes nommés « CBPC-A » et « CBPC-A2 », caractérisés par des niveaux d'expression différents du facteur de transcription Hes1 (Wooten et al., 2019).

Le sous-type CBPC-N a été identifié comme un ensemble distinct en raison de sa forte expression du facteur de transcription NEUROD1, impliqué dans la différenciation neuronale, ainsi que de sa sensibilité au virus de la vallée du Seneca, un virus oncolytique ciblant spécifiquement les cellules tumorales (Poirier et al., 2013). Ces tumeurs présentent généralement une expression des principaux marqueurs NE plus faible que celle observée dans le sous-type CBPC-A, tout en conservant néanmoins une morphologie « classique » de CBPC dans la majorité des cas. Il convient également de noter l'existence des tumeurs « mixtes », présentant une expression des TF ASCL1 et NEUROD1. Ce groupe de tumeurs est nommé « CBPC-AN » (Baine et al., 2020).

POU2F3 est un régulateur transcriptionnel majeur des cellules tuft, un type cellulaire rare connu pour ses fonctions chimiosensorielles et immunorégulatrices (Huang et al., 2018). Ces cellules sont présentes dans divers types d'épithéliums, et aussi connues sous le nom de « cellules en touffe » (Baine et al., 2022). Les tumeurs du sous-type CBPC-P ne montrent aucune expression des marqueurs NE classiques et présentent donc un phénotype « variant ». Ces CBPC

représentent une forme particulière de la maladie, suggérant une origine cellulaire différente de celle des sous-types CBPC-A et CBPC-N (Huang et al., 2018). Cliniquement, une forte expression de POU2F3 a récemment été associée à de meilleures perspectives de survie chez les patients de CBPC après chirurgie (Qi et al., 2022). Toutefois, des études de survie menées sur des patients présentant un stade avancé de la maladie ont donné des résultats contradictoires (Gay et al., 2021). La compréhension de sa pertinence clinique reste donc limitée à ce jour.

Comme mentionné précédemment, un quatrième sous-type, caractérisé par l'activation du facteur de transcription YAP1 a été suggéré en 2019. Cependant, ce sous-type n'a pas été confirmé par de nouvelles recherches, et l'existence d'un sous-type distinct CBPC-Y reste donc controversée (Caeser et al., 2022; Megyesfalvi et al., 2022). Récemment, une étude a finalement identifié un sous-type de CBPC « inflammatoire » (CBPC-I), caractérisé par une signature génétique inflammatoire et mésenchymateuse, ainsi que par l'absence d'expression des trois facteurs de transcription ASCL1, NEUROD1 et POU2F3 (Gay et al., 2021) (**Figure 11**).

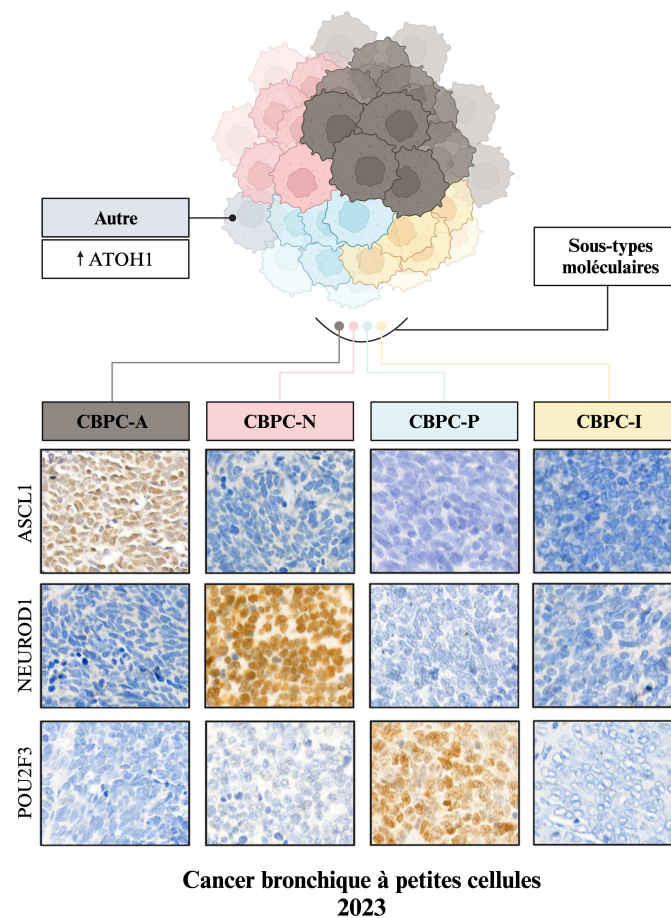


Figure 11 : Classification actuelle des CBPC (adaptée de Megyesfalvi et al., 2023).

Il convient également de mentionner qu'un sous-type rare de CBPC, caractérisé par une expression élevée du facteur de transcription ATOH1, pourrait exister. Les caractéristiques génomiques spécifiques de ce sous-type restent, à ce jour, largement méconnues (Simpson et al., 2020).

La caractérisation des sous-types de CBPC a considérablement amélioré notre compréhension de la maladie, mais de nombreuses questions subsistent quant à l'évolution de ces sous-types au fil du temps et en réponse aux cycles de traitement.

4. Hétérogénéité et plasticité tumorale

Pendant de nombreuses années, des travaux ont tenté de mieux comprendre la pathologie de ces cancers en se focalisant sur l'hétérogénéité tumorale entre différents groupes de patients. De nouvelles études se développent visant à comprendre l'hétérogénéité intratumorale, ainsi que les interactions que les cellules cancéreuses peuvent entretenir avec les cellules à proximité qui constituent le microenvironnement tumoral (TME).

La diversité intratumorale chez les cancers bronchiques à petites cellules peut se manifester à différents niveaux, tels que la morphologie et le type cellulaire infiltrant la tumeur (*ie.* cellules immunitaires, fibroblastes etc.), le profil génétique ou l'expression des protéines. Cette hétérogénéité présente généralement des défis importants en matière de diagnostic et de traitement, car les sous-populations de cellules tumorales peuvent répondre de manière variable aux thérapies disponibles.

Bien qu'un sous-type moléculaire dominant puisse être identifié dans la plupart des cas, des études récentes ont révélé la présence d'une hétérogénéité intratumorale considérable au sein des tumeurs de CBPC (Gay et al., 2021). Celle-ci peut se manifester de plusieurs façons. Dans certains cas, les tumeurs présentent à la fois des cellules fortement positives pour l'expression des marqueurs spécifiques d'un sous-type, ainsi que d'autres cellules négatives pour ces mêmes marqueurs au sein d'une même zone. Dans des modèles murins génétiquement modifiés (GEMM) de CBPC, la variation intratumorale de l'activité de la voie Notch régit la juxtaposition de cellules neuroendocrines chimiosensibles (faible activité de Notch) et de cellules non-neuroendocrines chimiorésistantes (forte activité de Notch) (Lim et al., 2017).

Dans d'autres cas, ces deux groupes de cellules peuvent être localisés dans des régions spatialement séparées (Megyesfalvi et al., 2022).

Outre les enjeux diagnostiques que ces phénomènes soulèvent, ces observations suggèrent également une possible évolution temporelle entre les sous-types avec des passages d'un stade à l'autre. Cette évolution fait référence au concept de plasticité tumorale qui, quant à elle, désigne la capacité des cellules tumorales à changer de phénotype ou de comportement en réponse à des signaux. En effet, des analyses supplémentaires de séquençage d'ARN de cellules uniques (scRNAseq) de tumeurs de GEMM suggèrent que *MYC* est capable d'activer la voie Notch pour favoriser la dédifférenciation des cellules NE d'un état ASCL1+ en cellules NEUROD1+ puis en cellules non-NE YAP1+ (Ireland et al., 2020). Ainsi, le sous-type CBPC-A pourrait être le précurseur des sous-types CBPC-N et -Y. Les sous-types moléculaires de CBPC ne sont donc finalement pas nécessairement distincts, mais représenteraient plutôt des étapes dynamiques de l'évolution tumorale induite par des voies de signalisation diverses telles que *MYC*. Conformément à ces observations, d'autres équipes ont également démontré la présence de plusieurs sous-types transcriptionnels au sein d'une même tumeur humaine de CBPC (Gay et al., 2019; Gay et al., 2021; Simpson et al., 2020).

Une étude récente a récemment mis en évidence qu'une discordance de l'expression génique existe entre les tumeurs primaires et les métastases ganglionnaires correspondantes chez des patients de CBPC. En effet, le profil NE des ganglions lymphatiques métastatiques ne reflète pas celui de la tumeur primaire, suggérant une hétérogénéité intertumorale au sein d'un même patient (Lohinai et al., 2019).

Il est également important de mentionner qu'en plus des sous-types, une hétérogénéité dynamique existe pour l'expression de plusieurs cibles thérapeutiques, telles que DLL3, les kinases Aurora A et B (*AURKA* et *AURKB*), et la poly (ADP-ribose) polymérase 1 (*PARP1*) (Stewart et al., 2020).

Compte tenu des vulnérabilités thérapeutiques uniques rapportées pour chaque sous-type, il est probable que les CBPC représentent une cible thérapeutique « mobile », nécessitant des approches plus générales, combinatoires ou axées sur la plasticité afin de contrer cette flexibilité transcriptionnelle.

5. Facteurs et trajectoires des métastases

Les métastases constituent une cause majeure de morbidité chez les patients atteints de cancers. Parmi tous les cancers solides, les CBPC se distinguent par leur propension métastatique remarquable avec plus de 70% des patients présentant déjà une maladie métastatique au moment du diagnostic. Ces métastases sont fréquemment retrouvées dans les ganglions lymphatiques, le cerveau, le foie et les os (Ko et al., 2021). De plus, la forte charge mutationnelle induite par le tabagisme ainsi que la croissance rapide des tumeurs soutiennent un modèle selon lequel les tumeurs primaires pourraient être intrinsèquement métastatiques.

Les mécanismes moléculaires et cellulaires permettant aux cellules cancéreuses de former des métastases demeurent largement méconnus, principalement en raison d'un manque de tissus disponibles pour la recherche. Le développement de modèles murins et l'étude des cellules tumorales circulantes (CTC) ont permis d'améliorer notre compréhension de la biologie métastatique du CBPC. Les patients présentent un nombre exceptionnellement élevé de CTC, offrant ainsi une « opportunité » unique d'explorer les mécanismes impliqués dans la dissémination métastatique, notamment les altérations génomiques, les changements d'expression génique et l'hétérogénéité tumorale (Carter et al., 2017; Hodgkinson et al., 2014; Hou et al., 2012). De plus, la forte présence de CTC chez les patients suggère que la circulation sanguine constitue une voie importante pour l'invasion tumorale de cette maladie dans les organes distants, bien que des métastases ganglionnaires soient couramment retrouvées chez les patients (Niho et al., 2007) et les modèles murins (Yang et al., 2018a). Chez les GEMM, les CBPC métastasent le plus souvent dans l'espace pleural, les ganglions lymphatiques et les organes périphériques comme le foie, de manière similaire à ce qui est observé chez les patients (Meuwissen et al., 2003). Une exception notable est l'absence de métastases cérébrales chez les modèles murins, qui pourrait être expliquée par des différences biologiques entre les tumeurs humaines et murines, ou plus simplement par la mort précoce des souris causée par la tumeur primaire ou les métastases hépatiques (Ko et al., 2021).

L'analyse de tumeurs primaires et des métastases de modèles murins a permis d'identifier NFIB comme un déterminant majeur du processus de dissémination métastatique (Denny et al., 2016; Semenova et al., 2016). La surexpression de ce facteur de transcription chez la souris ou certaines lignées cellulaires de CBPC favorise l'apparition de métastases vers le foie et d'autres organes (Denny et al., 2016; Dooley et al., 2011). De plus, l'expression de NFIB est associée à

divers programmes génétiques liés à la formation des métastases dont la migration, l'adhésion cellulaire et la différenciation neuronale (Wu et al., 2016). NFIB stimule également diverses étapes de la cascade métastatique en augmentant l'accessibilité de la chromatine (Denny et al., 2016; Ko et al., 2021). Par conséquent, l'expression de NFIB est souvent corrélée à un stade avancé de la maladie qui se traduit par une survie réduite des patients (Semenova et al., 2016).

D'autres mécanismes contribuent certainement à ce processus. Il a été démontré que la liaison de l'intégrine $\beta 1$ à la matrice extracellulaire pouvait déclencher l'activation de la voie PI3K et favoriser la survie des cellules de CBPC suite aux dommages à l'ADN (Feldman et al., 1991; Oshita et al., 2004). En outre, de récentes recherches ont identifié un rôle pour l'intégrine $\beta 1$ dans la migration et la capacité métastatique des cellules de CBPC, notamment *via* la signalisation de la Focal Adhesion Kinase (FAK) (Zhao et al., 2019).

Récemment, l'EMT a également été identifiée comme un facteur associé à la propagation métastatique des CBPC. Étant donné que YAP1 est une protéine liée à l'EMT, son expression accrue pourrait conférer une capacité métastatique supérieure aux cellules cancéreuses (Wu et al., 2021). De plus, la signalisation Notch a également été associée à l'EMT dans le CBPC et pourrait constituer un mécanisme permettant aux cellules de contrôler leurs caractéristiques épithéliales ou mésenchymateuses (Hassan et al., 2014). Des niveaux d'expression réduits du gène codant pour la E-cadhérine (*CDH1*) ont été observés dans les métastases de CBPC, suggérant que les tumeurs métastatiques pourraient présenter des caractéristiques plutôt mésenchymateuses (Böttger et al., 2019; Semenova et al., 2016). Cependant, le rôle de l'EMT dans la dissémination métastatique du CBPC demeure flou, nécessitant des études plus approfondies sur les programmes transcriptionnels qui lui sont associés.

Bien que le CBPC ait été peu étudié pendant des décennies, il pourrait bientôt devenir central dans notre compréhension conceptuelle des déterminants de la capacité métastatique. Avec une connaissance croissante de l'impact du type de cellule d'origine et de la génétique du cancer, nous sommes en position de découvrir l'ensemble des mécanismes cellulaires et moléculaires qui influencent la formation des métastases du CBPC. L'identification des mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de la dissémination métastatique fournira des cibles pour le développement de thérapies personnalisées visant à prévenir la formation de métastases pendant et après le traitement.

VI. Diagnostic

Le cancer bronchique à petites cellules se caractérise cliniquement par une localisation principalement centrale de la tumeur primaire au sein des voies respiratoires et par une propagation métastatique extrapulmonaire étendue au moment du diagnostic.

Compte tenu de sa croissance rapide et de son caractère agressif, la plupart des patients atteints d'un CBPC sont symptomatiques au moment de leur prise en charge. Les symptômes se manifestent habituellement moins de 12 semaines avant le diagnostic de la maladie et varient en fonction de la localisation et de la taille de la tumeur primaire (Basumallik & Agarwal, 2024).

La croissance locale intrathoracique est responsable de symptômes spécifiques au moment du diagnostic, tels que la toux, la respiration sifflante, la dyspnée, l'hémoptysie, la compression de la veine cave supérieure entraînant un œdème de la partie haute du corps, la compression de l'œsophage provoquant une dysphagie et la compression du nerf laryngé récurrent produisant une paralysie de la corde vocale gauche. La fatigue, l'anorexie, la perte de poids et les troubles neurologiques sont associés à une propagation à distance. Les métastases se retrouvent fréquemment dans le cerveau, le foie, les glandes surrénales et les os (Megyesfalvi et al., 2021).

Le CBPC est le sous-type de cancer du poumon le plus souvent associé à des syndromes paranéoplasiques (SNP). En effet, environ 10% des patients atteints de CBPC développent un SNP au cours de l'évolution de leur maladie (Gandhi & Johnson, 2006; Iams et al., 2019). Les SNP endocriniens résultent de la production ectopique d'hormones ou de peptides biologiquement actifs par les cellules cancéreuses et incluent le syndrome de sécrétion inappropriée d'hormone antidiurétique (SIADH) ainsi que le syndrome de Cushing (Gandhi & Johnson, 2006). Les SNP neurologiques sont, quant à eux, caractérisés par des réactions auto-immunes déclenchées par le cancer et dirigées contre des antigènes communs aux cellules tumorales et au système nerveux, appelés antigènes onco-neuronaux. Parmi les SNP neurologiques associés au CBPC, le syndrome myasthénique de Lambert-Eaton (LEMS) est le plus couramment identifié. Il se caractérise par une faiblesse musculaire proximale et une fatigue qui s'aggravent progressivement. Si le système nerveux autonome et les nerfs crâniens sont impliqués, des symptômes tels que la sécheresse de la bouche, la constipation, la ptose et

la faiblesse respiratoire peuvent également apparaître (Gandhi & Johnson, 2006; Lennon et al., 1995).

En raison de l'agressivité du CBPC, un bilan diagnostique et de stratification doit être effectué le plus rapidement possible à l'arrivée du patient. Les radiographies postéro-antérieures et latérales sont souvent les premiers examens d'imagerie réalisés (Panunzio & Sartori, 2020). Cependant, environ 4% des patients atteints d'un CBPC présentent une radiographie pulmonaire sans anomalie apparente, ce qui rend souvent cette modalité d'imagerie non spécifique en l'absence de signes évidents d'envahissement (Gridelli et al., 2015). En général, les tumeurs se manifestent sous la forme de masses hilaires visibles sur les radiographies thoraciques, souvent associées à un élargissement médiastinal causé par l'augmentation des ganglions lymphatiques (Panunzio & Sartori, 2020). Lorsque la radiographie du thorax ainsi que l'examen clinique font suspecter un cancer du poumon, il est essentiel de réaliser une tomodensitométrie (TDM) du thorax et de la partie supérieure de l'abdomen afin d'approfondir l'évaluation (**Figure 12**). Au scanner, les tumeurs de CBPC présentent habituellement des masses avec des contours lisses, lobulés ou irréguliers. La nécrose et l'hémorragie sont assez fréquentes, de même que les ganglions médiastinaux volumineux. Les CBPC peuvent également se manifester sous la forme de nodules pulmonaires isolés de manière plus occasionnelle. La TDM est donc cruciale pour évaluer l'extension locale de la tumeur et sa proximité anatomique avec les structures environnantes telles que les vaisseaux sanguins, le cœur, la plèvre, la paroi thoracique et l'œsophage (Kalemkerian, 2012).

En plus de son utilité diagnostique, la tomographie par émission de positrons (TEP) couplée à la TDM (TEP-TDM) peut également fournir des informations sur le pronostic (Martucci et al., 2019; Zer et al., 2016). Cette technique utilise un traceur radiopharmaceutique appelé fluorodésoxyglucose marqué au Fluor-18 (18F-FDG) afin d'identifier les cellules qui consomment beaucoup de glucose telles que les cellules tumorales. Des niveaux plus élevés de captation sont souvent observés dans les stades avancés de la maladie. En effet, une charge métabolique ainsi qu'une glycolyse totale élevées sont corrélées à un pronostic défavorable chez les patients.

Avant d'initier tout traitement, il est indispensable d'obtenir un diagnostic histologique précis du CBPC, même chez les patients présentant une altération de la fonction pulmonaire. Les méthodes de prélèvement sont définies par les oncologues, chirurgiens et radiologues

interventionnels, en tenant compte principalement de l'emplacement anatomique de la tumeur. Cette décision doit également tenir compte du stade global de la maladie et de l'état général du patient (Yung, 2003). Il est recommandé de diagnostiquer les lésions pulmonaires en utilisant la méthode la plus simple et la moins invasive possible (Rivera et al., 2013).

Étant donné que de nombreux patients développent des métastases supraclaviculaires, une biopsie percutanée guidée par échographie peut souvent être la méthode la plus efficace pour obtenir une quantité suffisante de tissu pour l'analyse (van Overhagen et al., 2004). La bronchoscopie est conseillée chez les patients dont les tumeurs se trouvent dans la région centrale du corps (El-Bayoumi & Silvestri, 2008). Une alternative pour la stratification médiastinale est la médiastinoscopie, qui est réalisée sous anesthésie générale. Cependant, la bronchoscopie est une méthode moins invasive, présentant moins de complications et une sensibilité diagnostique supérieure (Um et al., 2015).

Si les résultats de la bronchoscopie ne sont pas concluants pour poser un diagnostic, une biopsie transthoracique à l'aiguille peut alors être envisagée, notamment pour les lésions périphériques (Rivera et al., 2007). Celle-ci est guidée par un scanner en temps réel pour optimiser le rendement, et présente une sensibilité dépassant souvent les 90% (Borelli et al., 2022; Lee et al., 2019).

Dans les rares cas où aucune des méthodes précédemment mentionnées n'est efficace ou réalisable, la biopsie chirurgicale doit être envisagée comme une approche diagnostique finale (Sihoe et al., 2013). De plus, chez les patients présentant un épanchement pleural accessible, il est conseillé d'effectuer une thoracentèse afin de faciliter le diagnostic (Rivera et al., 2007).

La méthode d'imagerie traditionnelle pour l'évaluation des métastases cérébrales est l'imagerie par résonance magnétique (IRM) avec contraste (Tong et al., 2020).

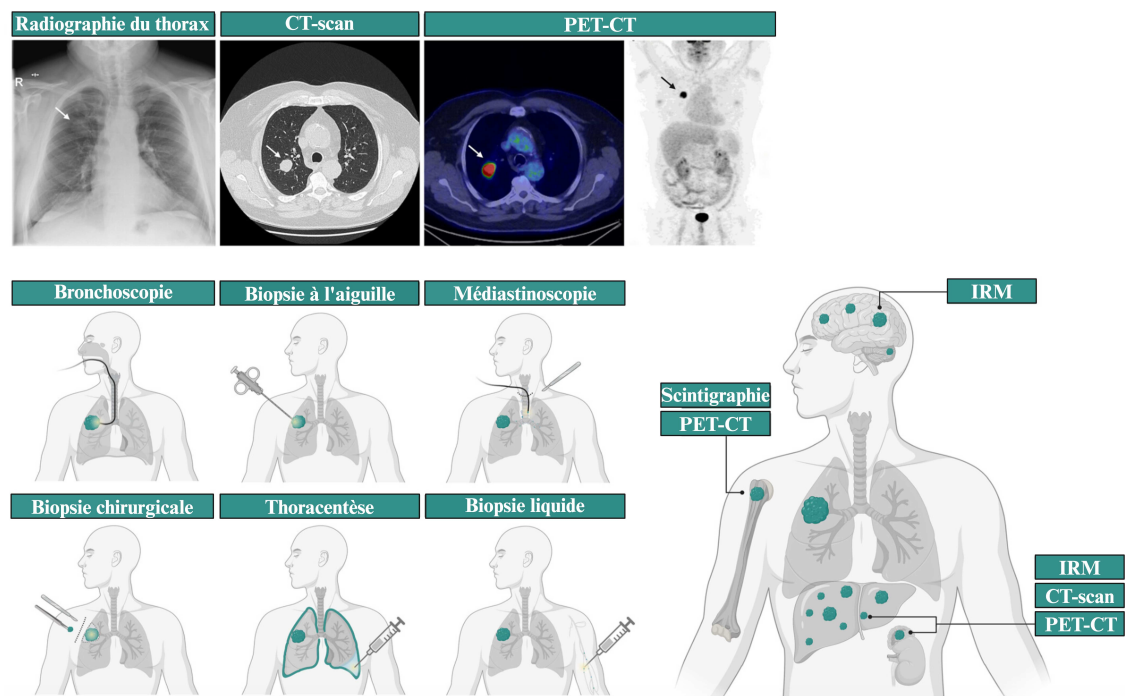


Figure 12 : Méthodes utilisées pour le diagnostic et la stratification du CBPC (adaptée de Megyesfalvi et al., 2023).

Le CBPC possède des critères de diagnostic bien définis, mais d'autres tumeurs partagent certaines caractéristiques cliniques, radiologiques et histologiques. Les symptômes causés par la croissance locale de la tumeur et la propagation métastatique intrathoracique sont des caractéristiques cliniques retrouvées dans la majorité des cancers du poumon, y compris le CBNPC. Les SNP ne sont pas non plus exclusivement spécifiques et peuvent être associés de manière peu fréquente à d'autres tumeurs neuroendocrines (Kaltsas et al., 2010).

Le diagnostic final est donc confirmé uniquement par l'examen histopathologique complété par la cytologie (Früh et al., 2013). La cytologie est une méthode particulièrement fiable pour le diagnostic du CBPC, car les biopsies bronchiques peuvent contenir des artéfacts d'écrasement et de la nécrose, ce qui peut gêner le diagnostic final (Raso et al., 2021). Les frottis cytologiques et les blocs cellulaires montrent généralement de petites cellules bleues (environ 1,5 fois la taille des lymphocytes) avec un cytoplasme peu abondant (Raso et al., 2021; Sturgis et al., 2000). Il est important de noter que les CBPC fortement neuroendocrines sans zone nécrotique étendue se confondent avec les tumeurs carcinoïdes pulmonaires (Fisseler-Eckhoff & Demes, 2012). Dans ce cas, l'indice de marquage Ki67 est très utile car il est considérablement plus élevé chez les CBPC que dans les carcinoïdes. Bien qu'il ne soit pas encore utilisé en clinique,

POU2F3 pourrait également constituer un marqueur diagnostique supplémentaire pour les tumeurs qui présentent des niveaux d'expression faibles ou absents des marqueurs NE (Baine et al., 2022).

Un nombre élevé de CTC est un facteur de pronostic défavorable pour les patients atteints d'un CBPC (Tay et al., 2019). L'analyse des CTC et/ou de l'ADN libre circulant est encore au stade expérimental aujourd'hui mais pourrait bientôt contribuer à l'évaluation des caractéristiques tumorales, y compris l'hétérogénéité intratumorale (Almodovar et al., 2018; Stovold et al., 2012).

VII. Prise en charge thérapeutique

1. Chirurgie

L'approche thérapeutique initiale du cancer bronchique à petites cellules varie considérablement en fonction du stade de la maladie. La résection chirurgicale a été écartée de l'arsenal thérapeutique du CBPC pendant des décennies, principalement en raison des résultats peu satisfaisants des essais cliniques randomisés axés sur la chirurgie menés entre 1970 et 1990 (Fox & Scadding, 1973; Lad et al., 1994).

Néanmoins, chez les patients présentant une maladie à un stade limité (T1-T2N0M0), la lobectomie accompagnée d'une dissection des ganglions lymphatiques médiastinaux et suivie d'une chimiothérapie adjuvante a montré des taux de survie à 3 ans dépassant les 50% (Shepherd et al., 1991; Tsuchiya et al., 2005). En outre, des essais récents appariés selon des scores de propension ont rapporté des taux de survie encourageants chez des patients à un stade plus avancé de la maladie pris en charge chirurgicalement (Combs et al., 2015; Liu et al., 2018).

Il a été démontré que de bons résultats à long terme après une résection chirurgicale ne peuvent être atteints qu'avec l'administration de plusieurs cycles de chimiothérapie systémique adjuvante (Tsuchiya et al., 2005). Une étude menée sur une vaste cohorte de patients a ainsi montré que le traitement par chimiothérapie adjuvante, avec ou sans radiothérapie, entraîne une augmentation significative de plus de 12% du taux de survie à 5 ans par rapport à l'absence de traitement adjuvant (Yang et al., 2016). Cette augmentation est même nettement supérieure au

bénéfice absolu observé avec la chimiothérapie postopératoire du cancer bronchique non à petites cellules, où la chimiothérapie à base de cisplatine a augmenté le taux de survie à 5 ans de 5,4% (Pignon et al., 2008). Ainsi, les lignes directrices actuelles recommandent une chimiothérapie adjuvante pour tous les patients de CBPC subissant une résection pulmonaire pour un stade T1-T2N0M0 (Ganti et al., 2021).

La résection anatomique, en particulier par lobectomie, le sexe (notamment avec un avantage significatif en termes de survie chez les femmes), ainsi que la résection complète de la tumeur confirmée par examen pathologique (résection R0), figurent désormais parmi les facteurs prédictifs clés associés à des résultats positifs à long terme (Rami-Porta et al., 2005; Varlotto et al., 2011). Ici, la définition de la résection R0 pourrait bientôt être renforcée par un test de détection de cellules tumorales circulantes ou d'ADN postopératoire négatif (Rami-Porta et al., 2020).

Il convient également de souligner qu'en cas d'atteinte ganglionnaire de stade N1 ou N2, ou en cas de résection incomplète (R1), la chimiothérapie adjuvante doit être complétée par une radiothérapie thoracique (Schreiber et al., 2010; Zhang et al., 2017). Dans ce contexte, la radiothérapie post-chirurgie diminue de manière significative les taux de récurrence locale à 1 an, 2 et 3 ans chez les patients (Zhang et al., 2017).

Il a également été prouvé que l'irradiation crânienne prophylactique (ICP) postopératoire réduit considérablement le risque de métastases cérébrales et prolonge la survie des patients traités pour un CBPC (Bischof et al., 2007; Xu et al., 2017). Cependant, le risque de développer des métastases cérébrales après avoir subi une résection chirurgicale chez les patients atteints d'un stade précoce (en particulier d'un stade I) est généralement très faible. Ainsi, une surveillance active par IRM pourrait être tout aussi efficace (Rusthoven & Kavanagh, 2017; Yang et al., 2018b).

Aujourd'hui encore, le rôle de la chirurgie dans la prise en charge des patients de CBPC reste discutable (Hoda et al., 2018). En effet, la gestion des patients pouvant bénéficier de ce type de traitement suscite des débats en raison du manque d'essais cliniques comparant les approches non chirurgicales aux méthodes chirurgicales à l'ère de la stratification et des thérapies modernes. En conséquence, selon les directives actuelles du National Comprehensive Cancer Network (NCCN), la chirurgie ne doit être envisagée uniquement pour les patients aux stades

cliniques I-IIA (T1-T2N0M0) et la lobectomie complétée d'une lymphadénectomie doit obligatoirement être suivie d'un traitement systémique postopératoire (Ganti et al., 2021) (**Figure 13**).

2. Chimiothérapies et radiothérapies

La chimiothérapie joue un rôle crucial dans la gestion des cancers bronchiques à petites cellules. En tant que traitement fondamental à tous les stades de la maladie, elle constitue un pilier essentiel pour contrôler la croissance tumorale et améliorer la qualité de vie des patients, même après l'échec des thérapies initiales (Megyesfalvi et al., 2023).

Actuellement, les traitements combinant des agents de liaison à l'ADN à base de sels de platine (tels que le cisplatine ou le carboplatine) et des inhibiteurs de la topoisomérase (étoposide, irinotécan) sont les schémas chimiothérapeutiques les plus utilisés pour les patients atteints de CBPC (Fink et al., 2012; Ganti et al., 2021; Mascaux et al., 2000). Ces combinaisons sont aujourd'hui reconnues pour leur efficacité, qu'elle soit donnée seule ou en association avec d'autres traitements systémiques comme l'immunothérapie ou d'autres modalités curatives telles que la radiothérapie ou la chirurgie.

Toutefois, en raison du profil de toxicité hétérogène de ces agents cytostatiques, chaque traitement doit être personnalisé en fonction de l'état général, des comorbidités ainsi que des préférences du patient. Par exemple, les traitements à base de carboplatine sont recommandés chez les patients qui ne peuvent pas recevoir de chimiothérapie à base de cisplatine tels que les personnes âgées (Hatfield et al., 2016). Le nombre de cycles varie également en fonction du stade de la maladie. En général, il est conseillé d'administrer quatre cycles de cisplatine/carboplatine associés à de l'étoposide aux patients présentant un stade limité de la maladie, y compris ceux ayant subi une résection chirurgicale (**Figure 13**). En revanche, les individus souffrant d'une maladie avancée peuvent recevoir jusqu'à six cycles de chimiothérapie en fonction de leur réponse et de leur tolérance au traitement à l'issue des quatre premiers cycles (Ganti et al., 2021).

En complément de la chimiothérapie systémique, la radiothérapie joue un rôle majeur dans la prise en charge thérapeutique des patients de CBPC, qu'elle soit utilisée à des fins curatives ou

palliatives (Daly et al., 2021). Son utilisation, en combinaison avec d'autres chimiothérapies, doit être privilégiée par rapport à d'autres schémas de traitement en raison de leur nette supériorité en termes d'efficacité et de toxicité (Pujol et al., 2000; Sundstrøm et al., 2002). Ce traitement est donc considéré comme la pratique standard pour les patients atteints d'un stade limité de CBPC (jusqu'à N3, M0).

La séquence de traitement de radiothérapie (séquentielle ou concomitante, deux fois par jour ou une fois par jour) pour une maladie à un stade limité doit prendre en compte les facteurs clinicopathologiques de chaque patient (Christodoulou et al., 2019; Faivre-Finn et al., 2017). Les patients de CBPC atteints d'un stade limité devront recevoir une chimio-radiothérapie concomitante. Le traitement séquentiel est réservé aux patients présentant des volumes tumoraux importants ou un pronostic vital défavorable (Glatzer et al., 2017). Il est néanmoins important de noter qu'aucune différence significative n'a été observée en termes de profil de toxicité ou de survie globale entre les patients traités avec une radiothérapie biquotidienne ou unique. Il est généralement recommandé de débiter la radiothérapie dès que possible et d'encourager les patients à arrêter de fumer afin d'améliorer leur pronostic et l'efficacité du traitement (Murray et al., 1993; Spiro et al., 2006).

La radiothérapie peut également être appliquée comme traitement de consolidation pour éliminer les tumeurs résiduelles dans les stades avancés de la maladie (Berta et al., 2023). Il est cependant important de préciser que ce type de traitement n'offre principalement que des avantages différés en termes de survie (Slotman et al., 2015). Ce traitement pourrait notamment apporter des bénéfices aux patients présentant une forte réponse à la chimiothérapie systémique ou à la chimio-immunothérapie, en particulier ceux présentant un faible volume de métastases extrathoraciques et une maladie résiduelle localisée au niveau des poumons (Daly et al., 2021; Tian et al., 2022). De plus, les patients atteints d'une maladie avancée qui répondent à la chimiothérapie initiale et présentent un bon état général se voient souvent proposer une ICP (Aupérin et al., 1999; Meert et al., 2001; Slotman et al., 2007). Cependant, les bénéfices de l'utilisation de l'ICP sont actuellement remis en cause à l'ère de l'imagerie moderne, car cette technique présente un risque d'apparition d'effets secondaires importants, tels que la fatigue, des troubles cognitifs comme la perte de mémoire ou les difficultés de concentration. À cet égard, une récente étude japonaise a révélé que l'ICP n'apporte pas de bénéfices significatifs en termes de survie par rapport à une surveillance par IRM chez les patients atteints d'un stade avancé de la maladie (Takahashi et al., 2017).

3. Immunothérapies

Comme mentionné précédemment, les patients atteints d'un cancer bronchique à petites cellules présentent fréquemment des réponses paranéoplasiques auto-immunes, notamment le syndrome myasthénique de Lambert-Eaton. Ce syndrome résulte d'une réponse immunitaire contre des antigènes partagés entre les cellules cancéreuses et le système nerveux, indiquant ainsi que le CBPC peut être susceptible de générer des réponses immunitaires. De plus, les cellules de CBPC présentent un grand nombre de mutations tumorales, produisant de nombreux néoantigènes, ce qui favorise l'efficacité de l'immunothérapie (Rizvi et al., 2015).

Suite aux récentes avancées et bénéfiques cliniques observés avec l'utilisation des inhibiteurs de points de contrôle immunitaire dans les CBNPC, ces inhibiteurs ont également été testés chez des patients atteints de CBPC et se sont révélés prometteurs (Horn et al., 2016; Reck et al., 2016). Les inhibiteurs de points de contrôle immunitaire incluent les anticorps anti-protéine de mort cellulaire programmée 1 (PD-1), les anticorps anti-ligand PD-L1 (PD-L1) et les anticorps anti-antigène 4 des lymphocytes T cytotoxiques (CTLA-4).

Après des décennies sans changement significatif dans le parcours de soins, l'année 2019 a marqué une avancée dans le traitement du CBPC avec l'approbation par la Food and Drug Administration (FDA) de l'Atezolizumab, un inhibiteur de PD-L1, en combinaison avec une double chimiothérapie standard à partir de platine en première intention pour les patients atteints de la maladie à un stade avancé (Ganti et al., 2021; Horn et al., 2018; Poirier et al., 2020). Cette autorisation a été accordée sur la base des résultats de l'étude randomisée de phase 3 IMpower133 (**Tableau 5**), où l'ajout d'Atezolizumab au traitement initial a entraîné une amélioration significative de 0,9 mois pour la survie sans progression (PFS) et de 2 mois pour la survie globale (OS) médianes (Horn et al., 2018).

L'étude de phase 3 CASPIAN a produit des résultats similaires à ceux de l'étude IMpower133 en utilisant un autre inhibiteur de PD-L1. Dans cette étude, le Durvalumab combiné à la chimiothérapie a significativement prolongé la survie globale médiane de 2,7 mois par rapport au groupe recevant la chimiothérapie seule (Goldman et al., 2021; Paz-Ares et al., 2019). Peu de temps plus tard, la FDA a autorisé l'utilisation du Durvalumab comme traitement initial pour le CBPC à un stade avancé (Mathieu et al., 2021). L'extension d'environ 2 mois de la survie médiane observée dans ces deux études peut sembler faible mais cette valeur ne reflète pas

l'ampleur des bénéfices. En effet, une analyse approfondie des courbes de survie montre clairement que l'ajout d'inhibiteurs de points de contrôle immunitaire à la chimiothérapie standard à base de platine peut permettre de tripler la survie à 3 ans (Paz-Ares et al., 2022; Rudin et al., 2021). Ainsi, selon les directives du NCCN actuelles, la première ligne de traitement systémique recommandée pour les patients atteints d'un CBPC avancé consiste en une chimiothérapie à base de platine associée à l'étoposide, avec l'ajout d'Atezolizumab ou de Durvalumab (**Figure 13**). À la différence de la chimiothérapie seule, l'administration d'inhibiteurs de PD-L1 dans le cadre de la chimio-immunothérapie n'est pas interrompue après quatre à six cycles. Il convient alors de poursuivre la prise en charge avec un traitement d'entretien à l'Atezolizumab ou au Durvalumab, en se basant sur les résultats des essais cliniques mentionnés et l'approbation de la FDA (Ganti et al., 2021). Ces combinaisons ne font à ce jour pas partie de la norme de soins pour le CBPC à un stade limité en raison d'un manque de données cliniques robustes. Les études en cours permettront bientôt de mieux définir le rôle de l'immunothérapie dans cette population de patients.

Bien que ces combinaisons soient associées à une amélioration de la survie globale comparativement à la chimiothérapie seule, le blocage des points de contrôle immunitaire ne conduit à une réponse que chez environ 15% des patients atteints d'un CBPC (Chung et al., 2020; Ready et al., 2020). Plusieurs mécanismes peuvent expliquer l'efficacité limitée des immunothérapies ciblant les cellules T contre le CBPC, notamment la faible expression de PD-L1 et des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) à la surface des cellules de ce type de cancer (Doyle et al., 1985; Traversari et al., 1997). La présence de cellules immunitaires aux propriétés suppressives, comme les cellules T régulatrices, dans le microenvironnement tumoral du CBPC peut également contribuer à l'évasion immunitaire (Eerola et al., 2000; Wang et al., 2012).

Des études récentes suggèrent toutefois que la combinaison de la radiothérapie thoracique et l'immunothérapie a un effet synergique en augmentant l'expression des molécules du CMH-I à la surface des cellules tumorales et des cellules environnantes, favorisant ainsi l'infiltration des lymphocytes T CD8 positifs (CD8+) (Donlon et al., 2021). L'étude clinique en cours RAPTOR/NRG LU007 apportera des informations supplémentaires sur les bénéfices potentiels de la radiothérapie thoracique combinée à la chimio-immunothérapie (Diamond et al., 2022).

Dans un futur proche, l'émergence de nouvelles thérapies ciblant l'activité des macrophages (Weiskopf et al., 2016) ou le développement de cellules T exprimant des récepteurs antigéniques chimériques (CAR-T) spécifiquement dirigés contre le CBPC (Owen et al., 2019) pourraient également aider à surmonter l'actuelle efficacité limitée des cellules T contre ce type de cancer.

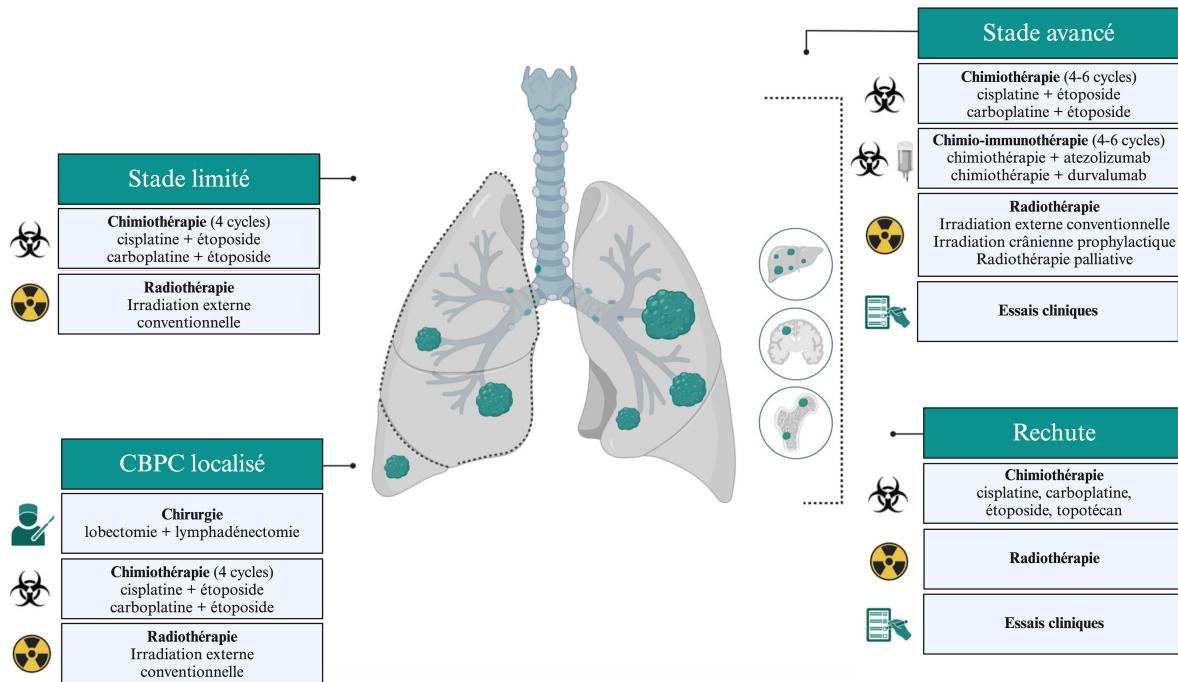


Figure 13 : Stratégies thérapeutiques privilégiées pour le CBPC selon le stade de la maladie (adaptée de Megyesfalvi et al., 2023).

4. La résistance thérapeutique dans le CBPC

À la différence du CBNPC, qui présente une résistance intrinsèque à la chimiothérapie, environ 75 à 80% des CBPC non traités sont initialement très sensibles aux agents endommageant l'ADN. Les taux de réponse clinique des CBPC sont presque deux fois supérieurs à ceux observés dans les CBNPC (Drapkin & Rudin, 2021). Cependant, le développement de la résistance est quasiment inévitable, et les taux de réponse aux traitements de deuxième ligne sont significativement réduits (Owonikoko et al., 2012).

Historiquement, l'EMT et la régulation à la baisse de l'expression de Schlaffen11 (*SLFN11*) par méthylation ont été historiquement impliquées dans la résistance au traitement du CBPC (Gardner et al., 2017; Gazdar et al., 2017). De plus, l'émergence de la résistance aux

médicaments pourrait être attribuée à des mécanismes liés à l'ADN, notamment l'amélioration des processus de réparation des dommages à l'ADN et l'inhibition de l'interaction des agents anticancéreux avec l'ADN (Chen et al., 2020). Enfin, l'inhibition de l'apoptose *via* la surexpression de *BCL2* et la délétion de *TP53* peuvent également conduire à une chimiorésistance (Gazdar et al., 2017).

Les divers destins moléculaires et cellulaires adoptés par le CBPC pourraient également constituer des réservoirs de cellules présentant une résistance intrinsèque aux traitements. Concernant les facteurs de transcription, bien que YAP1 ne soit pas exprimé à un niveau suffisant chez les patients naïfs de traitement pour définir un sous-type distinct, son expression élevée est associée à une résistance au platine. Par conséquent, une augmentation intratumorale de l'expression de YAP1 pourrait être à l'origine de cette résistance (Gay et al., 2021; Megyesfalvi et al., 2022; Song et al., 2020; Wu et al., 2021).

Le traitement systémique subséquent pour le CBPC dépend de l'agent thérapeutique administré en première intention ainsi que de l'intervalle de temps sans maladie écoulé depuis la fin du traitement initial (Ganti et al., 2021). Selon les directives actuelles du NCCN, il est recommandé de reprendre le traitement initial ou une thérapie similaire à base de platine si la période écoulée entre la fin du traitement initial et la rechute est supérieure à 6 mois (maladie sensible). Cette reprise peut également être envisagée pour les périodes de 3 à 6 mois sans maladie (maladie réfractaire ou résistante). En cas d'impossibilité de reprise du traitement initial, le topotécan, un inhibiteur de la topoisomérase 1, est alors privilégié comme agent thérapeutique de deuxième intention (Ganti et al., 2021). Dans certaines situations, l'irinotécan peut être envisagé comme alternative au topotécan en cas de rechute de la maladie, en raison de ses effets myélosuppresseurs moins prononcés (Das et al., 2021; Kondo et al., 2018).

Pour surmonter la résistance thérapeutique du CBPC, les travaux de recherche se concentrent sur le développement de thérapies ciblées spécifiques aux altérations génétiques présentes dans les tumeurs, ainsi que sur l'identification de combinaisons thérapeutiques efficaces avec de nouvelles approches d'immunothérapies.

5. Essais cliniques et directions futures

Outre les études cliniques approfondies sur l'inhibition de l'interaction entre PD-1 et son ligand PD-L1 et le blocage de CTLA-4, d'autres approches thérapeutiques sont actuellement à l'étude chez les patients atteints de CBPC, notamment le ciblage du récepteur immunomodulateur TIGIT. La protéine TIGIT est exprimée à la surface des lymphocytes T et des cellules tueuses naturelles (NK). En se liant à ses ligands (CD155 et CD112), elle inhibe l'activation des lymphocytes T et permet à la cellule tumorale d'échapper à la surveillance immunitaire (Chauvin & Zarour, 2020). Cette protéine a fait l'objet d'un essai clinique de phase 3 randomisé appelé SKYSCRAPER-02 (**Tableau 5**) visant à évaluer l'effet de l'ajout du Tiragolumab (anti-TIGIT) au traitement standard carboplatine/étoposide combiné à l'Atezolizumab en traitement de première intention. Malheureusement, les données préliminaires sur le Tiragolumab n'ont pas révélé de bénéfice clinique (Rudin et al., 2022).

Tableau 5 : Essais cliniques évaluant la sécurité et l'efficacité des inhibiteurs de points de contrôle immunitaire chez les patients atteints de CBPC (adapté de Megyesfalvi et al., 2023). ORR : taux de réponse objective.

Nom de l'étude	Phase	Mécanisme d'action	Agent	Résultats
IMpower133 (NCT02763579)	1/3	Inhibiteur de PD-L1	Atezolizumab	Sécurité : bien toléré ORR : 60,2% vs 64,4% PFS : 5,2 vs 4,3 mois (p=0,02) OS : 12,3 vs 10,3 mois (p=0,007)
CASPIAN (NCT03043872)	3	Inhibiteur de PD-L1	Durvalumab	Sécurité : bien toléré ORR : 79% vs 70% PFS : 5,1 vs 5,4 mois (p=NS) OS : 13,0 vs 10,3 mois (p=0,004)
KEYNOTE-604 (NCT03066778)	3	Inhibiteur de PD-1	Pembrolizumab	Sécurité : bien toléré ORR : 70,6% vs 61,8% PFS (12 mois) : 13,6% vs 3,1% (p=0,0023) OS (24 mois) : 22,5% vs 11,2% (p=0,0164)
NCT03066778	3	Inhibiteur de CTLA-4	Ipilimumab	Sécurité : bien toléré ORR : 62% vs 62% PFS : 4,6 vs 4,4 mois (p=0,016) OS : 11,0 vs 10,9 mois (p=0,377)
CheckMate 331 (NCT02481830)	3	Inhibiteur de PD-1	Nivolumab	Sécurité : bien toléré ORR : 14% vs 16% PFS : 1,4 vs 3,8 mois OS : 7,5 vs 8,4 mois
SCYSCRAPER-02 (NCT04256421)	3	TIGIT	Tiragolumab	Critères d'évaluation principaux non atteints

Plusieurs agents ciblés sont également actuellement testés pour le traitement du CBPC (**Figure 14**). Les cellules de CBPC montrent un niveau élevé d'expression des protéines PARP par rapport à d'autres sous-types de cancer du poumon et aux cellules épithéliales pulmonaires normales, ce qui les rend fortement sensibles aux inhibiteurs de PARP (Byers et al., 2012; Schwendenwein et al., 2021). Ces inhibiteurs ont notamment le potentiel de renforcer la réponse cytotoxique à la chimiothérapie, à l'immunothérapie et aux radiations ionisantes chez les patients de CBPC (Byers et al., 2012; Calabrese et al., 2004). Plusieurs essais cliniques de phase 1/2 sont en cours pour évaluer la toxicité de ces inhibiteurs autres que le Veliparib, tels que

l'Olaparib, le Rucaparib et le Talazoparib (**Tableau 6**). Une analyse intermédiaire sur l'efficacité du Rucaparib en combinaison avec le Nivolumab en traitement de première ligne a montré un bénéfice clinique chez 56% des patients inclus dans l'étude, avec une survie sans progression médiane de 7,4 mois à partir du diagnostic (Chauhan et al., 2021).

DLL3, un ligand inhibiteur de la voie Notch, est une cible thérapeutique prometteuse dans le CBPC en raison de son expression fréquente à la surface des cellules tumorales (Owen et al., 2019). Malgré les résultats prometteurs de la première étude de phase 1 chez l'homme (Rudin & Poirier, 2017), l'agent ciblé Rovalpituzumab Tesirine (Rova-T) n'a produit qu'une activité antitumorale modeste dans l'étude de phase 2 TRINITY (Morgensztern et al., 2019). Malheureusement, lors d'un récent essai clinique de phase 3, les patients traités par Rova-T ont montré une survie globale plus faible et des taux de toxicité plus élevés que ceux recevant la chimiothérapie de deuxième intention standard actuelle (Blackhall et al., 2021). En raison de l'absence de bénéfice en matière de survie, l'essai clinique de phase 3 TAHOE a été interrompu.

En raison de l'expression élevée du gène codant *BCL-2* dans de nombreuses tumeurs de CBPC, les antagonistes de BCL-2 représentent une option thérapeutique prometteuse pour ces patients. Les inhibiteurs de la famille BCL-2 montrent d'ailleurs une activité préclinique remarquable dans les tumeurs de CBPC (Lochmann et al., 2018). Cependant, le ciblage de BCL-2 par le Navitoclax n'a montré qu'une efficacité limitée en monothérapie contre les tumeurs de CBPC avancées ou récurrentes lors d'un essai clinique de phase 2, avec une réponse partielle obtenue chez un seul patient (2,6%), et une maladie stable observée chez 8 patients (23%) (Rudin et al., 2012). De plus, une thrombocytopénie a été observée chez 41% des patients. Cela pourrait être expliqué en partie par la nature non sélective du Navitoclax, car il cible à la fois BCL-2 et BCL-xL, ce qui entraîne des effets indésirables significatifs.

Le criblage des médicaments ciblés a révélé que les CBPC présentant une forte expression de MYC sont vulnérables à l'inhibition de l'AURORA kinase, qui, combinée à la chimiothérapie, supprime la prolifération et la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo* (Taniguchi et al., 2020). Un essai clinique récent a montré que l'Alisertib, un inhibiteur de l'AURKA, associé au Paclitaxel, améliore la survie globale et la survie sans progression comparé au traitement par Paclitaxel seul chez les patients atteints de CBPC récidivant ou réfractaire (Owonikoko et al., 2020). Bien que ces bénéfices cliniques en termes de survie ne soient pas statistiquement

significatifs, l'expression du gène *MYC* s'est avérée être un prédicteur fiable de la réponse à l'Alisertib.

Enfin, plusieurs études précliniques ont démontré que les inhibiteurs des tyrosines kinases (TK) ciblant le récepteur c-Kit, l'EGFR, le récepteur du facteur de croissance analogue à l'insuline et le récepteur c-MET pourraient être prometteurs pour le traitement du CBPC. Néanmoins, les essais cliniques suivants n'ont pas réussi à démontrer la supériorité de ces agents par rapport aux traitements standards actuels.

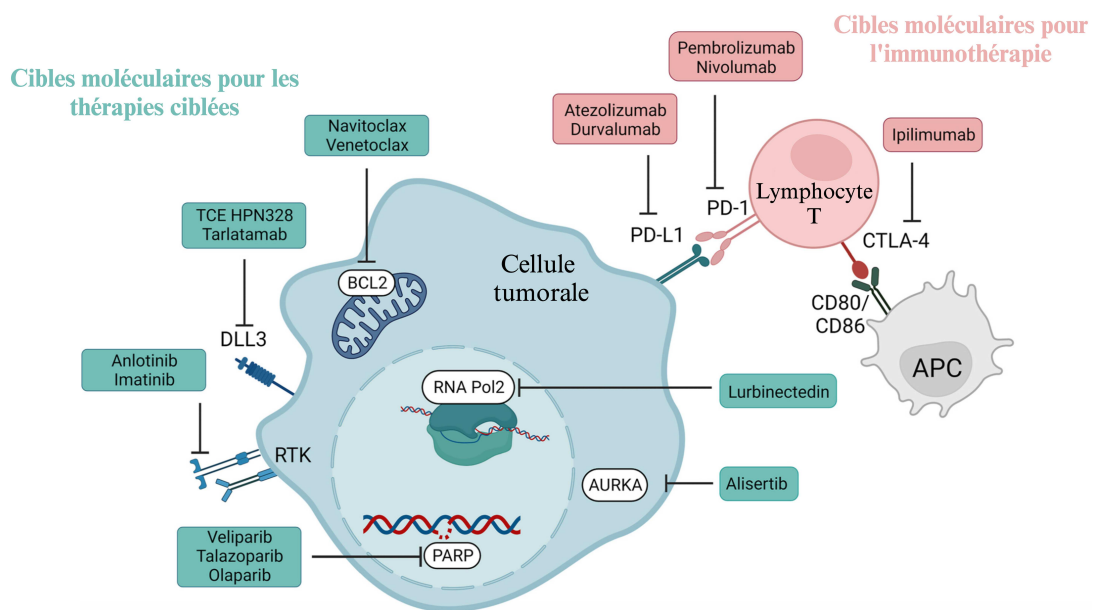


Figure 14 : Domaines d'intérêt thérapeutique actuels dans le CBPC (adaptée de Megyesfalvi et al., 2023). APC : cellule présentatrice d'antigène.

Jusqu'à présent, la mise en œuvre de thérapies ciblées dans le CBPC a échoué, et le succès de l'immunothérapie observé dans le CBNPC ne s'est pas encore entièrement reflété chez cette tumeur maligne. Cette absence de percée dans l'arsenal thérapeutique du CBPC est principalement attribuée à sa grande plasticité tumorale et à la non-sélection des groupes de patients lors du recrutement pour les essais cliniques. Par conséquent, la stratification des patients en fonction de leurs sous-types moléculaires dominants et les altérations spécifiques des protéines pourraient améliorer l'efficacité des nouvelles thérapies ciblées pour cette maladie difficile à traiter.

Étant donné que la chirurgie est rarement pratiquée pour le CBPC et que les petites biopsies ne reflètent souvent pas le profil d'expression complet de la tumeur, diagnostiquer les états moléculaires peut être complexe. L'analyse des composants tumoraux présents dans le sang, tels que les cellules tumorales circulantes, l'ADN tumoral circulant et les vésicules extracellulaires dérivées de la tumeur, pourrait offrir des alternatives pour surveiller les phénotypes moléculaires tout au long de la maladie et évaluer les biomarqueurs de réponse au traitement et de pronostic (Poirier et al., 2020).

Tableau 6 : Essais cliniques antérieurs et en cours évaluant la sécurité et l'efficacité des thérapies ciblées chez les patients atteints de CBPC (adapté de Megyesfalvi et al., 2023).

Nom de l'étude	Phase	Mécanisme d'action	Agent	Résultats
NCT02454972	2	Inhibiteur de l'ARN polymérase II	Lurbinectedin	ORR : 35,2% PFS : 3,5 mois OS : 9,3 mois
NCT01638546	2	Inhibiteur de PARP	Veliparib	ORR : 39% vs 14% (p = 0,016) PFS : 3,8 vs 2,0 mois (p=0,39) OS : 8,2 vs 7,0 mois (p=0,50)
NCT04334941	2	Inhibiteur de PARP	Talazoparib	En cours
NCT04728230	1/2	Inhibiteur de PARP	Olaparib	En cours
TAHOE (NCT03061812)	3	Conjugué anticorps-médicament ciblant DLL3	Rova-T	En cours
NCT04471727	1/2	Engageur trispécifique des cellules T ciblant DLL3/CD3	HPN328	Bien toléré En cours
ALTER1202 (NCT03059797)	2	Inhibiteur de tyrosine kinase	Anlotinib	PFS : 4,1 vs 0,7 mois (p<0,0001) OS : 7,3 vs 4,9 mois (p=0,029)
NCT00154388	2	Inhibiteur de tyrosine kinase	Imatinib	Critères d'évaluation principaux non atteints
NCT02038647	2	Inhibiteur de AURKA	Alisertib	ORR : 22% vs 18% (p = 0,406) PFS : 3,32 vs 2,17 mois (p=0,113) OS : 6,86 vs 5,58 mois (p=0,713)
NCT03366103	1/2	Inhibiteur de BCL-2 et mTOR	Navitoclax/Vistusertib	Terminé, problèmes d'approvisionnement en médicaments

Chapitre II. La Nétrine-3 comme nouvelle cible thérapeutique contre le cancer

I. La famille des Nétrines

1. Découverte et évolution

Les Nétrines constituent une famille de protéines très conservées au cours de l'évolution et apparentées aux laminines, qui sont les composants majeurs de la membrane basale des tissus épithéliaux. La première forme de Nétrine, appelée Uncoordinated-6 (Unc-6), a été mise en évidence en 1990 chez le nématode *Caenorhabditis Elegans* pour son implication dans le guidage des axones et la migration neuronale (Hedgecock et al., 1990; Ishii et al., 1992). Quelques années plus tard, Marc Tessier-Lavigne et son équipe ont réussi à isoler à partir d'embryons de poulet deux formes homologues de Unc-6, la Nétrine-1 (NTN1) et la Nétrine-2 (NTN2), du sanskrit *netr* « celui qui guide », capables de promouvoir la croissance des axones commissuraux (Serafini et al., 1994).

Depuis, plusieurs orthologues de Unc-6 ont été identifiés chez un grand nombre d'espèces notamment chez les Invertébrés comme la Drosophile (Nétrine A/B) (Harris et al., 1996), la sangsue (Nétrine) (Gan et al., 1999) ou encore l'anémone de mer (Nv nétrine) (Matus et al., 2006). Chez les Vertébrés, il a été découvert que les Nétrines forment une famille multigénique, composée d'une variété plus importante de protéines. En effet, comme mentionné précédemment, les Nétrines-1 et -2 ainsi que la Nétrine-4 furent décrites chez le poulet. Chez le poisson zèbre, les Nétrines-1a, -1b, -2 et -4 furent identifiées (Park et al., 2005), tandis que seule la Nétrine-1 fut découverte chez le xénope (de la Torre et al., 1997). Chez les mammifères tels que le rat, la souris et l'homme, les Nétrines-1, -3/NTN2L, -4, -G1 et -G2 ont été décrites (Rajasekharan & Kennedy, 2009). La Nétrine-2 n'est quant à elle pas présente chez les mammifères.

Il est également important de préciser que chez l'homme, les Nétrines-1 et -3 partagent une forte homologie de séquence, tandis que les Nétrines-4, -G1 et -G2 montrent des différences significatives et sont davantage apparentées aux laminines (**Figure 15**).

Plus récemment, un nouveau membre de la famille des Nétrines a été identifié, la Nétrine-5. Cette Nétrine est présente sous forme de trois isoformes (a, b et c) et n'existe que chez les mammifères, ce qui suggère qu'elle soit apparue plus tardivement que les autres protéines de la famille des Nétrines (Yamagishi et al., 2015).

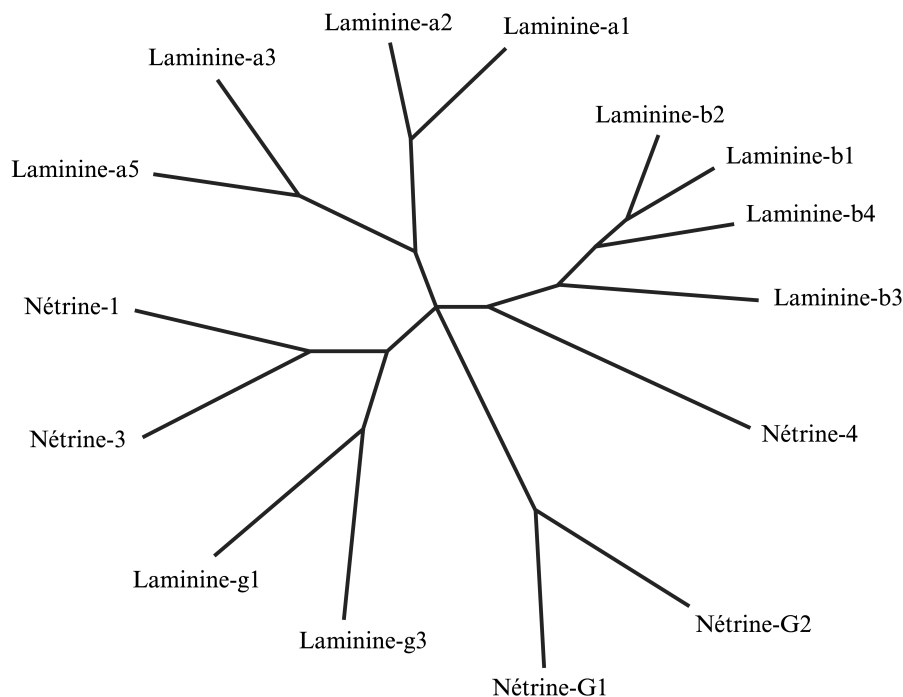


Figure 15 : Arbre phylogénétique illustrant la relation entre les membres de la famille des Nétrines et des laminines chez l'homme (adaptée de Rajasekharan & Kennedy, 2009).

2. Caractéristiques structurales des Nétrines

Les Nétrines ont une taille moyenne d'environ 600 acides aminés et pèsent entre 60 et 80 kDa. Elles sont des protéines sécrétées, à l'exception des Nétrines-G1 et -G2 qui sont ancrées à la membrane cellulaire *via* un GlycosylPhosphatidylInositol (GPI) à leur extrémité C-terminale (**Figure 16**).

D'un point de vue structural, les Nétrines sont composées de domaines fonctionnels spécifiques. Tout d'abord, les Nétrines sécrétées (-1, -3, -4) contiennent un peptide signal qui guide leur insertion et leur sécrétion à travers la membrane cellulaire. Il est situé à leur extrémité N-terminale. Cette extrémité se compose également d'un domaine VI et d'un domaine V, lui-même constitué de trois motifs du facteur de croissance épidermique (EGF). Chez les Nétrines-1 et -3, les domaines VI et V sont homologues aux chaînes γ des laminines, tandis que ceux de la Nétrine-4 sont apparentés aux chaînes β des laminines (Serafini et al., 1994). Les Nétrines-G1 et -G2 présentent, quant à elles, une homologie avec les chaînes γ et β mais sont plus proches de la laminine γ (Nakashiba et al., 2000; Yin et al., 2002). Ces domaines contribuent à la stabilité structurale des Nétrines, en facilitant leur bon repliement et jouent un rôle essentiel dans l'interaction de la protéine avec ses récepteurs transmembranaires canoniques de la famille Uncoordinated-5 (UNC5), Deleted in Colorectal Cancer (DCC) et la Néogénine (NEO). Pour les protéines sécrétées, ces domaines sont liés à une extrémité C-terminale, connue sous le nom de domaine C ou Netrin-like domain (NTR). Ce domaine ne présente aucune homologie avec les laminines mais dispose d'une richesse en acides aminés basiques et peut se lier à l'héparine (Kappler et al., 2000). De plus, ce domaine comporte le motif Arginine-Glycine-Acide Aspartique (RGD), une séquence reconnue par plusieurs membres de la famille des intégrines (Serafini et al., 1994). Le domaine NTR des Nétrines-G1 et -G2 n'est pas conservé mais la composition en acides aminés hydrophobes de leur terminaison C-term permet leur ancrage à la membrane plasmique *via* le groupement GPI.

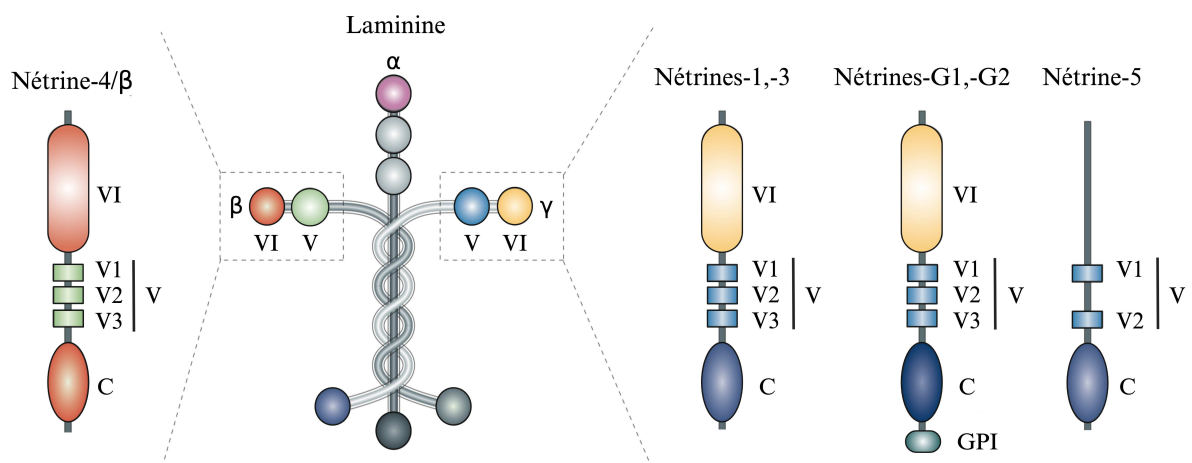


Figure 16 : Organisation structurale des Nétrines (adaptée de Cirulli & Yebra, 2007).

La Nétrine-1 est historiquement le membre le plus étudié de la famille des Nétrines, et sert de référence pour l'exploration des autres membres de cette famille, tels que la Nétrine-3 (NTN3), qui sera décrite plus en détail dans les paragraphes II et III de ce chapitre. Le profil d'expression spatio-temporel de la Nétrine-1 est désormais bien établi, montrant qu'elle est majoritairement exprimée dans le système nerveux central, mais également présente dans de nombreux tissus et organes, tant pendant le développement embryonnaire qu'à l'âge adulte. Cette pléiotropie résulte principalement de la diversité des récepteurs transmembranaires avec lesquels elle interagit, permettant à la Nétrine-1 de participer à une multitude de processus biologiques.

3. Les récepteurs de la Nétrine-1

3.1. Identification et définition du concept de récepteur à dépendance

Les récepteurs transmembranaires sont des protéines intégrées dans la membrane cellulaire, comportant une région extracellulaire destinée à se lier avec des molécules biologiques ou ligands, et une région intracellulaire qui assure la transduction du signal à l'intérieur de la cellule. Lorsque le ligand du récepteur est présent, il se lie à la région extracellulaire de celui-ci et induit un changement conformationnel, ce qui aboutit à l'activation de sa région intracellulaire et la transmission du signal. En l'absence du ligand, le récepteur transmembranaire reste inactif et ne transmet pas de signal intracellulaire. Dans certains cas, la signalisation induite par le récepteur est indispensable à la survie de la cellule. Son absence entraîne alors la mort cellulaire programmée, un processus parfois qualifié de « suicide cellulaire », qui fut longtemps associé uniquement à la perte d'un signal de survie positif.

En 1998, un nouveau concept de transduction du signal de mort cellulaire par apoptose est proposé par Patrick Mehlen et Dale Bredesen. Il suggère alors que ce signal « négatif » soit initié par des récepteurs transmembranaires particuliers, capables d'induire par un processus actif, l'apoptose des cellules en l'absence de leurs ligands respectifs. Ces récepteurs instaurent ainsi un état de dépendance cellulaire à la survie vis-à-vis de ce ligand, d'où leur appellation de « récepteur à dépendance » (Mehlen et al., 1998).

L'ensemble des récepteurs à dépendance est caractérisé par leur capacité unique à déclencher deux voies de signalisation distinctes en fonction de la présence ou de l'absence de leurs ligands

respectifs. En présence du ligand, ils induisent un signal positif favorisant la survie, la prolifération, la différenciation ou la migration de la cellule. En l'absence de leurs ligands, ces récepteurs ne demeurent pas inactifs et initient une voie de signalisation négative conduisant à la mort cellulaire par apoptose (**Figure 17**).

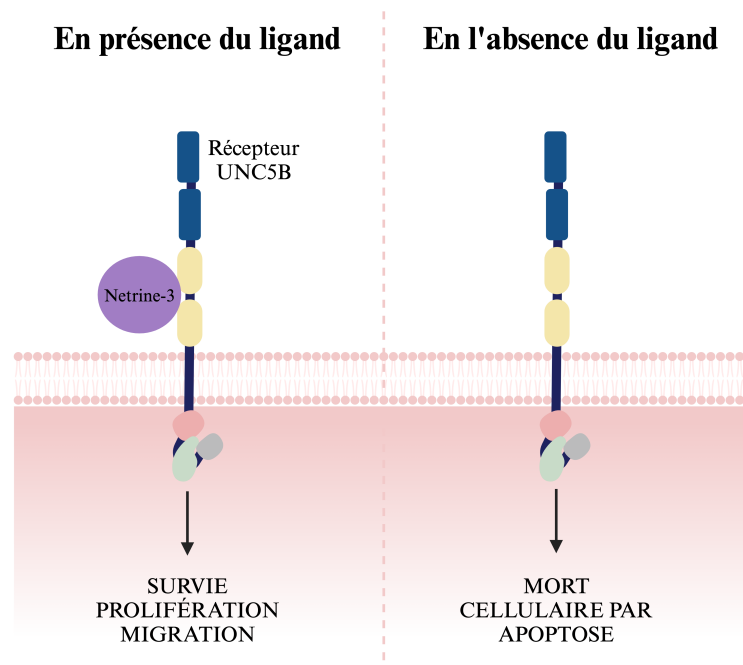


Figure 17 : Concept des récepteurs à dépendance.

Historiquement, le récepteur à la neurotrophine p75 ($p75^{NTR}$) fut le premier récepteur à dépendance identifié (Rabizadeh et al., 1993). Ce récepteur appartient à la famille des récepteurs de mort du facteur de croissance des Nerfs (NGF) et est impliqué dans plusieurs processus cellulaires clés, en particulier dans le système nerveux. Les travaux de Dale Bredesen et son équipe ont démontré que $p75^{NTR}$ active une voie de signalisation pro-apoptotique en l'absence du NGF, tandis que la présence de ce facteur est suffisante à inhiber ce signal. Cependant, d'autres études sur $p75^{NTR}$ ont tendance à soutenir un fonctionnement conventionnel de récepteur de mort cellulaire, qui déclencherait un signal pro-apoptotique en se liant à d'autres ligands que le NGF, tels que les peptides pro-NGF (Lee et al., 2001), la β -amyloïde (Yaar et al., 1997) et le prion (Della-Bianca et al., 2001). Ces résultats contradictoires, combinés au fait que le statut du récepteur à dépendance de $p75^{NTR}$ remet en question le dogme de la théorie neurotrophique (ou mort par défaut des neurones en l'absence de facteurs trophiques, comme mentionné précédemment), ont conduit à l'écartement de ce récepteur de la

famille des récepteurs à dépendance bien qu'aucune étude ne l'évince catégoriquement de cette famille.

C'est la biologie du récepteur DCC qui a ravivé le concept des récepteurs à dépendance. Découvert en 1990, DCC a initialement été caractérisé comme un récepteur transmembranaire putatif, codé par un gène fréquemment associé à une perte d'hétérozygotie dans les carcinomes colorectaux (Fearon & Vogelstein, 1990). Ce récepteur a ensuite été identifié comme le récepteur de la Nétrine-1 (Keino-Masu et al., 1996), alors connue pour son action attractive sur les axones commissuraux de la moelle épinière des Vertébrés. Des recherches ultérieures ont établi le rôle crucial du couple DCC/Nétrine-1 dans le guidage et la croissance des axones, et en 1998, la compréhension du fonctionnement de DCC en tant que récepteur à dépendance vis-à-vis de son ligand Nétrine-1 a été affinée (Mehlen et al., 1998).

Aujourd'hui, la famille des récepteurs à dépendance est décrite comme une famille fonctionnelle comprenant des membres très diversifiés sur le plan structurel.

3.2. Les membres actuels de la famille des récepteurs à dépendance

À ce jour, une vingtaine de récepteurs à dépendance ont été identifiés (**Figure 18**) parmi lesquels nous pouvons mentionner :

-Les récepteurs de la nétrine-1 : DCC, Uncoordinated 5 Homologs A, B, C et D (appelés UNC5H1, H2, H3 et H4 chez les rongeurs) (Llambi et al., 2001; Mehlen et al., 1998; Wang et al., 2008) et la Néogénine, qui lie également le ligand Repulsive Guidance Molecule (RGM). Il convient de noter que la Néogénine a été identifiée comme un récepteur à dépendance vis-à-vis de son ligand RGM, et non de la Nétrine-1 (Matsunaga et al., 2004)

-Les intégrines $\alpha V\beta 3$ et $\alpha 5\beta 1$, qui dépendent de leur liaison à la matrice extracellulaire (Stupack, 2005)

-Les récepteurs au morphogène Sonic HedgeHog (SHH), Patched-1 (PTC1) et cell-adhesion associated, oncogene regulated (CDON) (Delloye-Bourgeois et al., 2014)

- Les récepteurs à tyrosine kinase REarranged during Transfection (RET), Tropomyosin Receptor Kinase A and C (TrkA et TrkC), Ephrin type A receptor 4 (Eph4A), MNNG HOS Transforming gene (MET) et c-kit (Wang et al., 2018)
- Le récepteur Plexin-D1 dépendant de la Sémaphorine 3E (SEMA3E) (Luchino et al., 2013)
- Le récepteur Notch3 (Lim et al., 2017)
- Le récepteur Kremen-1 (Causeret et al., 2016)

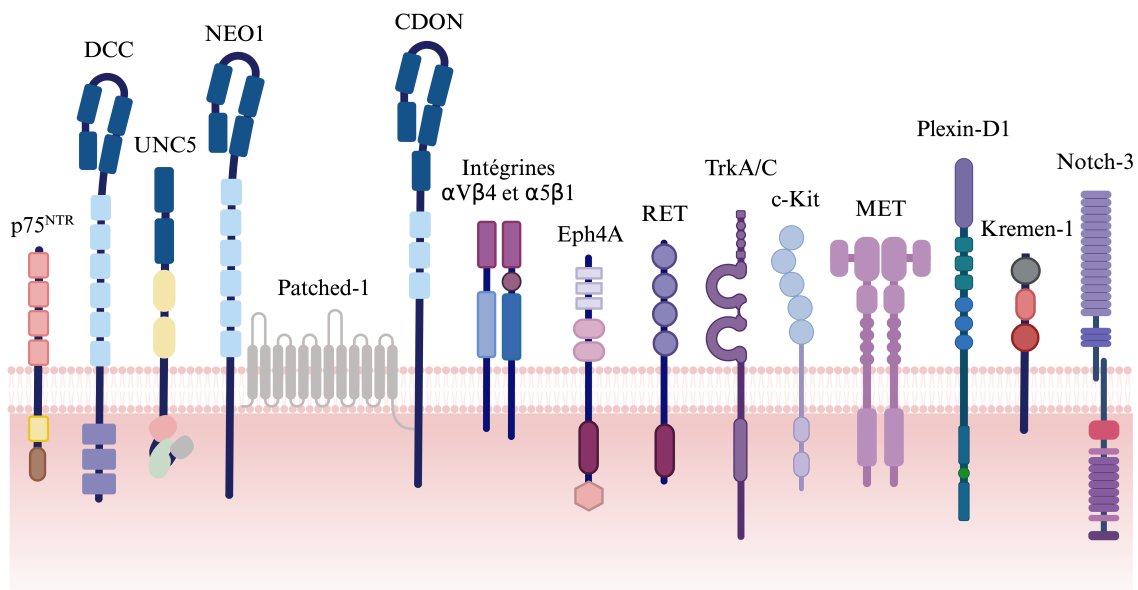


Figure 18 : Les membres actuels de la famille des récepteurs à dépendance

En dépit de leur diversité structurelle, ces récepteurs présentent une homologie fonctionnelle marquée, notamment en l'absence de leurs ligands respectifs. Cette dépendance vis-à-vis du ligand leur confère un rôle crucial dans le développement embryonnaire, ainsi que dans diverses étapes de la tumorigenèse, comme nous le détaillerons dans la partie I.4. de ce chapitre.

3.3. Les principaux récepteurs à la Nétrine-1

L'étude des récepteurs de la Nétrine-1 a été amorcée avant que celle-ci ne soit précisément identifiée. En effet, les premières investigations menées sur des mutants invalidés pour *Unc-6*, *Unc-5* et *Unc-40* chez *C. elegans* ont suggéré une corrélation entre ces trois gènes puisque leur invalidation a conduit à l'observation de phénotypes similaires (Hedgecock et al., 1990). Plus

tard, ces gènes ont pu être caractérisés et des études ont montré que *Unc-5* et *Unc-40* possèdent des orthologues chez les mammifères, à savoir les récepteurs de la famille UNC5 et le récepteur DCC, respectivement (Chan et al., 1996; Keino-Masu et al., 1996; Leonardo et al., 1997).

3.3.1 DCC

Comme nous venons de l'indiquer, le récepteur DCC a été identifié pour la première fois en 1990 et proposé en tant que gène suppresseur de tumeur lié à la délétion de son locus dans de très nombreux cancers du côlon (Fearon & Vogelstein, 1990). Ce n'est qu'en 1996, soit plusieurs années après leur découverte respective, que la relation entre le récepteur DCC et son ligand Nétrine-1 fut clairement définie (Serafini et al., 1994). Cette étude a révélé que la Nétrine-1 exerce un effet attractif sur les projections axonales des neurones commissuraux de la moelle épinière exprimant le récepteur DCC. Ce rôle a été confirmé par la génération d'un modèle murin comportant une délétion constitutive du gène *Dcc*. De manière similaire aux mutants *Ntn1* (Dominici et al., 2017; Yung et al., 2015), ces souris meurent quelques heures après la naissance (Fazeli et al., 1997).

DCC est une protéine transmembranaire de type I dont le domaine extracellulaire est composé de quatre domaines de type Immunoglobuline (Ig) et six domaines Fibronectine de type III. La liaison de la Nétrine-1 avec DCC s'établit au niveau des 4^{ème} et 5^{ème} domaines Fibronectine. Son domaine intracellulaire comprend trois régions conservées, nommées P1, P2 et P3, qui sont nécessaires pour la transduction des signaux par ce récepteur.

Lors du développement embryonnaire, DCC est majoritairement exprimé dans le système nerveux central (SNC) et n'est pas retrouvé dans le système nerveux périphérique (SNP*), à l'exception du ganglion sympathique cervical supérieur. Chez l'adulte, son expression est nettement plus faible et restreinte aux neurones dopaminergiques de la substance noire (Jasmin et al., 2021; Osborne et al., 2005) et aux régions dédiées à la neurogenèse (Gad et al., 1997).

Chez les Vertébrés, les voies de signalisation déclenchées par l'interaction entre la Nétrine-1 et son récepteur DCC ont principalement été étudiées dans le contexte des cônes de croissance axonaux. Dans ces structures dynamiques, l'interaction entre une molécule de guidage axonal et le récepteur transmembranaire DCC favorise une cascade de signalisations intracellulaires qui entraînent une réorganisation du cytosquelette. Ce changement du cytosquelette est

essentiel pour la réponse à la nature attractive ou répulsive de la molécule de guidage, en promouvant ainsi la croissance axonale vers la direction empruntée, ou en rétractant l'axone vers une nouvelle cible spécifique.

Lorsque la Nétrine-1 se fixe au récepteur DCC, elle provoque la dimérisation de ce dernier *via* son domaine intracellulaire P3 (Cirulli & Yebra, 2007). Ce changement conformationnel facilite l'interaction de DCC avec plusieurs protéines intracellulaires, dont les kinases tyrosines FAK et Fyn, entraînant la phosphorylation des sites tyrosines de DCC et favorisant ainsi la médiation de l'attraction axonale induite par la Nétrine-1 (Li et al., 2004).

Dans un contexte pathologique, et notamment cancéreux, la perte de ce récepteur procure un avantage sélectif pour le développement tumoral (Bernet & Mehlen, 2007; Shin et al., 2007). En effet, les souris transgéniques portant une mutation inactivant l'activité pro-apoptotique de DCC développent des adénocarcinomes invasifs (Castets & Mehlen, 2010). En outre, les souris mutantes pour le gène *Dcc* présentent des anomalies de prolifération des cellules lymphoïdes pouvant conduire à l'apparition d'un lymphome B diffus à grandes cellules (Broutier et al., 2016). Il est également important de noter que des mutations de délétion du gène *DCC* sont observées dans environ 50% des cancers bronchiques à petites cellules, ce qui suggère un rôle potentiel dans la pathogenèse de ce type de cancer (Kohno et al., 2000).

Outre la perte du récepteur, les tumeurs peuvent également tirer un autre avantage sélectif du gain d'expression autocrine du ligand, ce qui leur permet d'échapper à la voie de mort par apoptose induite par les récepteurs à dépendance. Une surexpression de la Nétrine-1 est constatée dans de nombreux cancers humains, y compris les cancers du sein métastatiques (Cassier et al., 2023; Fitamant et al., 2008), les cancers colorectaux (Paradisi et al., 2008), les cancers du poumon non à petites cellules (Delloye-Bourgeois et al., 2009a; Zhang et al., 2018b), les neuroblastomes (Delloye-Bourgeois et al., 2009b; Villanueva et al., 2021) ainsi que les mélanomes (Boussouar et al., 2020; Cassier et al., 2023).

3.3.2 Néogénine

La Néogénine est le deuxième homologue du gène *Unc-40* découvert chez les Vertébrés. C'est un récepteur transmembranaire multifonctionnel partageant 50% d'homologie avec le récepteur

DCC (Vielmetter et al., 1997). Son interaction avec la Nétrine-1 implique également les 4^{ème} et 5^{ème} domaines Fibronectine de la Néogénine (Keino-Masu et al., 1996).

Son profil d'expression diffère cependant de DCC car elle est faiblement exprimée aux stades précoces du développement du SNC, mais son expression augmente significativement dans les régions dites de maturation neuronale, notamment au niveau de la rétine, du bulbe olfactif et de l'hypothalamus (Gad et al., 1997; Wilson & Key, 2007). En dehors du SNC, la Néogénine est abondamment exprimée dans divers tissus d'origine mésodermique (Gad et al., 1997), dans l'intestin et les glandes mammaires (Srinivasan et al., 2003). Toutefois, les souris mutées pour l'expression du gène *Neol* ne présentent aucun phénotype particulier en ce qui concerne le guidage axonal et sont parfaitement viables (Bae et al., 2009).

Chez l'adulte, elle est exprimée de manière ubiquitaire (Enns et al., 2021; Meyerhardt et al., 1997). Outre son rôle dans le guidage axonal et la morphogenèse des tissus, la Néogénine est fortement impliquée dans la régulation de la croissance tumorale. Tout comme DCC, la perte de la Néogénine peut contribuer à la progression et la survie de certaines tumeurs, en particulier dans les cancers colorectaux et du sein (Chaturvedi et al., 2019; Hu et al., 2023; Xing et al., 2014).

3.3.3 La famille des récepteurs UNC

D'un point de vue structurel, les membres de la famille UNC5 sont des récepteurs transmembranaires de type I, très similaires, d'environ 110 kDa. Leur domaine extracellulaire inclut deux domaines Thrombospondine et deux domaines Immunoglobuline. Leur partie C-terminale intracellulaire comprend trois domaines distincts : un domaine Zona Occludens 1/Unc5 homology domain (ZU-5), similaire à celui des protéines de jonctions serrées Zona Occludens-1, un domaine Unc5-Pidd-Ankyrins (UPA), capable d'interagir avec le domaine intracellulaire P3 de DCC, et enfin un domaine de mort (DD). L'interaction avec la Nétrine-1 s'effectue entre les domaines Laminine de la Nétrine-1 et les domaines Ig des récepteurs UNC5 (Geisbrecht et al., 2003; Grandin et al., 2016; Kruger et al., 2004).

Les récepteurs UNC5H1, H2 et H3 sont fortement exprimés dans le SNC au cours du développement. Ils sont présents dans le cerveau embryonnaire, la rétine dorsale et le cervelet, ainsi que dans le tube neural en formation, plus particulièrement au niveau des motoneurones et de la plaque du toit (Ackerman et al., 1997; Leonardo et al., 1997). Contrairement à UNC5H1

dont l'expression est restreinte au SNC, les récepteurs UNC5H2, H3 et H4 sont exprimés à l'extérieur du SNC. Il a d'ailleurs été découvert que les récepteurs UNC5H2 et H4 sont respectivement exprimés lors de la mise en place du système vasculaire et de la glande mammaire (Engelkamp, 2002). De plus, une étude récente a montré que l'équilibre entre les récepteurs UNC5H2 et Néogénine, activés par la Nétrine-1, régule conjointement les voies de signalisation WNT et MAPK et favorise la pluripotence naïve des cellules souches embryonnaires murines et humaines (Huyghe et al., 2020). Chez l'adulte, l'expression des récepteurs UNC5H1, H2 et H3 diminue mais reste présente dans la moelle épinière (Manitt et al., 2004). En dehors du SNC, l'expression de ces récepteurs, notamment UNC5H2, semble être relativement ubiquitaire (Thiebault et al., 2003). Il est intéressant de noter que, tandis que l'inactivation des récepteurs UNC5H1 et UNC5H4 ne semble pas entraîner la mort des animaux mutants (Williams et al., 2006; Zhu et al., 2013), celle de UNC5H2 provoque une létalité embryonnaire au stade E12.5 (Lu et al., 2004) et celle de UNC5H3 entraîne une létalité néonatale dans les heures suivant la naissance (Burgess et al., 2006; Tai-Nagara et al., 2017).

En association à leur ligand Nétrine-1, les récepteurs UNC5 présentent un panel de fonctions variées. Ils agissent tout d'abord comme des facteurs de guidage axonal avec une activité répulsive (Ackerman et al., 1997; Przyborski et al., 1998). Cependant, dans la majorité des cas étudiés, cette répulsion nécessite la présence de DCC (Boyer & Gupton, 2018; Keino-Masu et al., 1996), bien qu'il apparaisse que cette répulsion puisse également se produire indépendamment du récepteur dans de rares cas (Cirulli & Yebra, 2007; Guijarro et al., 2006).

De la même manière que les autres récepteurs à dépendance, l'expression des récepteurs de la famille UNC5 est diminuée dans divers cancers humains tels que les cancers colorectaux, du sein, de l'estomac, du poumon, de l'ovaire, de l'utérus et du rein (Thiebault et al., 2003). Lorsque les gènes *Unc5* sont surexprimés dans différentes lignées cellulaires, on observe une forte inhibition de la croissance, une réduction de l'invasion et une induction de l'apoptose *in vitro*.

Il est également important de mentionner que les récepteurs UNC5 sont également connus pour interagir avec d'autres ligands, tels que Robo4 (Koch et al., 2011), la Draxine (Ahmed et al., 2011) et FLRT 2 et 3 (Yamagishi et al., 2011).

Enfin, la recherche de nouveaux récepteurs de la Nétrine-1 a permis d'identifier d'autres récepteurs, parmi lesquels on compte la Down-syndrome cell adhesion molecule (DSCAM)

(Liu et al., 2009), certaines intégrines (Stanco et al., 2009; Yebra et al., 2003), le récepteur adénosine A2b (Corset et al., 2000), le précurseur amyloïde (APP) (Rama et al., 2012) et la molécule d'adhésion cellulaire du mélanome (MCAM) (Tu et al., 2015) (**Figure 19**).

3.4. Les autres récepteurs de la Nétrine-1

3.4.1 DSCAM

DSCAM est un récepteur transmembranaire de type I qui appartient à la famille des N-CAM (Yamakawa et al., 1998) et joue un rôle crucial dans le développement du système nerveux. Ce récepteur possède dix domaines Immunoglobuline et six domaines Fibronectine III sur sa partie extracellulaire, alors qu'aucune homologie particulière n'est retrouvée sur son domaine intracellulaire.

Initialement, ce récepteur fut décrit pour sa contribution à des déficits cognitifs et à des anomalies de développement observés chez les personnes affectées de trisomie 21 (Yamakawa et al., 1998). Il est également décrit dans le contexte de diverses maladies neurologiques comme la schizophrénie et l'autisme (Schijven et al., 2024).

Durant le développement embryonnaire des Vertébrés, DSCAM est exprimé dans la majorité des régions du SNC (Yamakawa et al., 1998). En dehors de ce système, son expression est beaucoup plus rare, bien que présente dans le placenta et dans les structures dérivées des crêtes neurales en migration, telles que les ganglions pancréatiques et le système nerveux entérique. Ainsi, certains patients atteints du syndrome de Down sont également affectés par la maladie de Hirschsprung, caractérisée par une contraction permanente des muscles digestifs due à l'incapacité des crêtes neurales à coloniser une partie ou la totalité du côlon.

Deux études menées chez la souris et le poulet ont identifié la Nétrine-1 comme ligand de DSCAM (Liu et al., 2009; Ly et al., 2008). D'après ces deux études, l'affinité de DSCAM pour la Nétrine-1 est proche de celle observée pour DCC, et cette interaction permettrait le guidage des axones commissuraux vers et à travers la ligne médiane. Cependant, les mécanismes de signalisation intracellulaire engagés par le couple Nétrine-1/DSCAM restent inconnus. Chez les souris mutées pour l'expression du gène *Dscam*, une létalité néonatale est observée dans les 24h suivant la naissance des animaux, causée par une insuffisance respiratoire liée à une perte de fonction des neurones pré-inspiratoires (Amano et al., 2010).

3.4.2 Les intégrines $\alpha6\beta4$ et $\alpha3\beta1$

Les intégrines sont des protéines transmembranaires composées de deux sous-unités distinctes, alpha (α) et bêta (β), formant des hétérodimères fonctionnels. La sous-unité α contient un domaine de liaison au ligand extracellulaire tandis que la sous-unité β ancre la protéine à la membrane cellulaire et joue un rôle dans la signalisation intracellulaire d'adhésion, migration et/ou de prolifération (Hynes, 1992). Ce mécanisme sera décrit plus en détail dans le Chapitre III.

Lors d'une étude menée sur le développement du pancréas, il a été découvert que les cellules épithéliales pancréatiques sont capables d'adhérer à la Nétrine-1, présente dans la lame basale (Yebra et al., 2003). Cette adhésion est médiée par la liaison du domaine C de la Nétrine-1 avec les intégrines $\alpha6\beta4$ et $\alpha3\beta1$. Ces intégrines furent alors définies comme des récepteurs de cette protéine. Leur interaction favoriserait la migration des cellules épithéliales pancréatiques. De plus, il est pertinent de noter que le domaine C de la Nétrine-1 comporte des motifs RGD (Serafini et al., 1994), reconnus pour interagir avec certaines intégrines (Hynes, 1992). Plus récemment, des études ont démontré que la voie de signalisation Nétrine-1/intégrine $\alpha6\beta4$ pourrait réguler la croissance et la migration des cellules du cancer du sein (Yuan et al., 2020).

3.4.3 MCAM (CD146)

MCAM est une glycoprotéine transmembranaire de type I appartenant à la famille des Immunoglobulines. Son domaine extracellulaire est composé de cinq domaines Ig ainsi que plusieurs sites de N-glycosylation, qui stabilisent la structure de la protéine et favorisent ses interactions avec d'autres molécules.

Initialement identifié comme marqueur tumoral dans le mélanome (Sers et al., 1993), des études récentes montrent que le récepteur MCAM est également activement impliqué dans une variété de processus biologiques, tels que le développement, la migration cellulaire, la différenciation des cellules souches mésenchymateuses et la réponse immunitaire (Wang et al., 2020). De plus, MCAM est aujourd'hui reconnu comme un nouveau biomarqueur de l'angiogenèse et du cancer (Wang & Yan, 2013).

En 2015, une étude a démontré que la Nétrine-1 est capable de se lier au récepteur MCAM avec une bonne affinité, induisant l'activation des cellules endothéliales (Tu et al., 2015). La délétion du gène *Cd146* dans l'endothélium murin, ou la perturbation de l'interaction entre la Nétrine-1 et le récepteur par un anticorps anti-MCAM spécifique, réduit l'angiogenèse induite par la Nétrine-1. Chez les embryons de poisson zèbre, la réduction de l'expression de *Ntn1* ou *Cd146* entraîne des défauts vasculaires présentant une similarité importante (Tu et al., 2015). Des études complémentaires sont néanmoins nécessaires pour approfondir notre compréhension des fonctions biologiques associées à la signalisation Nétrine-1/MCAM.

3.4.4 APP

Le récepteur APP, souvent appelé récepteur de la protéine précurseur de l'amyloïde, est une glycoprotéine transmembranaire impliquée dans divers processus biologiques et est particulièrement étudiée dans le contexte de la maladie d'Alzheimer. Il a été démontré que la protéolyse du récepteur APP induirait la production du peptide amyloïde- β , dont l'accumulation forme des plaques caractéristiques de la maladie dans le cerveau des patients (Beyreuther et al., 1991; Kang et al., 1987). Quelques années plus tard, une étude a démontré qu'APP est un récepteur de la Nétrine-1, et que son interaction avec ce ligand activerait l'activité transcriptionnelle du récepteur, diminuant la production de l'amyloïde- β et atténuant ainsi les troubles cognitifs chez un modèle murin (Lourenço et al., 2009). Aujourd'hui, nous savons que le récepteur APP est capable de moduler la voie de signalisation induite par le récepteur DCC et la Nétrine-1 et que son recrutement est nécessaire pour l'élongation des axones commissuraux médiée par la Nétrine-1 (Rama et al., 2012). À ce jour, aucune étude n'a permis d'établir le rôle de l'interaction APP/Nétrine-1 dans les cancers.

3.4.5 A2b

A2b est l'un des quatre sous-types de récepteurs à l'adénosine appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) de classe A. Ce récepteur transmembranaire a plusieurs rôles physiologiques et pathologiques importants. Il régule notamment le tonus vasculaire en augmentant le niveau intracellulaire d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC), ce qui conduit à une relaxation des cellules musculaires lisses et donc à une vasodilatation. Dans une étude visant à identifier des partenaires de DCC, il a été démontré

qu'A2b interagit avec DCC (Corset et al., 2000). A2b a ainsi été défini comme un récepteur de la Nétrine-1, avec un rôle spécifique dans la régulation des niveaux d'AMPC, favorisant la croissance axonale. Bien que le récepteur A2b soit désormais connu pour ses fonctions dans la régulation de la prolifération et de la migration des cellules tumorales (Kasama et al., 2015; Sui et al., 2021; Vecchio et al., 2016), aucun mécanisme impliquant la voie de signalisation Nétrine-1/A2b dans le cancer n'a encore été identifié.

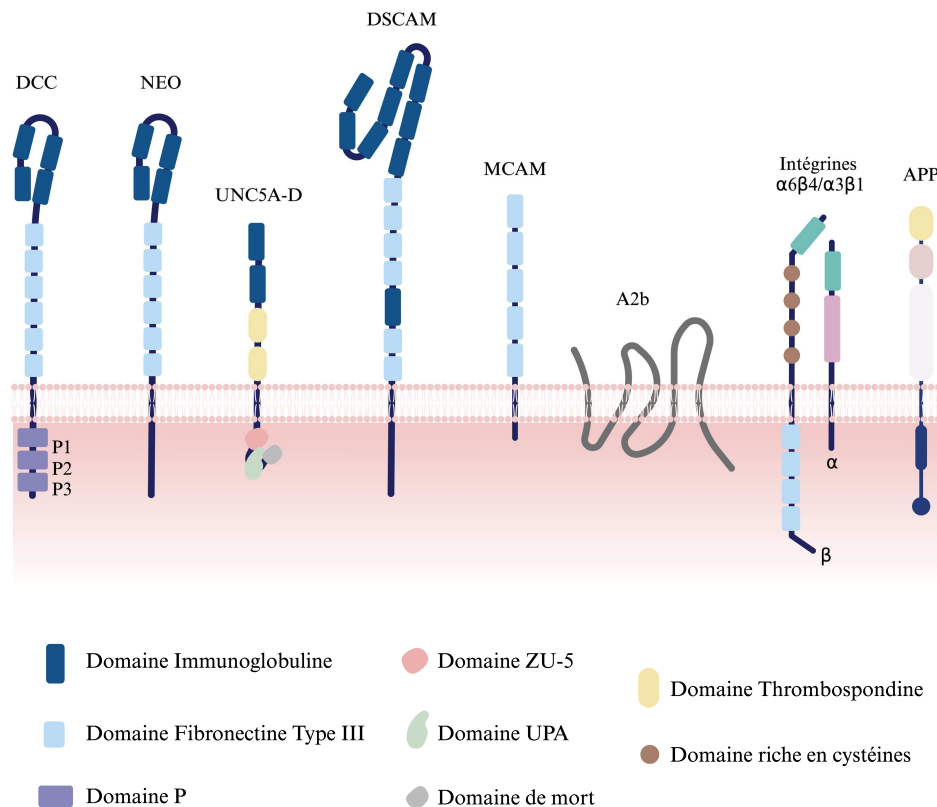


Figure 19 : Les récepteurs de la Nétrine-1.

4. Fonctions des Nétrines au cours du développement embryonnaire et chez l'adulte

4.1. La Nétrine-1

La Nétrine-1 a été largement étudiée pour son rôle dans le développement du système nerveux en tant que facteur de guidage axonal. Elle régule ainsi l'attraction (de la Torre et al., 1997;

Serafini et al., 1994), la répulsion (Colamarino & Tessier-Lavigne, 1995; Masuda et al., 2008), l'élongation des axones vers des sites spécifiques (Corset et al., 2000) et la synaptogenèse, assurant ainsi le bon développement des réseaux neuronaux qui sous-tendent les fonctions cognitives et motrices (Boyer & Gupton, 2018). Outre son rôle dans le développement du SNC, la Nétrine-1 est également décrite pour son implication dans la morphogenèse des organes comme la glande mammaire, où elle favoriserait l'agrégation cellulaire (Srinivasan et al., 2003). Elle permettrait aussi la différenciation fonctionnelle de la glande mammaire en vue de la lactation (Strizzi et al., 2008). La Nétrine-1 joue également un rôle dans la morphogenèse pulmonaire, où elle influencerait la croissance et la forme des bourgeons épithéliaux émergents (Liu et al., 2004). Par ailleurs, la Nétrine-1 contribue à la migration et à l'adhésion des progéniteurs pancréatiques (Yebra et al., 2003). Plus récemment, le rôle des facteurs de guidage neuronal dans l'angiogenèse a été mis en lumière. Ainsi, la Nétrine-1 a été décrite dans l'angiogenèse (Castets & Mehlen, 2010; Lu et al., 2004; Park et al., 2004). Le développement du SNC, la morphogenèse des organes branchés ainsi que l'angiogenèse sont des processus qui nécessitent des signaux extracellulaires pour guider les cellules. Dans ce contexte, la Nétrine-1 joue un rôle dans la régulation de l'adhésion et la migration cellulaire au cours de ces différents processus. Toutefois, d'autres mécanismes cellulaires sont également modulés par la Nétrine-1 tels que la pluripotence cellulaire (Huyghe et al., 2020; Ozmadenci et al., 2015) et la réponse immunitaire (Ducarouge et al., 2023; Mirakaj & Rosenberger, 2017).

Comme nous l'avons vu précédemment, la Nétrine-1 est aussi impliquée dans le contexte tumoral, où elle promeut la prolifération, la survie, la migration et la plasticité des cellules tumorales (Boussouar et al., 2020; Broutier et al., 2016; Cassier et al., 2023; Sung et al., 2019).

4.2. La Nétrine-4

Une combinaison d'expériences structurelles *in vitro* et *in vivo* a permis de démontrer que la Nétrine-4 se comporte différemment de son homologue Nétrine-1. En effet, la Nétrine-4 est plus proche des chaînes β de la laminine, d'où son nom de β -Nétrine. Dans le système nerveux, le profil d'expression de la Nétrine-4 semble être principalement limité à la rétine et au bulbe olfactif. Des expériences d'hybridation *in situ* et de localisation immunohistologiques ont montré que la Nétrine-4 est absente de la plaque du plancher et du ganglion spinal dorsal (DRG) pendant le développement et dans les tissus adultes. La Nétrine-4 est cependant retrouvée dans

les membranes basales du système vasculaire, du rein et des ovaires, ce qui fait supposer que la Nétrine-4 pourrait jouer un rôle important dans l'angiogenèse (Koch et al., 2000). Contrairement à la Nétrine-1 qui participe à la différenciation des ostéoclastes (Maruyama et al., 2016; Mediero et al., 2015), la Nétrine-4 serait impliquée dans la différenciation et la migration des ostéoblastes (Enoki et al., 2017).

Plusieurs études ont démontré que l'expression de la Nétrine-4 est modulée dans le cancer, notamment dans le cancer colorectal (Eveno et al., 2011) ou le cancer du sein (Yi et al., 2022). Cependant, son rôle reste aujourd'hui controversé car elle pourrait à la fois favoriser ou inhiber l'angiogenèse et la migration des cellules cancéreuses (Eveno et al., 2011; Lejmi et al., 2008; Nacht et al., 2009). Une autre étude a également rapporté que la Nétrine-4 pourrait promouvoir la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales lymphatiques (Larrieu-Lahargue et al., 2010).

Plus récemment, des chercheurs ont démontré que la Nétrine-4 n'interagit avec aucun des récepteurs de la Nétrine-1, tels que les récepteurs de la famille UNC5 ou DCC, et constitue un régulateur clé de la rigidité de la membrane basale (MB) grâce à sa forte affinité avec la chaîne γ des laminines (Mehlen & Fattet, 2021; Reuten et al., 2016). La Nétrine-4 se lie fortement à la laminine $\gamma 1$, bloquant ainsi efficacement la polymérisation du réseau de laminines de la MB et perturbant également les réseaux préexistants d'une manière non enzymatique. La MB est une fine couche de matrice extracellulaire, très flexible, qui participe au soutien des cellules et des tissus (Chang & Chaudhuri, 2019). Elle joue un rôle complexe dans la migration des cellules cancéreuses. Initialement, celle-ci sert de barrière mécanique que les cellules cancéreuses doivent franchir pour se disséminer. Afin de migrer, les cellules sécrètent alors des enzymes protéolytiques, telles que les MMP, capables de dégrader les composants de la MB. Les cellules cancéreuses possèdent des récepteurs spécifiques, tels que les intégrines, qui se lient aux composants de la MB. Ces interactions peuvent activer des voies de signalisation intracellulaire qui encouragent la migration et l'invasion des cellules tumorales, ce que nous détaillerons dans le Chapitre III. Les études sur l'expression de la Nétrine-4 dans les cancers sont contradictoires. Selon les pathologies, la Nétrine-4 est associée à un pronostic favorable (Esseghir et al., 2007; Yi et al., 2022) ou défavorable (Lv et al., 2015). Ainsi, l'expression de la Nétrine-4 pourrait favoriser ou inhiber l'invasion des cellules tumorales et la formation de métastases, selon le mécanisme de migration mis en jeu.

4.3. La Nétrine-5

La Nétrine-5 est le dernier membre de la famille des Nétrines à avoir été découvert et reste peu caractérisée. Elle semble être fortement exprimée dans les cellules des capsules frontières ventrales durant le développement embryonnaire (Garrett et al., 2016). Ces cellules sont localisées à l'interface entre le SNC et le SNP et jouent un rôle clé dans la formation et le maintien de ce dernier. La délétion du gène *Ntn5* chez la souris entraîne une modification de la migration des corps cellulaires des motoneurones, initialement responsables de l'activation des muscles et du contrôle des mouvements, en dehors de la moelle épinière. Il semblerait que la Nétrine-5 empêche la migration aberrante de ces corps cellulaires en dehors du SNC. Chez l'adulte, cette protéine semble être préférentiellement observée dans certaines zones neurogéniques du cerveau, comme le bulbe olfactif, la zone sous-ventriculaire et le gyrus denté de l'hippocampe (Yamagishi et al., 2015), laissant présager un rôle hypothétique dans la neurogenèse adulte. Des altérations de la neurogenèse hippocampique et du bulbe olfactif sont fréquemment observées chez les patients et modèles de rongeurs atteints de la maladie de Huntington (Ernst et al., 2014). Il serait donc intéressant d'étudier l'expression de la Nétrine-5 dans ces régions afin de savoir si elle pourrait jouer un rôle dans l'apparition de cette maladie.

4.4. Les Nétrines-G1 et -G2

Les Nétrines-G1 et -G2 jouent un rôle crucial dans la communication neuronale. En se liant à leurs ligands respectifs Netrin-G1 ligand 1 et 2 (NGL1 et NGL2) (Woo et al., 2009), elles favorisent la croissance des axones thalamo-corticaux (Lin et al., 2003), induisent et maintiennent la formation des synapses excitatrices (Kim et al., 2006) et contribuent à la segmentation subdendritique dans l'hippocampe et le cortex (Nishimura-Akiyoshi et al., 2007). De plus, l'expression anormale de ces Nétrines est associée à des phénotypes comportementaux chez la souris (Zhang et al., 2008) et à la schizophrénie, la bipolarité, l'épilepsie du lobe temporal et le syndrome de Rett chez l'homme (Aoki-Suzuki et al., 2005; Borg et al., 2005; Eastwood & Harrison, 2008; Ohtsuki et al., 2008; Pan et al., 2010).

Plus récemment, une étude a mis en évidence une forte expression de la Nétrine-G1 dans le carcinome épidermoïde pulmonaire associée à un mauvais pronostic chez ces patients (Hao et al., 2020). Plus tard, une nouvelle étude a révélé que la Nétrine-G1 est impliquée dans la

tumorigenèse des adénocarcinomes canaux pancréatiques (PDAC). En effet, une forte expression de cette protéine a été retrouvée dans les fibroblastes associés au cancer (CAF) et soutiendrait la survie des cellules tumorales en influençant le métabolisme du glutamate/glutamine. Son expression est ici aussi corrélée à un mauvais pronostic chez les patients atteints de PDAC (Francescone et al., 2021). Enfin, des scientifiques ont également démontré que la Nétrine-G1 modulait la résistance au cisplatine dans les cellules du cancer épithélial de l’ovaire (Fang et al., 2021) et favoriserait la prolifération et la migration des cellules de carcinome hépatocellulaire (Gao et al., 2024). D’après les données du Cancer Genome Atlas (TCGA), une expression faible de la Nétrine-G2 est quant à elle retrouvée dans les leucémies de l’adulte, dans les cancers du sein, du poumon, du côlon et dans les adénocarcinomes du pancréas. Néanmoins, aucune publication n’a jusqu’à présent rapporté le rôle de cette Nétrine dans les pathologies citées.

II. La Nétrine-3, une protéine de guidage axonal au cours du développement embryonnaire

Comme nous l’avons indiqué précédemment, la Nétrine-3 est le membre le plus proche en termes de séquence de la Nétrine-1 dans la famille des Nétrines chez l’homme, suggérant ainsi une possible convergence fonctionnelle entre ces deux molécules. En dépit de cette relation structurale et fonctionnelle potentielle, il est surprenant de constater que la Nétrine-3 n’a fait l’objet que de 7 publications dans la littérature scientifique actuelle. Dans ce manuscrit, nous proposons donc de résumer ces avancées de manière exhaustive, en mettant en lumière les découvertes clés concernant l’identification, la signalisation ainsi que les fonctions de la Nétrine-3 au cours du développement embryonnaire et chez l’adulte.

1. Identification et localisation chromosomique

En 1999, le groupe de Marc Tessier-Lavigne a isolé, cloné puis séquencé pour la première fois le gène codant la Nétrine-3 murine à partir de cerveaux de souris néonatales (Wang et al., 1999). Elle partage notamment un degré d’identité de 87,2% avec la protéine codée par le gène humain *NTN2L*. En revanche, elle présente un degré d’identité nettement plus faible avec la Nétrine-2 et la Nétrine-1 de poulet (71,6 et 52,4%, respectivement). Ces résultats suggèrent alors que le

gène murin *Ntn3* est l'orthologue strict du gène humain *NTN2L*, mais pas celui du gène *NTN2* chez le poulet, comme cela avait été démontré quelques années plus tôt pour *NTN2L* (Van Raay et al., 1997). Cette conclusion est également soutenue par la localisation du gène *Ntn3* dans la région proximale du chromosome 17 de la souris, qui correspond à la région 16p13.3 du chromosome humain où se situe le gène *NTN2L*.

2. Profil d'expression

Afin de déterminer la distribution régionale des différents transcrits du gène *Ntn3* au cours des premiers stades embryonnaires, des analyses par hybridation *in situ* ont été réalisées pour étudier l'expression de la Nétrine-3 murine sur des sections d'embryons de souris de E9.5 à E14.5 (Figures 20, 21 et 22).

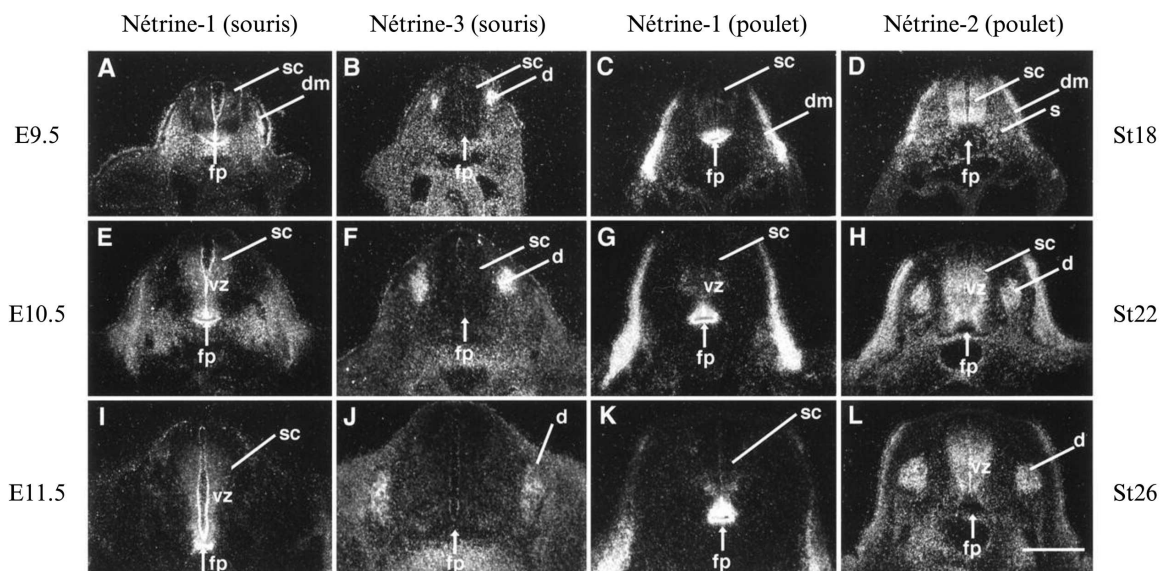


Figure 20 : Expression comparative de la Nétrine-1 murine (A, E, I), de la Nétrine-3 murine (B, F, J), de la Nétrine-1 de poulet (C, G, K) et de la Nétrine-2 de poulet (D, H, L) dans la moelle épinière embryonnaire par hybridation *in situ* (adaptée de Wang et al., 1999). Il convient de noter que le signal le long du bord de la zone ventriculaire et dans le canal central sur I et J est un effet de bord et ne constitue pas un signal réel. Sc : moelle épinière ; d : ganglion de la racine dorsale ; fp : plaque du plancher ; vz : zone ventriculaire ; dm : dermomyotome ; s : somite. Barre d'échelle : 0, 25 μ m.

Contrairement à la Nétrine-1 murine ainsi qu'à la Nétrine-1 et -2 chez le poulet, l'expression de la Nétrine-3 murine n'est pas détectée lors des premiers stades du développement de la moelle épinière (Figure 20A-H). En revanche, le signal le plus intense est observé dans les

ganglions de la racine dorsale (**Figure 20B-F**). Au stade E11.5, l'ARN messager (ARNm) de la Nétrine-3 murine est également détecté à de faibles niveaux dans la colonne motrice de la moelle épinière ventrale (**Figure 20J**). À tous ces stades de développement, aucun signal n'a été observé dans la plaque du plancher (fp) ou la zone ventriculaire (vz), deux régions où l'expression des gènes *Ntn1/NTN1* et *NTN2* est observée chez la souris et le poulet. Le signal de la Nétrine-3 murine dans la moelle épinière ventrale est maintenu à un faible niveau jusqu'au stade E14.5 (**Figure 21B-C et Figure 22D**). Au stade E9.5, l'expression de la Nétrine-3 murine, visualisée sur des coupes transversales au niveau des membres antérieurs, était la plus élevée dans les ganglions de la racine dorsale en condensation (**Figure 20A**). Cette expression persiste jusqu'au stade E12.5 (**Figure 21A-C**), puis diminue en intensité vers E14.5 (**Figure 21D**). Une expression faible de la Nétrine-3 murine dans les tissus mésenchymateux a également été observée à E9.5 et E10.5 (**Figure 21A**), avant de devenir plus marquée aux stades E11.5 et E12.5 (**Figure 21B-C**). À E14.5, l'expression de la Nétrine-3 murine est retrouvée dans les myotubes en cours de différenciation, de manière similaire à la Nétrine-1 (**Figure 21D-F**). Il est intéressant de noter qu'à ce stade avancé du développement, à l'exception de la moelle épinière, les profils d'expression de la Nétrine-1 et la Nétrine-3 murine sont très similaires, en particulier dans les muscles et les bronches (**Figure 21G-I**). Ce résultat suggère que les deux gènes pourraient avoir des fonctions similaires ou redondantes dans ces tissus à ce stade du développement.

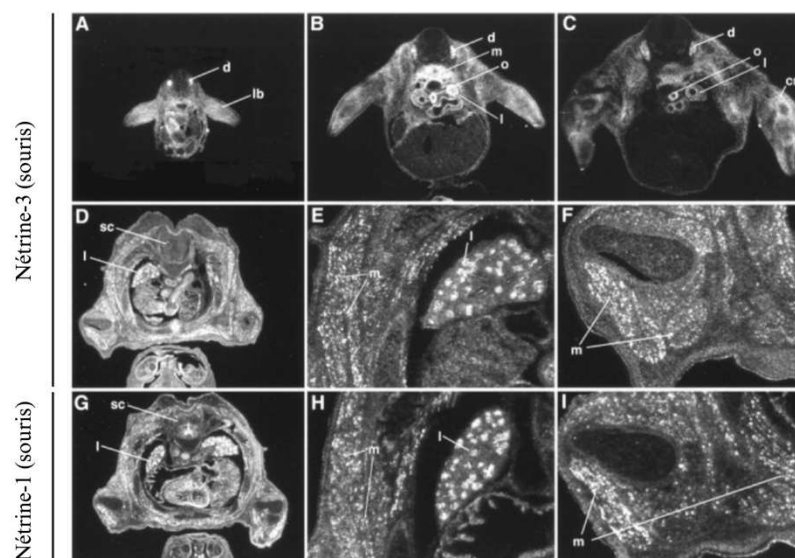


Figure 21 : Expression de la Nétrine-3 et de la Nétrine-1 à différents stades du développement chez l'embryon de souris (adaptée de Wang et al., 1999). A-C : Nétrine-3 murine à E10.5 (A), E11.5 (B), et E12.5 (C). D-F : Expression de la Nétrine-3 murine à

E14.5 dans des sections transversales (D), avec un grossissement plus élevé montrant l'expression dans le poumon (E) et dans les muscles (E, F). G-I : Expression de la Nétrine-1 murine à E14.5 dans des sections adjacentes à celles montrées en D-F, respectivement. Les motifs d'expression de la Nétrine-1 et de la Nétrine-3 sont similaires dans les muscles et le poumon. d : ganglion de la racine dorsale ; lb : bourgeon du membre ; o : œsophage ; cm : mésenchyme en condensation ; m : muscle ; l : poumon ; sc : moelle épinière. Barre d'échelle : 1,4 mm (A-D, G) ; 0,33 mm (E, F, H, I).

Dans la région de la tête, l'expression de la Nétrine-3 murine est la plus élevée à E9.5 dans le ganglion trigéminal (V) en cours de différenciation, le ganglion géniculé (VII), le ganglion vestibulaire (VIII), le ganglion glossopharyngien (IX) et les ganglions nodulaire et jugulaire (X) (Figure 22A). À E11.5 et E12.5, l'expression de la Nétrine-3 murine est également détectée dans le thalamus en développement (Figure 22C-D).

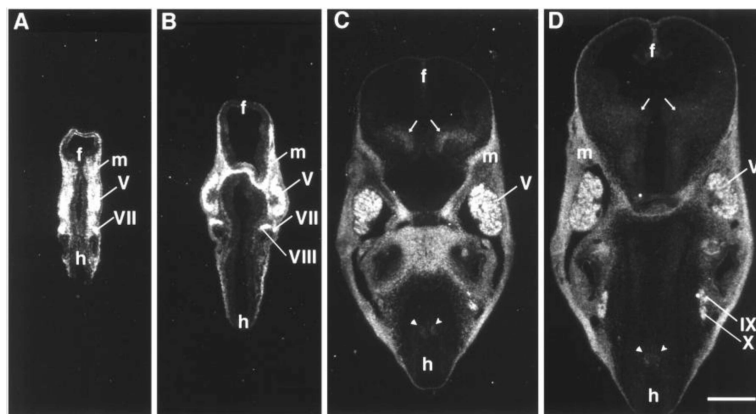


Figure 22 : Expression de la Nétrine-3 murine dans la région de la tête de l'embryon de souris aux stades E9.5 (A), E10.5 (B), E11.5 (C) et E12.5 (D) (adaptée de Wang et al., 1999). V : ganglion trigéminal ; VII : ganglion du nerf facial ; VIII : ganglion vestibulaire ; IX : ganglion glossopharyngien ; f : prosencéphale ; h : rhombencéphale ; m : mésenchyme ; flèches : thalamus ; têtes de flèche : signal positif dans la partie ventrale du tube neural dans le rhombencéphale. Barre d'échelle : 1,4 mm.

Un an plus tard, il a été montré chez la Drosophile que le récepteur de la Nétrine A nommé Frazzled réorganise activement la position de la protéine Nétrine A, entraînant une distribution de la protéine significativement différente de celle de l'ARNm de la Nétrine A (Hiramoto et al., 2000). En réponse à cette découverte, une nouvelle étude a été menée pour identifier les zones de localisation de la Nétrine-3 au sein de l'embryon de souris en utilisant une approche différente de celle employée par Wang en 1999. Pour établir le profil de localisation de la protéine Nétrine-3 au cours de l'embryogenèse, Clare Seaman et Helen Cooper ont donc

effectué une analyse immunohistochimique en utilisant un sérum anti-peptide ciblant un peptide unique N-terminal de la Nétrine-3 de souris. Aucun niveau significatif de la protéine Nétrine-3 n'a été détecté dans la moelle épinière précoce entre les jours embryonnaires E9.5 et E11.5. En revanche, des niveaux très faibles ont été observés entre E10.5 et E12.5 dans les ganglions de la racine dorsale (GRD), conformément aux schémas d'expression de l'ARNm précédemment rapportés (PuschelPüschel, 1999; Wang et al., 1999). Des concentrations élevées de protéine Nétrine-3 ont été observées dans les neurones moteurs du tube neural aux stades embryonnaires E13.5, E14.5 et E15.5. Par ailleurs, la protéine Nétrine-3 a été détectée dans les GRD à ces mêmes stades, avec une forte concentration dans la sous-population des grands neurones présents dans chaque ganglion. La localisation de la Nétrine-3 suggère donc qu'elle peut jouer un rôle crucial dans la fasciculation et le guidage des axones. De plus, une forte expression des récepteurs DCC et Néogénine a été détectée sur les axones projetés par les neurones sensoriels, ce qui confirme le rôle potentiel de la Nétrine-3 dans l'élaboration des trajets nerveux périphériques (Seaman & Cooper, 2001). Cette même année, Colleen-Manitt et ses collègues ont rapporté que, chez le rat, la Nétrine-3 est exprimée dans la moelle épinière embryonnaire mais n'est pas détectée à l'âge adulte (Manitt et al., 2001). Cette observation suggère une nouvelle fois que la Nétrine-3 pourrait jouer un rôle plus significatif dans le développement du SNP que dans celui du SNC.

3. Affinité de la Nétrine-3 avec les récepteurs à dépendance

Outre les différences observées dans les sites d'expression, il a été montré que la Nétrine-3 est capable de se lier à tous les récepteurs prototypiques de la Nétrine-1, incluant DCC, la Néogénine et les récepteurs de la famille UNC5 (UNC5H1, UNC5H2 et UNC5H3) (Wang et al., 1999). Cette découverte suggère que la signalisation médiée par la Nétrine-3 pourrait être transmise par l'intermédiaire de ces récepteurs, de manière similaire à ce qui a été décrit pour la Nétrine-1. Il a néanmoins été observé que la Nétrine-3 présente une affinité plus faible pour le récepteur DCC par rapport à la Nétrine-1 (Wang et al., 1999). Cette différence d'affinité pourrait indiquer que la Nétrine-3 murine possède une capacité moindre à promouvoir la croissance des axones commissuraux *via* le récepteur DCC. Toutefois, des études complémentaires seront nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

4. Propriétés fonctionnelles de la Nétrine-3 au cours du développement embryonnaire

En conditions *in vitro*, les chercheurs ont démontré que la protéine murine Nétrine-3 peut à la fois imiter l'activité promotrice de la croissance des axones commissuraux observée avec la Nétrine-1 et reproduire son effet répulsif sur les axones moteurs trochléaires (Wang et al., 1999). Il est donc pertinent de se demander si la Nétrine-3 pourrait être spécialisée dans les interactions avec les récepteurs de la Nétrine-1 autres que DCC *in vivo*, en particulier dans le cadre d'activités répulsives. L'exploration du phénotype de perte de fonction chez des souris mutantes pour le gène *Ntn3* devrait permettre de répondre à cette question et aider à déterminer son rôle spécifique dans le guidage des axones ainsi que dans le développement des tissus non neuronaux.

III. La Nétrine-3, une cible thérapeutique potentielle

Bien que les données sur les fonctions de la Nétrine-3 en dehors du système nerveux restent limitées, des recherches récentes ont commencé à révéler le profil d'expression de cette protéine ainsi que ses fonctions potentielles à l'âge adulte.

1. La Nétrine-3 comme suppresseur de douleur neuropathique diabétique (DNP)

La douleur neuropathique diabétique (DNP) est la complication invalidante la plus fréquente du diabète, touchant environ 30 % des patients (Feldman et al., 2017; Shillo et al., 2019). La DNP commence généralement par une hypersensibilité aux stimuli mécaniques et thermiques au niveau des pieds, avant de s'étendre progressivement aux parties proximales du corps sous forme de douleurs brûlantes, de picotements, de sensations électriques, de crampes ou de douleurs persistantes (Callaghan et al., 2012). La DNP réduit de manière significative la qualité de vie des patients, et il n'existe actuellement aucun traitement curatif pour cette maladie (Sloan et al., 2018).

Dans une étude parue en 2023, des scientifiques se sont intéressés à la compréhension moléculaire de l'apparition de la DNP (Pan et al., 2023). Ils ont notamment montré que la Nétrine-3 maintient son expression dans les neurones sensoriels primaires des ganglions de la

racine dorsale tout au long de l'âge adulte. L'ablation génétique du gène *Ntn3* chez les souris ne génère cependant pas de défauts développementaux ou comportementaux apparents. Cependant, dans un modèle murin de diabète, la déficience de *Ntn3* conduit à une augmentation marquée du bourgeonnement intra-épidermique des axones sensoriels, exacerbant ainsi la pathogénie de la SNP. En revanche, la surexpression du gène *Ntn3* au niveau des DRG bloque significativement le bourgeonnement aberrant des axones sensoriels et atténue la DNP chez les souris diabétiques.

Ces données mettent en évidence le potentiel de la Nétrine-3 en tant que cible thérapeutique innovante pour le traitement de la DNP. Il est donc crucial que des recherches futures se concentrent sur l'identification des récepteurs et des effecteurs en aval de la liaison de la Nétrine-3, afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents et de développer des thérapies ciblées basées sur cette molécule. Par ailleurs, il sera également intéressant d'explorer le rôle de la Nétrine-3 dans d'autres formes de douleurs neuropathiques, au vu des similitudes observées dans les modifications pathologiques des nerfs périphériques.

2. La Nétrine-3 comme indicateur pronostique et cible thérapeutique chez certains cancers

Le neuroblastome (NB) est la tumeur solide extracrânienne la plus fréquente chez l'enfant, représentant 7 à 8% de tous les cancers pédiatriques. Près de 90% des neuroblastomes surviennent chez les enfants de moins de 6 ans. Ce cancer prend naissance dans les cellules nerveuses immatures appelées neuroblastes, présentes chez le fœtus en développement. Il se développe généralement au niveau des glandes surrénales ou, moins souvent, dans d'autres parties de l'abdomen, du thorax, du cou et de la moelle épinière. La classification des neuroblastomes est basée sur divers critères prédictifs de leur évolution et détermine la stratégie thérapeutique à utiliser. La taille de la tumeur primaire, sa localisation et son extension générale (présence ou non de métastases) ainsi que loco-régionale sont ainsi pris en compte dans la classification. Les métastases se situent principalement dans les os, la moelle osseuse, le foie, les ganglions lymphatiques et moins fréquemment au niveau de la peau et du cerveau. De plus, l'âge du patient constitue un facteur clé dans l'évolution de la maladie. À stade identique, les nourrissons de moins d'un an présentent un pronostic plus favorable que les patients de plus

d'un an. Ces critères sont fondamentaux pour la stratification de l'International Neuroblastoma Staging System (INSS) (**Tableau 7**).

Tableau 7 : Classification des neuroblastomes selon l'INSS.

Stratification des neuroblastomes selon l'INSS	
Stade 1	Le cancer est localisé au niveau du site d'origine, sur un seul côté du corps. Exérèse macroscopiquement complète, même si un examen microscopique peut révéler la présence de cellules cancéreuses. Les ganglions lymphatiques à proximité de la tumeur ne sont pas atteints, bien que ceux situés à l'intérieur de la tumeur puissent être positifs.
Stade 2	2A : le cancer est toujours localisé au niveau du site d'origine et d'un seul côté du corps, mais toute la tumeur visible n'a pas pu être retirée par chirurgie. Les ganglions lymphatiques proches de la tumeur ne sont pas atteints. 2B : le cancer est d'un seul côté du corps avec exérèse complète ou incomplète. Les ganglions lymphatiques proches de la tumeur sont atteints mais le cancer ne s'est pas propagé aux ganglions lymphatiques de l'autre côté du corps ni ailleurs.
Stade 3	Le cancer ne s'est pas propagé dans les parties éloignées du corps mais l'un des cas suivants est vrai : -Le cancer ne peut pas être complètement retiré par chirurgie et a traversé la ligne médiane (définie comme la colonne vertébrale) pour atteindre l'autre partie du corps. Il peut s'être propagé aux ganglions lymphatiques voisins. -Le cancer est toujours dans la zone d'origine. Il s'est propagé aux ganglions lymphatiques relativement proches mais de l'autre côté du corps. -Le cancer se développe dans les deux côtés du corps.
Stade 4	Le cancer s'est propagé à des parties éloignées du corps, telles que les ganglions lymphatiques distants, les os, le foie, la peau, la moelle osseuse et d'autres organes. On parle aussi de neuroblastome métastatique. Le stade 4 ne comprend pas les tumeurs de stade 4S.
Stade 4S	L'enfant est âgé de moins d'un an. La tumeur est de stade 1 ou 2 et présente des métastases limitées au foie, à la peau et/ou à la moelle osseuse. Dans ce cas, moins de 10% des cellules de la moelle sont cancéreuses.

Des progrès significatifs ont été réalisés pour affiner cette classification, notamment grâce à l'identification de marqueurs biologiques des cellules cancéreuses associées à un pronostic favorable ou défavorable. Aujourd'hui, l'amplification de l'oncogène *MYCN* est l'un des principaux facteurs pris en compte par les cliniciens (Matthay et al., 2016). En effet, l'amplification du locus 2p24 (incluant *MYCN*) semble conférer un avantage prolifératif aux cellules cancéreuses, puisque ce gène code pour le facteur de transcription MYCN, capable de réguler l'expression des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et l'agressivité tumorale. Cette amplification est observée dans plus de 30% des tumeurs de neuroblastome au moment du diagnostic. Ainsi, sa surexpression est fortement associée à un mauvais pronostic chez les patients.

Étant donné que le neuroblastome affecte principalement des enfants en bas âge, les thérapies anticancéreuses peuvent entraîner des effets secondaires particulièrement graves. Il est donc

crucial de développer des outils de diagnostic fiables et non invasifs ainsi que des thérapies ciblées efficaces et peu toxiques pour les cellules saines.

Le laboratoire du Dr Patrick Mehlen est initialement connu pour ses recherches sur le rôle des récepteurs à dépendance au cours du développement embryonnaire et dans la tumorigenèse. Au cours des dernières années, les travaux menés au sein de l'équipe se sont principalement concentrés sur les récepteurs de la Nétrine-1, c'est-à-dire DCC et les récepteurs de la famille UNC5. Nous savons désormais que la signalisation induite par ce ligand et ses récepteurs favorise la survie et la prolifération des cellules cancéreuses. Des investigations sont actuellement menées pour évaluer l'efficacité clinique de l'inhibition de l'interaction entre la Nétrine-1 et ses récepteurs par un anticorps monoclonal humanisé contre la Nétrine-1, appelé NP137 (Grandin et al., 2016). Les résultats préliminaires d'un essai clinique de phase 1, réalisé sur des patientes présentant un cancer solide avancé, mettent en évidence une activité antitumorale prometteuse (Cassier et al., 2019).

Il se trouve que l'épitope reconnu par l'anticorps NP137 est fortement conservé chez la Nétrine-2 exprimée chez les oiseaux. Cette protéine a initialement été identifiée comme l'orthologue de la Nétrine-3 humaine, dont le profil d'expression et le rôle potentiel dans la cancérologie n'ont jamais été étudiés. Par conséquent, l'équipe a cherché à étudier l'expression de la Nétrine-3 dans le contexte tumoral. Ces travaux ont fait l'objet d'un projet de thèse mené par l'étudiante Shan Jiang ainsi que d'une publication dans le journal *EMBO Molecular Medicine* (Jiang et al., 2021, **Annexe 1**), à laquelle j'ai contribué lors de ma première année de thèse dans le cadre des révisions.

Nous avons tout d'abord étudié l'expression du gène *NTN3* au sein d'une cohorte de données de séquençage ARN de plus de 675 lignées cancéreuses humaines, regroupant 16 types de cancers différents. Nous avons découvert que le gène *NTN3* est principalement surexprimé dans les lignées neuroectodermiques et neuroendocrines, contrairement au gène *NTN1* qui est largement surexprimé dans la majorité des cancers. Plus précisément, une forte expression du gène *NTN3* est retrouvée dans deux pathologies spécifiques : le neuroblastome et le cancer du poumon à petites cellules. De plus, cette analyse a permis de mettre en évidence que l'expression des gènes *NTN3* et *NTN1* est mutuellement exclusive, puisque leur expression concomitante n'a été observée que dans seulement 0,015% des lignées cellulaires. Ce résultat

suggère qu'un événement sélectif pourrait être à l'origine de la haute expression du gène *NTN3* dans ces deux types de cancers neuroépithéliaux.

Nous avons ensuite étudié plus en détail l'expression du gène *NTN3* par réaction de polymérisation en chaîne quantitative après rétrotranscription (RT-qPCR) dans 181 échantillons de neuroblastome humain (Gibert et al., 2014). Cette étude a démontré que l'ARNm du gène *NTN3* est spécifiquement retrouvé dans les tumeurs avancées et hautement métastatiques correspondant au stade 4 de la maladie. Par ailleurs, les échantillons ont été regroupés selon l'amplification du gène *MYCN* afin de pouvoir comparer l'expression du gène *NTN3* entre les tumeurs associées à un bon ou un mauvais pronostic. Nous avons observé que l'expression du gène *NTN3* est corrélée à une survie globale réduite dans cette cohorte, avec une survie à 5 ans de 46,6% pour les tumeurs présentant des niveaux d'expression élevés du gène *NTN3*, contre 72,5% celles caractérisées par des niveaux plus faibles. Ceci suggère une fonction potentielle de la Nétrine-3 dans la progression et l'agressivité du NB.

Pour affiner la caractérisation moléculaire de ces tumeurs, nous avons réalisé une analyse d'enrichissement de gènes (GSEA) afin d'identifier les voies de signalisation associées à l'expression du gène *NTN3*. Nous avons démontré que les voies régulées par *MYCN*, ainsi que les signatures liées à l'instabilité génomique et au cycle cellulaire E2F et G2M, sont surexprimées dans les tumeurs caractérisées par une haute expression du gène *NTN3*. L'inhibition de l'expression du gène *MYCN* grâce à l'utilisation de small interfering RNA (siRNA) dans deux lignées de NB a permis de mettre en évidence que l'expression du gène *NTN3* est régulée par le gène *MYCN*. Ce résultat a également été confirmé par une analyse d'immunoprécipitation de la chromatine suivi d'un séquençage (ChIP-seq) de lignées cellulaires de NB. En effet, un site de liaison pour la protéine MYCN a été observé au niveau du promoteur du gène *NTN3*, corrélé à un spectre d'acétylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27ac) et de monométhylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me1), indiquant que le facteur de transcription codé par le gène *MYCN* contribue directement à l'activation de la transcription du gène *NTN3* dans le NB. Enfin, nous avons évalué l'effet de l'inhibition du gène *NTN3* *in vivo* en réalisant une xéno greffe de cellules de NB sur la membrane chloroallantoïdienne (CAM) d'embryons de poulet, un modèle bien établi pour étudier la croissance tumorale (Berthenet et al., 2020; Stupack et al., 2006). Les résultats ont montré que les tumeurs formées à partir des cellules inactivées pour le gène *NTN3* étaient significativement plus petites comparées aux contrôles.

De la même manière que pour le NB, nous avons cherché à comprendre le rôle de la Nétrine-3 dans le CBPC. Nous avons d'abord approfondi l'analyse de son expression en réalisant une analyse RNAscope sur des sections de tissus de CBPC fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE). Alors que la Nétrine-1 n'a été détectée que dans 10% des échantillons, la Nétrine-3 est retrouvée à un niveau élevé dans 90% des échantillons testés, confirmant notre observation précédente concernant leur profil d'expression exclusif. Nous avons ensuite effectué un criblage *in silico* des facteurs de transcription impliqués dans l'agressivité du CBPC et découvert que l'expression de la Nétrine-3 est associée à celle des facteurs de transcription NEUROD1 et ASCL1 (Borromeo et al., 2016). Ce résultat a été confirmé par l'analyse de données publiées de ChIP-seq, où nous avons identifié des sites de liaison spécifiques pour NEUROD1 et ASCL1 en amont du promoteur du gène *NTN3* dans les lignées cellulaires de CBPC (Borromeo et al., 2016; Huang et al., 2018; Robinson et al., 2011; Upton et al., 2020). Ces données montrent également que les sites de liaison sont centrés autour d'un large domaine d'H3K27ac qui englobe la région intergénique en amont du gène *NTN3*, ainsi que la majeure partie du corps du gène. Cela suggère que la liaison de NEUROD1 et ASCL1 à ce site est associée à l'activation transcriptionnelle du gène *NTN3*. Il est également important de noter qu'aucune liaison n'a été détectée au niveau du promoteur du gène *NTN1*. De plus, l'expression du gène *NTN3* est significativement diminuée lorsque les gènes *NEUROD1* et *ASCL1* sont silencés dans des lignées neuroendocrines de CBPC, indiquant que ces facteurs régulent directement le transcrit de la Nétrine-3.

Il est décrit dans la littérature que la Nétrine-1 favorise la progression tumorale en bloquant la mort cellulaire induite par DCC et UNC5B. Nous avons donc alors voulu savoir si la Nétrine-3 était capable de se lier aux récepteurs de la Nétrine-1 avec la même affinité. En raison des échecs de production de la Nétrine-3 recombinante humaine, les essais ont été réalisés avec la Nétrine-2 de poulet (chNTN2), longtemps considérée comme l'orthologue phylogénétique de la Nétrine-3 humaine. Les résultats montrent que la chNTN2 se lie aux récepteurs UNC5B et UNC5C avec une affinité très proche de celle de la Nétrine-1, tandis qu'elle interagit avec une affinité plus faible avec les récepteurs DCC, UNC5A et NEO1. La Nétrine-3 et la Nétrine-1 présentent une homologie de 75% en termes de conservation des protéines, et cette homologie atteint 90,1% pour la région de l'épitope reconnue par l'anticorps NP137. Grâce à la technologie d'interférométrie de bio-couche (BLI), nous avons non seulement démontré que le NP137 peut se lier à la chNTN2, mais qu'il est également capable d'inhiber l'interaction chNTN2/UNC5B de manière dose-dépendante. Enfin, nous avons évalué l'activité

antitumorale de cet anticorps chez des souris immunodéficientes xénotransplantées avec des cellules de CBPC appelées H82. Cette étude a montré que le NP137 induit une réduction significative de la croissance tumorale et une amélioration de la survie des animaux.

En conclusion, cette nouvelle étude révèle que :

- L'expression de la Nétrine-3 est spécifique aux lignées cellulaires neuroendocrines et neuroépithéliales.
- La Nétrine-1 et la Nétrine-3 sont mutuellement exclusives dans la grande majorité des lignées cancéreuses humaines.
- Une forte expression de la Nétrine-3 est corrélée à un pronostic défavorable dans le neuroblastome.
- Les facteurs MYCN, NEUROD1 et ASCL1 régulent la transcription du gène *NTN3*
- La Nétrine-1 et la Nétrine-3 pourraient potentiellement être ciblées par le même anticorps monoclonal thérapeutique.

Chapitre III. La dissémination métastatique, une étape clé dans la progression du cancer

I. Généralités sur le processus métastatique

Le développement de tumeurs secondaires dans une partie du corps éloignée du cancer primitif est appelé formation de « métastases ». Bien que les métastases soient l'un des principaux mécanismes responsables de l'échec des thérapies anticancéreuses et de 90% des décès liés au cancer, les mécanismes sous-jacents de leur formation restent aujourd'hui mal compris. La génération d'une métastase implique que des cellules cancéreuses quittent leur site primaire, circulent dans le sang ou la lymphe en résistant à la pression exercée dans les vaisseaux, s'adaptent à un nouvel environnement cellulaire dans un site secondaire et échappent aux attaques des cellules immunitaires (Maitra, 2019; Massagué & Obenauf, 2016). En 2011, Hanahan et Weinberg avaient alors défini l'activation de l'invasion et la formation de métastases comme l'une des caractéristiques fondamentales du cancer (Hanahan & Weinberg, 2011).

Le processus de dissémination englobe plusieurs étapes de la cascade métastatique, permettant aux cellules tumorales malignes de développer des caractéristiques fonctionnelles afin de se détacher de la tumeur primaire et de migrer vers des tissus éloignés (Lambert et al., 2017). Les cinq étapes clés de ce processus sont les suivantes :

-Invasion : processus par lequel les cellules tumorales se détachent de la tumeur primaire et migrent vers des tissus voisins. Cette étape nécessite un remodelage et/ou une dégradation de la matrice extracellulaire (MEC). Cette invasion implique généralement la migration collective de groupes de cellules (Friedl et al., 2012). Cependant, des reprogrammations cellulaires telles que la transition épithélio-mésenchymateuse peuvent également participer à la dispersion de cellules cancéreuses individuelles.

-Intravasation : une fois que les cellules cancéreuses ont envahi le stroma qui entoure la tumeur primaire, elles doivent pénétrer dans les vaisseaux sanguins ou dans les canaux lymphatiques. Les cellules tumorales doivent alors adhérer à l'endothélium

vasculaire afin de pénétrer à l'intérieur. Ce processus est médié par des interactions entre des molécules d'adhésion spécifiques à la surface des cellules tumorales et des récepteurs sur les cellules endothéliales.

-Circulation : cette étape désigne la circulation des cellules cancéreuses dans le sang ou la lymphe afin d'être transportées vers des sites distants. Bien que le temps de transit des cellules tumorales circulantes soit très faible, ces cellules sont soumises à divers obstacles physiques, notamment la perte d'adhésion au substrat ou le stress de cisaillement (Headley et al., 2016). En outre, les cellules cancéreuses en circulation sont vulnérables à une attaque immunitaire, en particulier par les cellules NK, qui les ciblent pour une élimination rapide.

-Extravasation : processus par lequel les cellules cancéreuses sortent des vaisseaux sanguins ou lymphatiques pour entrer dans les tissus environnants. Cette étape nécessite que les cellules traversent la paroi endothéliale par un processus appelé migration transendothéliale (Reymond et al., 2013). Néanmoins, d'autres mécanismes ont récemment été découverts tels que l'induction de la nécrose programmée (nécroptose) dans les cellules endothéliales, permettant la formation de métastases pulmonaires (Strilic et al., 2016).

-Colonisation : il s'agit de l'étape terminale de la cascade métastatique, où les cellules tumorales doivent s'ancrer dans un nouveau microenvironnement tissulaire, dépourvues des cellules stromales, des facteurs de croissance et des constituants de la MEC qui soutenaient précédemment leur survie et prolifération au niveau du site primaire. Afin de former une tumeur secondaire, les cellules doivent donc s'adapter à ce nouvel environnement pour continuer à proliférer. Parfois, des programmes de dormance cellulaire peuvent être activés par la présence ou l'absence de signaux dans le microenvironnement, permettant alors aux cellules de soutenir leur survie et échapper aux agents thérapeutiques (Giancotti, 2013; Sosa et al., 2014).

II. Implication de la Matrice Extracellulaire

1. Propriétés et caractéristiques

La matrice extracellulaire est une structure complexe constituée de centaines de protéines, offrant un soutien et un point d’ancrage aux cellules environnantes, aussi bien dans des conditions physiologiques que pathologiques (Hynes & Naba, 2012). En plus de leur rôle architectural, les protéines de la MEC émettent des signaux que les cellules interprètent et transmettent *via* des récepteurs de surface comme les intégrines (Charras & Sahai, 2014; Hastings et al., 2019). Elles ont également la capacité de se lier à des facteurs de croissance et de moduler leurs propriétés de signalisation. Les altérations de la MEC (composition biochimique, intégrité, propriétés mécaniques) sont d’ailleurs souvent associées à des maladies comme les fibroses, les maladies musculosquelettiques et cardiovasculaires (Bonnans et al., 2014; Iozzo & Gubbiotti, 2018) et interviennent aussi dans le cancer (Pickup et al., 2014; Theocharis et al., 2019). En effet, les observations cliniques ont montré qu’une augmentation de la quantité de MEC est associée à une plus grande agressivité des tumeurs et à un pronostic plus défavorable pour les patients (Bonnans et al., 2014; Boyd et al., 2007; Provenzano et al., 2008; Slattery et al., 2013). Bien que les modifications spécifiques de la MEC dans le contexte tumoral ne soient pas encore complètement élucidées, il est désormais évident que celle-ci joue un rôle déterminant sur l’ensemble des caractéristiques du cancer, incluant l’initiation, la progression et la formation de niches métastatiques (Høye & Ertler, 2016; Oskarsson, 2013; Pickup et al., 2014) (**Figure 23**).

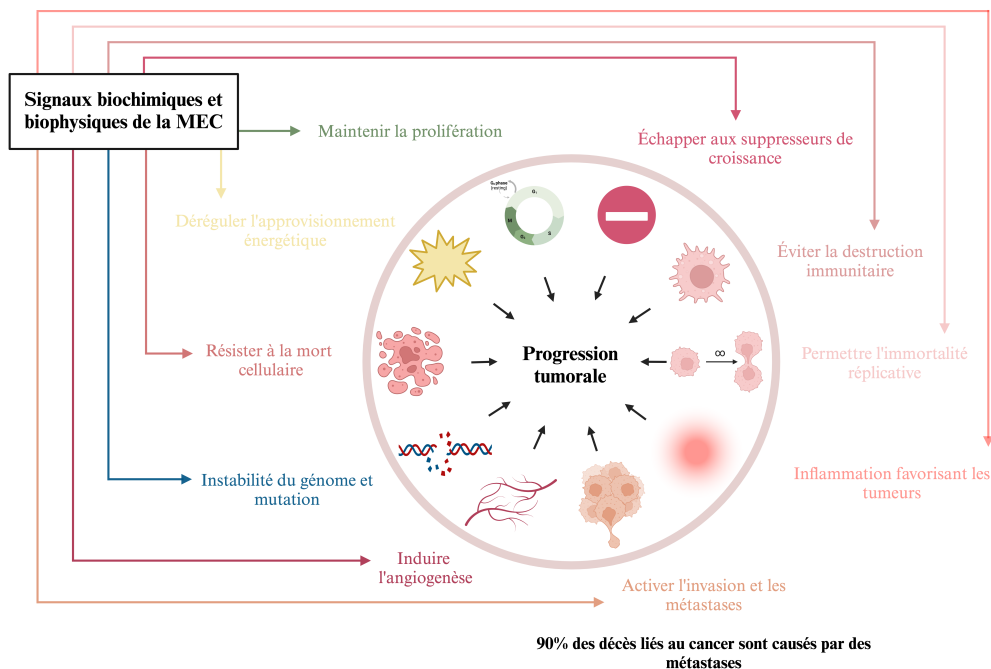


Figure 23 : Influence de la MEC sur les caractéristiques fondamentales du cancer (adaptée de Socovich & Naba, 2019).

Les caractéristiques physiques de la MEC, telles que sa rigidité, sa porosité, son insolubilité, ainsi que son agencement et son orientation spatiales, définissent son rôle dans le maintien de l'architecture et de l'homéostasie des tissus. Les propriétés biochimiques de la MEC déterminent quant à elles la manière dont elle transmet les signaux aux cellules, influençant leur interaction avec l'environnement et modulant divers processus cellulaires *via* des cascades de signalisation. La MEC est une entité très dynamique qui subit continuellement des modifications au cours des différentes étapes du développement embryonnaire et postnatal. Le remodelage de la MEC concerne trois aspects principaux :

- les variations dans la quantité des composants de la matrice, résultant de modifications de leur synthèse
- les changements dans la composition de la MEC, résultant de la dégradation sélective de certains éléments
- l'organisation spatiale des composants de la MEC, y compris leur agencement et leur interaction

La modification de l'un de ces trois paramètres peut engendrer des changements dans les propriétés de la MEC, affectant ainsi le tissu environnant et jouant un rôle déterminant dans la formation et la progression des cancers. Les cellules cancéreuses interagissent ainsi avec une MEC extrêmement rigide dans le microenvironnement de la tumeur primaire, tandis que les cellules cancéreuses qui se propagent vers des organes distants rencontrent une MEC très différente, aussi bien au niveau de la composition que de la rigidité de celle-ci (Romani et al., 2022).

2. Composition

La MEC est composée d'une variété de molécules biochimiquement distinctes regroupées au sein du matrisome, qui inclut des collagènes, des glycoprotéines, des protéoglycanes et des polysaccharides. Les variations des quantités relatives et de l'organisation des macromolécules dans la MEC ont donné lieu à une diversité structurale remarquable, chaque structure étant finement adaptée aux besoins fonctionnels des différents tissus. Les composants de la MEC constituent à la fois la membrane basale (MB), une fine couche de la MEC située entre les cellules épithéliales ou endothéliales et le tissu conjonctif. Ils forment également la matrice interstitielle, qui occupe l'espace entre les cellules dans les tissus conjonctifs.

2.1. Les collagènes

La famille des collagènes est le composant principal de la MEC et fournit à la fois une résistance mécanique et des signaux aux cellules et aux tissus. Des études indiquent que les collagènes constituent environ 90% de la MEC chez l'homme (Hynes & Naba, 2012; Naba et al., 2016). Ils sont majoritairement synthétisés par les fibroblastes. En effet, ces cellules sont présentes dans tous les tissus conjonctifs et sont capables de produire et sécréter les précurseurs du collagène (procollagène), qui sont ensuite modifiés et assemblés en fibres de collagène à l'extérieur de la cellule. À ce jour, 28 collagènes différents ont été identifiés, créant une composition unique de MEC dans les tissus (Ricard-Blum, 2011). Ces collagènes peuvent être divisés en deux sous-familles : les collagènes dits fibrillaires, à l'origine de la formation de fines structures filamenteuses, et les collagènes non fibrillaires ou formant des réseaux. La classe fibrillaire regroupe les collagènes de type I, II, III, V, XI, XXIV et XXVII et sont les composants principaux des matrices interstitielles. Les autres collagènes, tels que les types IV, VIII, X, XV et XVIII, forment quant à eux les membranes basales (Ricard-Blum, 2011). Le rôle clé du collagène IV dans la membrane basale a été démontré dans une étude menée par Pöschl en 2004. Ses recherches ont montré que la perte totale de collagène IV, obtenue par une délétion des gènes *Col4a1* et *Col4a2* dans un modèle murin, entraîne une létalité embryonnaire aux stades E10.5-E11.5. Ces observations ont mis en évidence que l'absence de ce collagène provoque une déstabilisation majeure des membranes basales, conduisant principalement à une dilatation des vaisseaux sanguins et des saignements cardiaques chez l'embryon (Pöschl et al., 2004). Les altérations significatives dans la composition et l'organisation des fibres de collagène sont associées à des modifications majeures des propriétés biomécaniques des tissus. De nombreuses études ont révélé que les collagènes sont souvent dérégulés dans les tumeurs solides (Pickup et al., 2014) et peuvent affecter la prolifération, l'invasion et la migration des cellules tumorales, notamment dans le cancer du pancréas (Chen et al., 2022; Madsen, 2021), du sein (Oskarsson, 2013) et dans le glioblastome (Tsai et al., 2021). Chez les patients atteints d'un CBPC, des résultats préliminaires ont montré la présence de niveaux plus élevés de collagènes de type III et XI dans le sérum des patients par rapport aux témoins sains (Thorlacius-Ussing et al., 2023). L'ensemble de ces résultats démontre que les collagènes dérivés de tumeurs jouent un rôle important dans la progression tumorale et la dissémination métastatique (De Martino & Bravo-Cordero, 2023).

2.2. Les glycoprotéines

Les glycoprotéines de structure sont des protéines auxquelles sont attachées de courtes chaînes glucidiques. Parmi les glycoprotéines les plus abondantes, on trouve les laminines, la fibronectine, la vitronectine, l'entactine, les ténaïscines, les thrombospondines, l'ostéonectine, ainsi que les glycoprotéines liées à l'élastine. Certaines d'entre elles, telles que la fibronectine, sont ubiquitaires, tandis que d'autres, comme les laminines des membranes basales, présentent des localisations plus spécifiques. En dépit de leur hétérogénéité en termes de structure, de taille et de distribution, ces glycoprotéines partagent des caractéristiques communes et possèdent plusieurs domaines structuraux et fonctionnels comme des sites d'interaction avec d'autres macromolécules extracellulaires ainsi que des sites de fixation aux cellules, *via* des intégrines ou d'autres récepteurs contenant le motif RGD, un élément présent notamment au niveau du domaine C des Nétrines. Dans cette section, nous nous focaliserons sur le rôle des laminines et de la fibronectine dans les cancers.

-Les **laminines** : les laminines sont de grandes glycoprotéines hétérotrimériques associées avec le collagène de type IV, les nidogènes, l'agrine et le pelécan au sein des membranes basales (Aumailley, 2013). Elles constituent les principales protéines non collagéniques des membranes basales. Comme mentionné dans le Chapitre II partie I.2, chaque hétérotrimère de laminine est composé d'une chaîne α , d'une chaîne β et d'une chaîne γ . Elles présentent une expression spécifique selon les cellules et les tissus et sont reconnues par les intégrines ainsi que par d'autres types de récepteurs (Arimori et al., 2021; Romagnoli et al., 2019). Les laminines modulent les phénotypes cellulaires et la différenciation, tant *in vitro* que pendant l'organogenèse *in vivo* (Yap et al., 2019). Au moins 16 isoformes de laminines sont présentes chez les mammifères et leur distribution est spécifique d'un tissu. Dans le cancer du sein, plusieurs isoformes de la laminine jouent un rôle crucial dans le développement de la maladie, comme la laminine-111, dont l'expression est souvent perdue, entraînant des altérations de la polarité cellulaire (Gudjonsson et al., 2002). D'autres laminines, telles que la laminine-332, pourraient favoriser la croissance tumorale des carcinomes épidermoïdes (Marinkovich, 2007). La sous-unité $\beta 3$ de la laminine, dont le gène code pour l'une des trois sous-unités de la laminine-332, augmente significativement les capacités invasives et métastatiques de certains types de cancer (Zhang et al., 2019a).

-La **fibronectine** : elle représente une glycoprotéine majeure de la MEC, indispensable au développement des Vertébrés. En effet, les souris mutées pour le gène fibronectine (*FNI*) meurent dès les premiers stades embryonnaires. Ce phénomène est causé par un déficit de migration des cellules embryonnaires inhibant la mise en place du mésoderme (George et al., 1993). Chez l'adulte, elle régule l'interaction entre les cellules et la matrice lors d'événements fondamentaux tels que la cicatrisation des plaies, la fibrose ou encore la progression tumorale. Des études antérieures ont montré que cette glycoprotéine favorise l'invasion et la migration des cellules tumorales en guidant et soutenant leur échappement de la tumeur primaire (Gopal et al., 2017). De plus, il a été démontré que la fibronectine est également capable de promouvoir la prolifération des cellules tumorales et d'empêcher l'apoptose dans le cancer de l'ovaire (Mitra et al., 2011).

2.3. Les protéoglycanes

Les protéoglycanes sont des molécules complexes composées d'une protéine centrale liée à des chaînes de glycosaminoglycanes (GAG). Ces disaccharides disposent de groupes carboxyle et sulfate qui confèrent une charge négative à ces molécules. Cette charge leur permet de se lier à divers cytokines et facteurs de croissance dans la MEC. Ils sont localisés dans les matrices des membranes interstitielles mais aussi dans les membranes basales. Environ 36 types de protéoglycanes ont été identifiés chez les mammifères, chacun ayant des fonctions bien spécifiques (Hynes & Naba, 2012). Ils participent à l'intégration des événements de signalisation cellulaire, avec des implications directes pour la carcinogenèse et la progression du cancer (Nikitovic et al., 2018; Pinho & Reis, 2015). Par exemple, des niveaux élevés de versican ont été relevés dans le cancer du sein et seraient associés à un risque élevé de rechute (Ricciardelli et al., 2002). La surexpression du protéoglycane glypican-3 (GPC-3) augmente la prolifération des cellules cancéreuses du foie *in vitro* et *in vivo* en renforçant la signalisation Wnt (Capurro et al., 2005).

3. Les protéines de l'adhésion cellulaire à la matrice

Environ 700 gènes du génome humain sont associés au matrisome, et codent des protéines qui influencent la régulation des fonctions de la MEC (Socovich & Naba, 2019). Les protéines associées à la matrice extracellulaire sont regroupées en trois catégories principales :

- les protéines « **sécrétées** » : englobent des facteurs de croissance, des cytokines et d'autres molécules qui se lient à la MEC
- les protéines « **régulatrices** » : composées de diverses molécules, telles que les protéases (MMP, héparanases, cathepsines) qui dégradent les composants de la MEC, les inhibiteurs de protéase ou encore les enzymes de réticulation (transglutaminases, lysyl oxydases) qui catalysent la formation de liaisons covalentes entre les protéines de la MEC. Dans le contexte tumoral, des changements dans l'activité de ces protéines entraînent un remodelage anormal de la matrice qui peut favoriser la dissémination métastatique (Yuzhalin et al., 2018)
- les protéines « **affiliées à la MEC** » : regroupent des molécules qui se lient à des structures rigides de la MEC, telles que les mucines, les lectines de type C, les glypicans et les syndécans, essentielles pour l'ancrage des cellules.

3.1. Le complexe cellulaire d'adhésion à la matrice (CMAC)

Les complexes d'adhésion cellule-matrice (CMAC) sont des points d'attachement des cellules à la matrice extracellulaire. Cette liaison est assurée par les récepteurs cellulaires à la matrice, tels que les intégrines, et par les protéines adaptatrices. Elle établit des connexions physiques et régulatrices entre la MEC et le système de microfilaments d'actine de la cellule. Pour cela, des récepteurs membranaires à la MEC s'accumulent dans les lamellipodes de la cellule, qui correspondent à des extensions de la membrane plasmique s'étendant vers l'avant de la cellule en migration. Ce processus initie la création de sites d'adhésion au sein des lamellipodes qui formeront par la suite des « adhésions focales », structures spécialisées qui permettent aux cellules de s'ancrer dans la MEC. En 2008, le chercheur John Lock a regroupé ces structures sous le nom de « complexes d'adhésion cellule-matrice », englobant les récepteurs à la matrice, les protéines du cytosquelette, des enzymes de signalisation cellulaire ainsi que leurs protéines adaptatrices (Lock et al., 2008). En plus de leur rôle crucial dans la migration cellulaire, ces structures participent aussi à la régulation de la survie, de la différenciation et de la prolifération des cellules.

3.2. Les récepteurs cellulaires à la matrice

Les intégrines sont une famille de glycoprotéines transmembranaires qui agissent comme principaux récepteurs et senseurs des signaux transmis par la MEC. Elles sont composées d'un long domaine extracellulaire muni d'une tête globulaire, un domaine transmembranaire ainsi qu'une queue cytoplasmique. Aujourd'hui, plus de 24 récepteurs hétérodimériques $\alpha\beta$ sont connus, chacun ayant des fonctions spécifiques et non redondantes. Ces fonctions ont principalement été déterminées par l'inactivation des gènes d'intérêt chez la souris, révélant des phénotypes distincts. Les intégrines se lient aux composants de la matrice *via* leur domaine extracellulaire, et aux protéines du cytosquelette et de signalisation grâce à leur queue cytoplasmique (Kanchanawong & Calderwood, 2023). Grâce à ces connexions, les intégrines fournissent donc des signaux chimiques et mécaniques à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule. Chez les mammifères, les intégrines sont retrouvées sous des combinaisons précises selon leur microenvironnement et leur ligand associé (**Figure 24**). Il est intéressant de noter que les intégrines $\alpha3\beta1$, $\alpha6\beta1$ et $\alpha7\beta1$ interagissent avec les laminines.

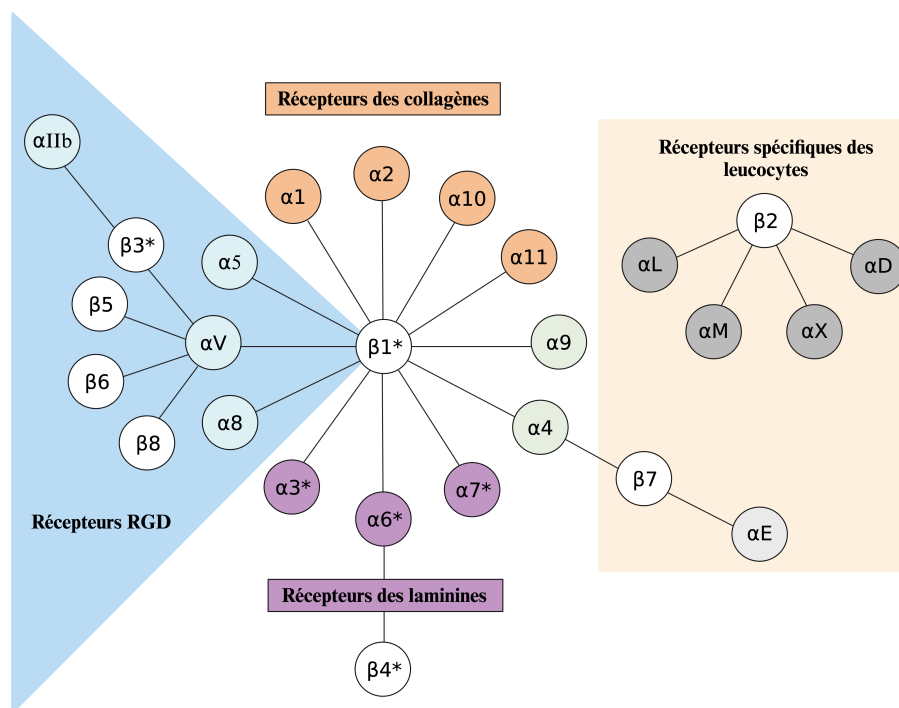


Figure 24 : La famille des intégrines (adaptée de Hynes, 2002). Les astérisques indiquent des domaines cytoplasmiques issus d'un épissage alternatif.

Les intégrines sont synthétisées et s'hétérodimérisent au sein du réticulum endoplasmique (RE). Elles subissent ensuite des modifications post-traductionnelles au sein de l'appareil de Golgi et sont transportées sous forme d'hétérodimères inactifs vers la membrane plasmique (**Figure 25**). Les intégrines reçoivent alors un signal appelé « outside-in », sous l'effet du Mg^{2+} extracellulaire (Tiwari et al., 2011) et des forces exercées par la MEC, qui induit un changement conformationnel (ouverture des sous-unités α et β de l'intégrine) ce qui permet son activation ainsi que le recrutement de protéines intracellulaires telles que FAK, taline, vinculine (VCL), formant les adhésions focales (Takagi et al., 2002). D'autres signaux, appelés « inside-out », régulent quant à eux le déplacement des inhibiteurs intracellulaires des intégrines et permettent la liaison de la taline aux queues β des intégrines, contrôlant ainsi de manière précise l'affinité des intégrines pour les ligands de la MEC. Les cellules s'ancrent alors et exercent une traction sur les fibrilles de la MEC, créant une tension intracellulaire. Cette tension entraîne une réorganisation du cytosquelette. Elle active les Rho-GTPases, générant des forces de traction importantes capables d'influencer la propagation, la croissance, la survie et la motilité des cellules dans le contexte physiologique et pathologique.

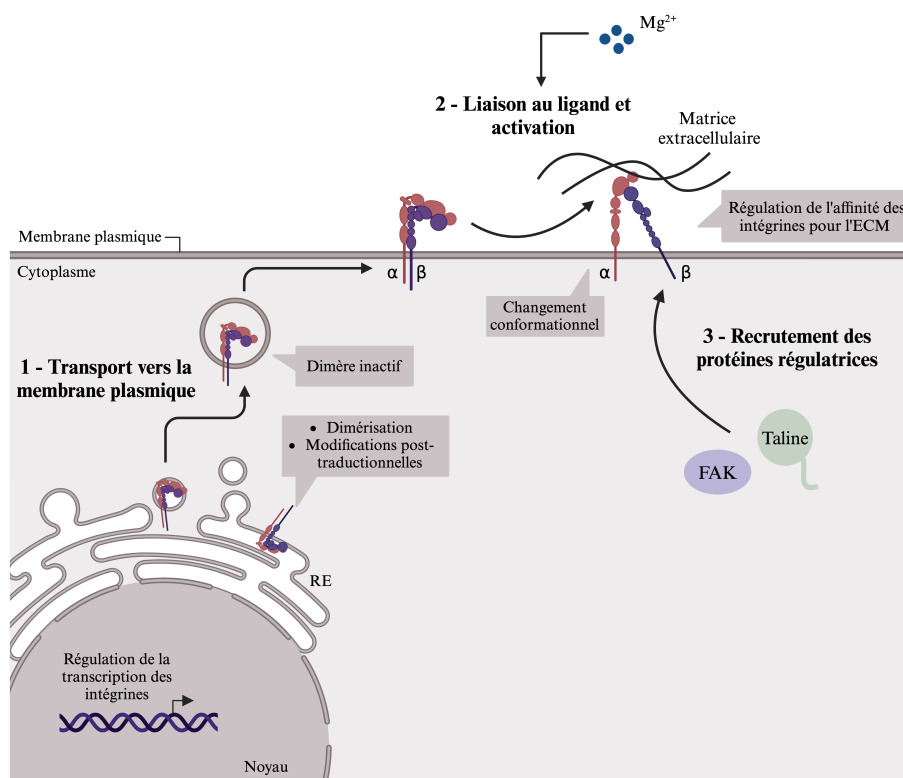


Figure 25 : Synthèse et activation « outside-in » des intégrines (adaptée de Kechagia et al., 2019).

Les syndécans sont également des récepteurs importants de la MEC. Ils constituent une petite famille de protéoglycanes transmembranaires largement présents chez les Invertébrés et les Vertébrés (Couchman, 2003). Il existe quatre membres de la famille des syndécans chez les mammifères, dont trois (syndécans-1 à -3) présentent une distribution tissulaire restreinte, tandis que le quatrième (syndécane-4) est exprimé de manière ubiquitaire (Morgan et al., 2007). Leur structure comprend une protéine centrale ancrée dans la membrane plasmique par un domaine transmembranaire. Cette protéine est reliée à des chaînes de glycosaminoglycanes, telles que l'héparane sulfate. Ces molécules agissent comme des récepteurs pour divers facteurs de croissance, mais elles jouent aussi un rôle crucial dans l'adhésion cellulaire en se liant à des protéines de la MEC telles que la fibronectine, la laminine et la vitronectine. Il a été démontré que la formation des adhésions focales dépend de l'interaction d'une intégrine spécifique de l'adhésion à la fibronectine (l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$) avec un protéoglycane de surface cellulaire (le syndécane-4) (Bloom et al., 1999). Le syndécane-4 se lie à la fibronectine *via* le sulfate d'héparane, ce qui stabilise l'interaction entre l'intégrine et la fibronectine. Ainsi, l'engagement du syndécane aide à l'assemblage et à la maturation des adhésions focales, structures essentielles pour l'ancrage des cellules à la MEC.

Outre les intégrines et les syndécans, d'autres récepteurs sont également impliqués dans l'adhésion cellulaire à la matrice. On peut citer notamment les Discoïdin Domain Receptor 1 et 2 (DDR1 et DDR2) capables de se lier aux collagènes, la layiline (Bono et al., 2001; Glasgow et al., 2022) ou encore CD44, récepteur du hyaluronate (Aruffo et al., 1990).

3.3. Les molécules associées au récepteur

Au sein des CMAC, les intégrines se regroupent et interagissent avec plusieurs protéines adaptatrices cytoplasmiques telles que les talines, la α -actinine, la vinculine, la paxilline, les protéines de la famille Src et FAK. Ces molécules assurent non seulement la connexion des intégrines au cytosquelette d'actine, mais elles jouent également un rôle crucial dans l'initiation des voies de signalisation intracellulaires.

3.3.1 Les protéines de liaison au cytosquelette

Parmi les molécules impliquées dans l'organisation des complexes d'adhésion, la vinculine joue un rôle crucial en interagissant directement avec la taline et la α -actinine. La taline, qui se présente sous forme de dimères antiparallèles flexibles, établit un lien physique entre les intégrines et le réseau d'actine. Quant à la α -actinine, elle assure la réticulation du cytosquelette en reliant les filaments d'actine, ce qui régule la rigidité et la structure des filaments d'actine dans le corps cellulaire (**Figure 26**).

3.3.2 Les protéines à l'origine de l'initiation des voies de signalisation intracellulaires

FAK joue le rôle de molécule adaptatrice dans les interactions protéine-protéine aux sites d'attachement des cellules à la MEC, participant ainsi à la formation de la structure de soutien des adhésions focales (McLean et al., 2005). Elle transmet également des signaux d'adhésion cellulaire et de croissance vers l'intérieur de la cellule, que nous détaillerons dans la partie III.3 de ce chapitre. Une kinase de la famille Src est alors recrutée au niveau de la membrane plasmique et se lie à FAK. Ceci entraîne des cascades de signalisation intracellulaires qui incluent l'activation des c-Jun N-terminal kinases (JNK), MAPK/ERK, PI3K/Akt et d'autres voies associées à la croissance et la migration cellulaire. Enfin, la paxilline (PAX) est également recrutée vers les sites d'adhésions focales où elle interagit avec des protéines du cytosquelette et d'autres kinases afin d'influencer la stabilité des complexes d'adhésion.

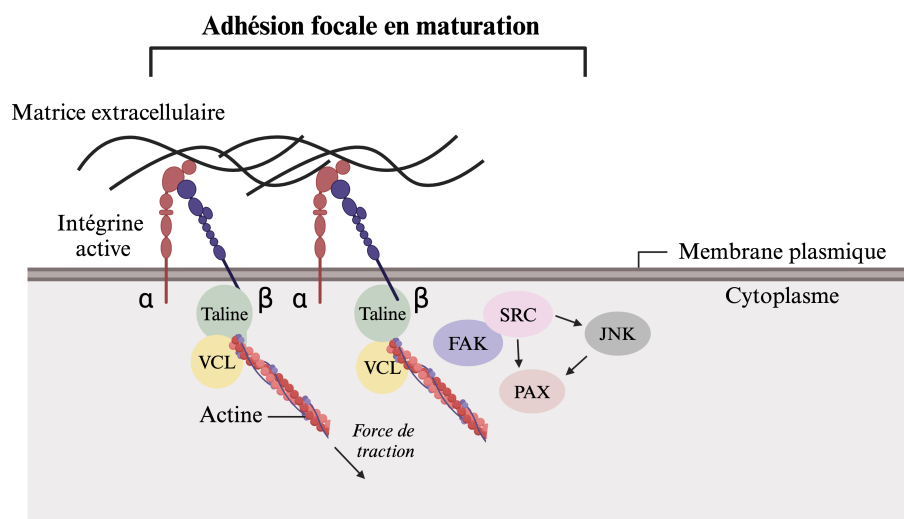


Figure 26 : Représentation schématique d'une adhésion focale en maturation (adaptée de Kechagia et al., 2019 et McLean et al., 2005).

4. Altérations de la MEC au cours du processus de dissémination métastatique

Il est largement reconnu que les interactions entre les cellules et l'altération du microenvironnement peuvent promouvoir la malignité. À l'inverse, les cellules tumorales sont capables de moduler leur microenvironnement pour favoriser leur survie, établissant ainsi une boucle de rétrocontrôle positif. La composition biochimique de la MEC dérivée des tumeurs diffère de celle de la MEC des tissus normaux. Des études ont démontré que le stroma tumoral est généralement plus rigide que le stroma normal et que le tissu du cancer du sein peut être jusqu'à 10 fois plus rigide que le tissu mammaire normal (Butcher et al., 2009; Kass et al., 2007).

Dans les cas de carcinome *in situ*, la membrane basale sépare les cellules tumorales du stroma. Cette barrière doit être franchie pour permettre à certaines cellules de s'échapper de la tumeur primaire et se disséminer vers les tissus adjacents. Des analyses d'imagerie ont révélé que la MB entourant les lésions précancéreuses présente un amincissement et une perte significative de la laminine-111, un composant majeur de la MB, suggérant donc un remodelage de la MEC (Gudjonsson et al., 2002). Le clivage et la dégradation des composants de la MEC est le processus principal de ce remodelage. Ils peuvent être réalisés par des protéases spécifiques telles que les métalloprotéases, les désintégrines et métalloprotéases (ADAM), ainsi que les désintégrines et métalloprotéases avec motifs thrombospondine (ADAMTS). De plus, certaines protéases clivent spécifiquement les résidus sérine, cystéine et thréonine. Ces protéases sont sécrétées principalement par les cellules stromales telles que les fibroblastes associés au cancer ainsi que par les cellules cancéreuses. D'autres mécanismes peuvent également faciliter la rupture ou le remodelage de la MB, indépendamment de la protéolyse réalisée par ces protéases. Par exemple, une étude a démontré que les CAF sont capables de modifier l'organisation et les propriétés physiques de la MB en exerçant des forces contractiles, rendant alors la MB permissive pour l'invasion des cellules cancéreuses (Glentis et al., 2017).

Une fois que les cellules tumorales ont envahi le parenchyme, leur dissémination métastatique est facilitée par le remodelage de la matrice extracellulaire interstitielle en faisceaux rigides et linéaires de collagène de type I, souvent enrichis en fibronectine (Miroshnikova et al., 2017). La réticulation du collagène est dépendante de la lysyl-oxidase (LOX), une enzyme principalement sécrétée par les CAF (Mohammadi & Sahai, 2018). Elle réticule de manière covalente les fibres de collagène par des résidus de lysine et d'hydroxylysine spécifiques,

généralisant une matrice plus rigide (Pankova et al., 2016). Ces trajets linéarisés de la MEC favorisent la migration dirigée des cellules tumorales vers les vaisseaux sanguins, où les cellules peuvent efficacement s'introduire dans la circulation (Han et al., 2016).

Après l'intravasation, les cellules tumorales rencontrent un environnement fluide radicalement différent de celui du site tumoral primaire. La majorité des cellules tumorales circulantes meurent dans les heures qui suivent l'intravasation en raison du stress de cisaillement hémodynamique, de l'attaque du système immunitaire et de l'anoïkis, une forme spécifique d'apoptose due à un défaut d'interaction entre la cellule et la matrice extracellulaire (Rejniak, 2016). Les CTC peuvent contourner l'anoïkis en augmentant l'expression de protéines impliquées dans la formation d'adhésions dépendantes des intégrines. Par exemple, l'expression de la fibronectine est augmentée dans les CTC du cancer du pancréas par rapport aux cellules tumorales primaires (Yu et al., 2012). Ce résultat suggère donc que les CTC peuvent sécréter des protéines spécifiques pour renforcer le signal de survie dépendant des adhésions aux intégrines.

Lors de l'extravasation, les CTC se bloquent dans les microcapillaires et s'associent aux cellules endothéliales vasculaires, où elles peuvent subir une migration transendothéliale. Les CTC peuvent être physiquement piégées au niveau des capillaires en raison de leur petit diamètre ou adhérer activement à l'endothélium *via* des récepteurs transmembranaires présents sur les CTC, les cellules endothéliales, les cellules immunitaires ou les plaquettes (Strilic & Offermanns, 2017). L'interaction entre l'intégrine $\alpha V\beta 3$ des CTC et la fibronectine plasmatique peut faciliter l'attachement des cellules tumorales à l'endothélium favorisant ainsi l'extravasation (Malik et al., 2010). Une étude a démontré qu'une expression accrue de fibronectine est fréquemment retrouvée sur la face luminale des vaisseaux sanguins hépatiques chez les patients atteints de cancer du côlon (Kai et al., 2019).

De récentes études ont montré que les tumeurs primaires conditionnent les sites métastatiques potentiels avant l'arrivée des cellules tumorales en sécrétant divers facteurs protéiques et lipidiques bioactifs capables de modifier le tissu distal pour créer un microenvironnement favorisant la rétention, la survie et la croissance des cellules tumorales disséminées. Ces modifications de la composition tissulaire concernent principalement la composition et l'organisation de la MEC et définissent ce que l'on appelle la niche pré-métastatique (Peinado

et al., 2017). Ainsi, les protéines sécrétées par les cellules tumorales primaires jouent un rôle clé dans la détermination du potentiel métastatique de la tumeur.

III. Implication de la voie de signalisation intracellulaire Focal Adhesion Kinase (FAK)

1. Caractéristiques de FAK

1.1. Généralités

La kinase d'adhésion focale (FAK) est une protéine tyrosine kinase ubiquitaire et cytoplasmique originellement identifiée au niveau des sites de regroupement des intégrines appelées les adhésions focales, qui sont proéminentes chez les cellules cultivées *in vitro* (McLean et al., 2005). FAK joue un rôle de régulateur multifonctionnel de la signalisation cellulaire dans le microenvironnement tumoral. Pendant le développement des organismes et dans divers types de cancers, elle favorise la motilité, la survie et la prolifération des cellules par des mécanismes dépendants et indépendants de son activité kinase (Sulzmaier et al., 2014).

1.2. Gène de FAK

La protéine FAK est codée par le gène protéine tyrosine kinase 2 (*PTK2*), localisé sur le chromosome 8q24.3 chez l'homme. Ce gène est largement exprimé dans la plupart des cellules humaines (Sulzmaier et al., 2014). La tyrosine kinase 2 riche en proline (PYK2), également appelée PTK2B, est un orthologue de FAK avec une similarité de séquences d'acides aminés d'environ 45%. Dans des modèles murins mutés pour le gène *Ptk2*, il a été démontré que PYK2 peut compenser certaines fonctions de FAK perdues (Lim et al., 2010).

1.3. Structure de FAK

FAK est une protéine de 125 kDa, dont la structure est très conservée au sein des espèces. Elle est constituée de trois principaux domaines : un domaine amino-terminal, un domaine carboxy-

terminal et un domaine central, responsable de l'activité catalytique de la protéine (**Figure 27**) (Cornillon et al., 2003). La région Focal Adhesion Targeting (FAT), située à l'extrémité C-term, est essentielle pour la localisation de FAK au niveau du complexe d'adhésion par l'intermédiaire de sa liaison avec la taline et la paxilline. La taline facilite l'interaction de FAK avec le réseau de filaments d'actine indispensable à son activation. Le domaine amino-terminal est composé d'une séquence homologue à la bande protéique 4.1/ERM (ezrine – radixine – moésine) correspondant au domaine FERM (F pour protéine). Ce domaine est impliqué dans les interactions avec les domaines cytoplasmiques des récepteurs transmembranaires (Schaller, 2001). La phosphorylation de la tyrosine 397 (Y397) est principalement réalisée par autophosphorylation. Cette modification crée un site de haute affinité pour le domaine SH2 de la kinase Src (et d'autres protéines contenant un domaine SH2), ce qui permet à Src de phosphoryler d'autres résidus tyrosine sur FAK, dont la tyrosine 925 (Y925).

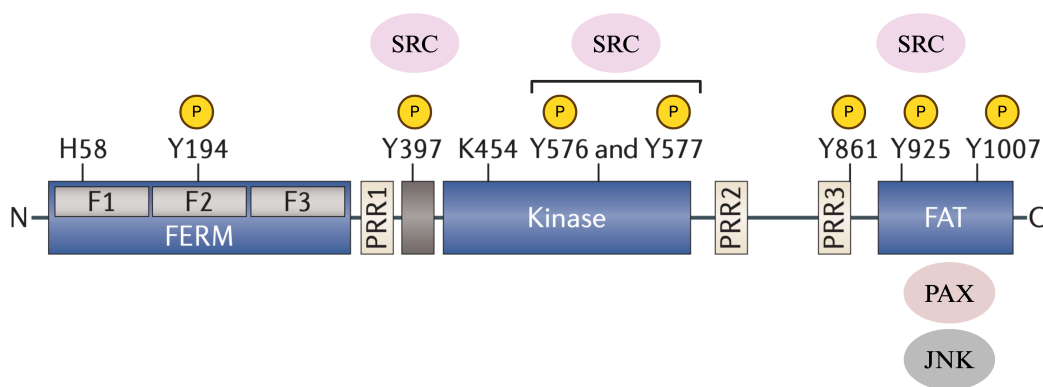


Figure 27 : Structure de FAK (adaptée de Sulzmaier et al., 2014). Certains partenaires de liaison sont représentés au niveau de leur site d'interaction avec FAK. PRR : régions riches en proline.

2. Activation de FAK

L'activation de FAK et la signalisation qu'elle engendre sont des processus complexes et finement régulés (McLean et al., 2005). FAK existe principalement sous une conformation inactive de monomères auto-inhibés. Cette forme inactive est maintenue par des interactions entre le domaine FERM et le domaine kinase de FAK, qui empêchent l'autophosphorylation de la tyrosine 397 (Lietha et al., 2007).

La signalisation médiée par les intégrines est l'un des principaux mécanismes responsables de l'activation de FAK. La liaison des intégrines à la matrice extracellulaire provoque un changement de conformation, passant d'un état « basal » à un état « activé ». Cette modification permet la formation de complexes d'adhésion focale avec d'autres protéines intracellulaires. Des protéines comme la taline ou la paxilline sont alors recrutées au niveau des intégrines activées. La taline se lie au domaine de la sous-unité β des intégrines, ce qui permet le recrutement de FAK au niveau de la membrane. Dès lors, l'interaction auto-inhibitrice entre les domaines FERM et kinase est levée, entraînant l'autophosphorylation de FAK au niveau du site Y397. Cette phosphorylation induit une modification conformationnelle de FAK libérant un site de liaison SH2 de haute affinité pour les membres de la famille Src. L'interaction avec Src permet la phosphorylation de FAK aux sites Y576, Y577 et Y925, nécessaire à l'activation complète de son activité kinase.

Les variations de force au niveau des adhésions focales peuvent entraîner l'activation de FAK et favoriser la phosphorylation de la paxilline, ce qui renforce l'interaction de celle-ci avec le cytosquelette d'actine. Ceci favorise alors le recrutement de la vinculine et la maturation des adhésions focales (Plotnikov et al., 2012).

3. Signalisation et fonctions induites par FAK

Dans un contexte non pathologique, FAK joue un rôle crucial dans la régulation de plusieurs processus cellulaires.

3.1. Au cours du développement

L'inactivation de FAK chez la souris entraîne une létalité embryonnaire très importante, liée notamment à des défauts majeurs dans les tissus mésodermiques et le système cardiovasculaire (Furuta et al., 1995; Ilić et al., 1995). En effet, une étude a rapporté que les souris KO pour l'expression de la protéine FAK présentent une anomalie dans la morphogenèse des cardiomyocytes ainsi qu'une hypertrophie ventriculaire (Peng et al., 2008). FAK est également impliquée dans l'angiogenèse et le développement des vaisseaux vasculaires dans les étapes tardives du développement puisqu'elle contrôle la stabilisation et le remodelage des cellules endothéliales (Shen et al., 2005). Chez les neurones, FAK fonctionne en aval des Nétrines pour

favoriser la croissance des neurites et le guidage des axones (Liu et al., 2004; Ren et al., 2004). Dans ces publications, les chercheurs ont mis en évidence que la Nétrine-1 induit la phosphorylation de FAK et DCC, révélant un nouveau mécanisme d'activation de la protéine FAK.

3.2. Dans les jonctions d'adhérence inter-cellulaires

Les jonctions adhérentes (JA) sont des complexes protéiques formés au niveau des contacts entre les cellules endothéliales ou épithéliales, composés de cadhérines, de caténines et d' α -actinine qui permettent le maintien de l'intégrité cellulaire au sein des tissus. En réponse à divers stimuli cellulaires, des protéines d'adhésion focales telles que FAK sont recrutées au niveau des jonctions adhérentes (Mui et al., 2016). Chez les cellules endothéliales, FAK se lie à la VE-cadhérine en réponse à la stimulation du facteur de croissance de l'endothélium (VEGF) ce qui entraîne le désassemblage des jonctions adhérentes (Chen et al., 2012).

FAK et Src peuvent également être recrutés au niveau des jonctions adhérentes des cellules épithéliales, où ils induisent un remodelage de l'actomyosine. Ce processus entraîne une relaxation de l'E-cadhérine et la translocation de la β -caténine vers le noyau (Gayraud et al., 2018).

3.3. Dans le noyau

En réponse à un stress chimique ou génétique, FAK peut être transloquée au niveau du noyau. Le résidu F2 du domaine FERM de FAK agit comme un signal de localisation nucléaire. En réponse au stress, FAK peut induire la dégradation protéosomale du suppresseur tumoral p53 (Lim et al., 2008). Il a également été démontré que la surexpression de FAK peut inhiber l'activité dépendante de p53 des protéines cibles p21, Mouse double-minute-2 (Mdm-2) et Bcl-2 associated X (Bax) (Golubovskaya et al., 2005). D'autres travaux ont démontré que FAK interagit également avec des facteurs de transcription comme YAP/TAZ, régulant ainsi l'expression des gènes impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire (Li et al., 2022).

3.4. Dans les endosomes

Le recyclage des intégrines se produit aux extrémités des cellules en migration. Il constitue un processus fondamental nécessaire pour la motilité des cellules par le biais de la formation des adhésions focales (Paul et al., 2015). Ce recyclage s'effectue par endocytose et dépend fortement de l'interaction de FAK avec la dynamine-2 (DNM2). Lors de cette liaison, FAK initie le désassemblage des adhésions focales et l'endocytose des intégrines. Une étude a montré que la forme activée de FAK sur la tyrosine 397 colocalise les intégrines $\beta 1$, la taline et les Rab-GTPases sur les endosomes précoces (Alanko et al., 2015). La taline permet le maintien de l'activation conformationnelle de l'intégrine en se liant à la queue cytoplasmique (Ginsberg, 2014). Par conséquent, l'activité de FAK confère une « mémoire conformationnelle » qui facilite le recyclage des intégrines activées et leur acheminement vers le bord de migration des cellules (Nader et al., 2016).

4. Rôles de FAK dans les cancers

Plusieurs études ont établi une corrélation entre l'expression de la protéine FAK et le cancer. Celles-ci rapportent que des niveaux d'expression importants de cette protéine sont retrouvés dans de nombreuses tumeurs solides localisées dans la thyroïde, la prostate, le col de l'utérus, le côlon, l'ovaire ou encore le poumon (Diaz Osterman et al., 2019; Guo et al., 2017; Johnson et al., 2008; Kessler et al., 2016; Xu et al., 2023; Zhang et al., 2016). Cette expression accrue est généralement associée à un pronostic défavorable pour les patients (Davidson et al., 2022).

En comparaison avec le cancer du poumon non à petites cellules (CBNPC), le cancer du poumon à petites cellules présente un degré de malignité plus prononcé et une propension accrue aux métastases dès les premiers stades de la maladie. Il est important de souligner que l'expression de FAK dans le cancer du poumon à petites cellules est considérablement augmentée par rapport aux autres types de cancer du poumon, ce qui indique une possible corrélation avec le degré de malignité ainsi qu'avec les capacités d'invasion et de métastase (Aboubakar Nana et al., 2019).

4.1. Migration et invasion

En réponse à des signaux chimio-attractants spécifiques, comme les facteurs de croissance, la cellule développe une polarité antéro-postérieure. Pour cela, elle doit réorganiser spatialement ses organites, notamment l'appareil de Golgi. Une étude a montré que les cellules dépourvues de la protéine FAK présentent une altération de l'orientation du Golgi vers le bord migratoire et une diminution de la formation des lamellipodes, principaux acteurs de la régulation de la contractilité et la polarisation cellulaire (Tomar & Schlaepfer, 2009). En effet, FAK est capable de phosphoryler des protéines adaptatrices qui vont ensuite permettre d'activer Rac1, une GTPase essentielle pour la formation des lamellipodes puisqu'elle stimule la polymérisation des filaments d'actine (An et al., 2023). FAK est donc un régulateur important de la migration cellulaire, une fonction clé pour l'invasion des cellules cancéreuses. Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'invasion tumorale est caractérisée par la pénétration de cellules cancéreuses à travers la MEC et dans le tissu voisin, ce qui nécessite une augmentation de la motilité cellulaire, des altérations de la dynamique des adhésions focales, ainsi qu'un remodelage de la MEC. FAK régule de manière dynamique les adhésions liées aux intégrines (ou adhésions focales), les adhésions cellule-cellule dépendantes des cadhérines et les structures périphériques d'actine, contribuant ainsi à la migration et à l'invasion des cellules cancéreuses.

Cependant, son mécanisme d'action est complexe. De récentes études ont démontré qu'en fonction de l'environnement et du contexte spatio-temporel, FAK peut à la fois promouvoir mais aussi inhiber la migration cellulaire. Comme nous l'avons dit précédemment, la signalisation de FAK permet l'assemblage des adhésions focales *via* les intégrines, ce qui favorise l'adhésion cellulaire à la MEC. Néanmoins, la migration cellulaire nécessite également le renouvellement, ou le désassemblage de ces adhésions. FAK contrôle aussi ce processus, en libérant spécifiquement les points de contact entre la cellule et la MEC environnante (Ren et al., 2000). Quelques années plus tôt, Scott et ses collègues ont comparé des lignées de mélanome adhérentes et non-adhérentes et ont mis en évidence une diminution de l'activité de FAK dans les lignées métastatiques (non-adhérentes) par rapport aux lignées adhérentes (Scott & Liang, 1995). Une autre étude a également démontré que chez diverses cellules de carcinome humain surexprimant l'EGFR, le traitement par EGF induit une déphosphorylation rapide de FAK, associée à une diminution de son activité kinase. Cette régulation induit des changements morphologiques liés au détachement des cellules de la matrice extracellulaire, l'augmentation

de la motilité, de l'invasion et de la capacité métastatique des cellules tumorales (Lu et al., 2001).

4.2. Survie et prolifération

FAK joue un rôle crucial dans la tumorigenèse en favorisant les signaux de prolifération et de survie cellulaire. Dans un contexte physiologique, la non-adhésion des cellules à la MEC induit des effets délétères sur la survie en déclenchant une forme d'apoptose appelée l'anoïkis. Cependant, il a été démontré que la signalisation induite par FAK conduit à la survie des cellules cancéreuses en l'absence de signaux d'adhésion (Hu et al., 2024; Vitillo et al., 2016). Cette résistance à l'anoïkis induite par FAK implique principalement l'activation de signaux anti-apoptotiques et pro-survie. L'un des mécanismes par lesquels l'activité de FAK inhibe l'apoptose est lié à la signalisation PI3K/Akt (Paul et al., 2020; Reif et al., 2003). De plus, la signalisation de FAK renforce les effets anti-apoptotiques du nuclear factor-kappa B (NF- κ B) et des protéines inhibitrices d'apoptose (Murphy et al., 2021). Enfin, d'autres travaux ont démontré que FAK permet d'accélérer le cycle cellulaire en activant les voies de signalisation ERK et JNK (Liu et al., 2007; Zhao et al., 2001).

5. Ciblage thérapeutique de FAK

FAK joue un rôle central dans les différentes étapes de la progression tumorale, ce qui en fait une cible potentielle pour les thérapies anticancéreuses (Murphy et al., 2020). Récemment, des inhibiteurs de l'activité catalytique de FAK ont été synthétisés et ont fait l'objet de plusieurs essais cliniques afin d'évaluer leur efficacité et leur toxicité. Ces inhibiteurs ont montré des profils de sécurité acceptables, avec des effets secondaires observés similaires à ceux rencontrés avec d'autres thérapies ciblées (Jones et al., 2015). Lors d'essais cliniques de phase 2, les inhibiteurs de FAK ont été combinés avec d'autres agents anticancéreux, tels que des inhibiteurs de tyrosine kinase, des anticorps monoclonaux et des agents chimiothérapeutiques (**Tableau 8**), après avoir montré des résultats décevants en tant qu'agents uniques (Gerber et al., 2020; Soria et al., 2016). Parmi ces combinaisons thérapeutiques, l'association du Defactinib (VS-6063) avec l'Avutometinib (VS-6266) est actuellement à l'étude dans le cadre d'un essai clinique de phase 3 pour le traitement du cancer séreux ovarien de bas grade (NCT06072781).

Tableau 8 : Essais cliniques en cours évaluant des combinaisons avec des inhibiteurs de FAK (adapté de Dawson et al., 2021).

Inhibiteur de FAK	Essai clinique	Type de cancer	Agent de combinaison	Cible moléculaire
Defactinib (VS-6063)	NCT02546531 (Phase 1)	Tumeurs solides / Tumeurs solides avancées Cancer du pancréas	Pembrolizumab / gemcitabine	PD-1
	NCT02758587 (Phase 1/2A)	Cancer bronchique non à petites cellules, mésothéliome, néoplasies pancréatiques	Pembrolizumab	PD-1
	NCT03287271 (Phase 1/2)	Cancer de l'ovaire	Paclitaxel and carboplatine	-
	NCT03727880 (Phase 2)	Adénocarcinome canalaire du pancréas	Pembrolizumab	PD-1
	NCT03875820 (Phase 1)	Tumeurs solides avancées avec mutation RAS ; cancer bronchique non à petites cellules, cancer ovarien séreux de bas grade, cancer colorectal, autres tumeurs solides mutées RAS	VS-6766	MEK/RAF
	NCT04201145 (Phase 1A-1B)	Mésothélium pleural	Pembrolizumab	PD-1
	NCT04620330 (Phase 2)	Cancer bronchique non à petites cellules avec une mutation activatrice de KRAS	VS-6766	MEK/RAF
	NCT04625270 (Phase 2)	Cancer de l'ovaire	VS-6766	MEK/RAF
	NCT04331041 (Phase 2)	Cancer pancréatique	Radiothérapie	-
IN10018 (BI 853520)	NCT04109456 (Phase 1B)	Mélanome uvéal métastatique ou mélanome cutané avec mutation NRAS	Cobimetinib	MEK

Objectifs du projet de recherche

Comme évoqué dans l'introduction, la Nétrine-3 reste un membre largement inexploré de la famille des Nétrines, malgré sa proximité structurale avec la Nétrine-1. Au cours des dernières décennies, de nombreuses études scientifiques ont révélé le rôle crucial de certains membres moins explorés de la famille, notamment la Nétrine-4 et la Nétrine-G1, dans la matrice extracellulaire et le cancer du pancréas (Francescone et al., 2021; Reuten et al., 2016). En revanche, la Nétrine-3 semble avoir été largement négligée dans la recherche biomédicale depuis sa découverte en 1999, aucune étude approfondie n'ayant révélé ses fonctions biologiques en dehors de son rôle putatif dans le guidage axonal (Wang et al., 1999).

Notre étude publiée en 2021 a marqué une avancée significative dans la caractérisation du profil d'expression de la Nétrine-3 dans les cancers humains (Jiang et al., 2021, **Annexe 1**). Nous avons démontré que cette protéine est exprimée de manière très spécifique dans deux types de tumeurs neuroépithéliales : le neuroblastome et le cancer du poumon à petites cellules. La spécificité de la lignée ainsi que le caractère sécrétoire de la Nétrine-3 indiquent qu'elle pourrait être un candidat prometteur pour le diagnostic de ces maladies. De plus, notre analyse suggère une corrélation entre l'expression de la Nétrine-3 et les stades avancés du neuroblastome, indiquant une association potentiellement forte entre les niveaux d'expression de la Nétrine-3 et la survie des patients atteints de tumeurs particulièrement agressives. Ces travaux permettent de formuler les premières hypothèses sur les fonctions de la Nétrine-3, dont le gène semble être exprimé de manière constitutive dans les cellules cancéreuses, ce qui pourrait indiquer un rôle dans la détermination de l'identité cellulaire.

En termes d'évolution biologique, la Nétrine-1 et la Nétrine-3 partagent une forte homologie et nos données, corroborées par des résultats antérieurs, suggèrent que la Nétrine-3 se lie aux mêmes récepteurs que la Nétrine-1. Par ailleurs, nos données préliminaires indiquent que la Nétrine-3 pourrait inhiber la mort cellulaire induite par le récepteur à dépendance UNC5B. Cependant, l'expression de la Nétrine-3 dans les tumeurs et durant le développement embryonnaire diverge notablement de celle de la Nétrine-1. En effet, l'inhibition du gène *Ntn1* chez la souris est associée à une létalité embryonnaire et à des anomalies sévères du système nerveux (Bin et al., 2015). En revanche, l'expression de la Nétrine-3 semble se limiter au système nerveux périphérique (Wang et al., 1999) et la délétion du gène *Ntn3* n'entraîne pas de

létalité embryonnaire (Pan et al., 2023). Ces observations laissent supposer que ces protéines pourraient jouer des rôles complémentaires ou antagonistes, dont les mécanismes restent à élucider. Pour évaluer précisément les fonctions de la Nétrine-3 dans des modèles *in vivo* et *in vitro*, il est crucial de développer des outils moléculaires spécifiques, car les candidats commerciaux testés n'ont pas permis une validation satisfaisante, limitant ainsi la caractérisation immunohistochimique de cette protéine.

Mon projet de thèse vise à élucider le rôle de la Nétrine-3 dans la progression du cancer du poumon à petites cellules. Nous avons choisi ce modèle d'étude en raison de nos données préliminaires suggérant que la Nétrine-3 pourrait constituer une cible thérapeutique prometteuse pour les patients atteints d'un CBPC, un cancer pour lequel les options de traitement demeurent limitées. Pour atteindre cet objectif, nous avons développé de nouveaux outils, notamment un anticorps spécifique dirigé contre la Nétrine-3 ainsi qu'une protéine recombinante humaine. Ces innovations ont non seulement facilité nos recherches actuelles mais ouvriront également la voie à de nombreuses collaborations futures, permettant d'étudier la Nétrine-3 dans un spectre plus large de pathologies. Nous avons précédemment démontré que l'anticorps NP137, actuellement en investigation clinique, constitue un candidat prometteur pour cibler la Nétrine-3 (Jiang et al., 2021, **Annexe 1**). Ce résultat ouvre la perspective d'une transition rapide vers de nouveaux essais cliniques pour évaluer le ciblage de la Nétrine-3 chez l'homme. Une grande partie de mon travail a ainsi été consacrée à l'identification des patients atteints de CBPC susceptibles de répondre favorablement à une thérapie ciblant la Nétrine-3. Parallèlement, j'ai évalué le potentiel de la détection de la Nétrine-3 dans des biopsies liquides comme marqueur diagnostique innovant pour le CBPC.

Résultats

Afin d'assurer la cohérence des données présentées et la pertinence de la discussion, j'ai choisi d'inclure dans cette section uniquement les résultats destinés à une publication en cours de préparation, dont je suis le premier auteur. Ces résultats sont présentés ici sous la forme d'un article scientifique. Il est important de souligner qu'il s'agit d'une version préliminaire et que plusieurs expériences supplémentaires devront être réalisées avant la soumission de la publication. Nous prévoyons notamment d'approfondir la caractérisation du mécanisme impliqué dans la régulation de la voie de signalisation FAK par la Nétrine-3 et de développer un modèle murin de dissémination métastatique. Les travaux publiés ou en cours de révision en co-auteur sont inclus en annexe de ce manuscrit.

Publication en premier auteur :

Hervieu M, Allio M, Huynh M, Moullé P, Patte C, Delcros JG, Richaud M, Breusa S, Thivolle G, Rama N, Fattet L, Piecyk M, Goldschneider D, Ortiz-Cuaran S, Ichim G, Payen L, Kryza D, Walter T, Sage J, Augert A, Mehlen P, Gibert B. Netrins enhance plasticity and resistance of small cell lung cancer by modulating cellular anchorage. En préparation.

Publications en co-auteur :

-Jiang S, Richaud M, Vieugué P, Rama N, Delcros JG, Siouda M, Sanada M, Redavid AR, Ducarouge B, **Hervieu M**, Breusa S, Manceau A, Gattolliat CH, Gadot N, Combaret V, Neves D, Ortiz-Cuaran S, Saintigny P, Meurette O, Walter T, Janoueix-Lerosey I, Hofman P, Mulligan P, Goldschneider D, Mehlen P, Gibert B. Targeting netrin-3 in small cell lung cancer and neuroblastoma. *EMBO Molecular Medicine* 13, e12878 (2021).

-Perampalam P, MacDonald JI, Zakirova K, Passos DT, Wasif S, Ramos-Valdes Y, **Hervieu M**, Mehlen P, Rottapel R, Gibert B, Correa R, Shepherd TG, Dick FA. Netrin signaling mediates survival of dormant epithelial ovarian cancer cells. *eLife* 12, RP91766 (2024).

-Kryza D, Wischhusen J, Richaud M, **Hervieu M**, Sibi Boumedine J, Delcros JG, Besse S, Baudier T, Laval PA, Breusa S, Boutault E, Clermidy H, Rama N, Ducarouge B, Devouassoux-Shisheboran M, Chezal JM, Giraudet AL, Walter T, Mehlen P, Sarrut D, Gibert B. From netrin-1-targeted SPECT/CT to internal radiotherapy for management of advanced solid tumors. *EMBO Molecular Medicine* 15, e16732 (2023).

-Patte C, Pommier RM, Ferrari A, Chung F, Ouzounova M, Moullé P, Richaud M, Khoueiry R, **Hervieu M**, Breusa S, Allio M, Rama N, Gérard L, Hervieu V, Poncet G, Fenouil T, Cahais V, Sertier AS, Boland A, Bacq-Daian D, Ducarouge B, Marie J, Deleuze JF, Viari A, Scoazec JY, Roche C, Mehlen P, Walter T, Gibert B. Comprehensive molecular portrait reveals genetic diversity and distinct molecular subtypes of small intestinal neuroendocrine tumors. En révision chez *Nature Communications*.

-Ducarouge B, Redavid AR, Victoor C, Chira R, Fonseca A, **Hervieu M**, Bergé R, Lengrand J, Vieugué P, Neves D, Goddard I, Richaud M, Laval PA, Rama N, Goldschneider D, Paradisi A, Gourdin N, Chabaud S, Treilleux I, Gadot N, Ray-Coquard I, Depil S, Decaudin D, Némati F, Marangoni E, Mery-Lamarche E, Génestie C, Tabone-Eglinger S, Devouassoux-Shisheboran M, Moore KJ, Gibert B, Mehlen P, Bernet A. Netrin-1 blockade inhibits tumor associated Myeloid-derived suppressor cells, cancer stemness and alleviates resistance to chemotherapy and immune checkpoint inhibitor. *Cell Death & Differentiation* 30, 850-858 (2023).

-Barnault R, Verzeroli C, Fournier C, Michelet M, Redavid AR, Chicherova I, Plissonnier ML, Adrait A, Khomich O, Chapus F, Richaud M, **Hervieu M**, Reiterer V, Centonze FG, Lucifora J, Bartosch B, Rivoire M, Farhan H, Couté Y, Mirakaj V, Decaens T, Mehlen P, Gibert B, Zoulim F, Parent R. Hepatic inflammation elicits production of proinflammatory netrin-1 through exclusive activation of translation. *Hepatology* 76, 1345-1359 (2022).

Netrins enhance plasticity and resistance of small cell lung cancer by modulating cellular anchorage.

Maëva Hervieu^{1,2}, Marion Allio¹, Marie Huynh¹, Pauline Moullé¹, Céline Patte¹, Jean-Guy Delcros³, Mathieu Richaud¹, Silvia Breusa¹, Gaëtan Thivolle², Nicolas Rama², Laurent Fattet², Marie Piecyk⁴, Madison Murphy⁵, Eman El-Gohary⁵, David Goldschneider⁶, Sandra Ortiz-Cuaran⁷, Gabriel Ichim⁸, Léa Payen⁴, David Kryza⁹, Thomas Walter^{1,10}, Julien Sage^{11,12}, Arnaud Augert⁵, Patrick Mehlen^{2#}, and Benjamin Gibert^{1#}.

¹ Gastroenterology and technologies for health, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM U1052 – CNRS UMR5286, Université Lyon I, Centre Léon Bérard, Lyon, France.

² Apoptosis, Cancer and Development Laboratory- Equipe labellisée ‘La Ligue’, LabEx DEVweCAN, Institut PLAsCAN, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM U1052 – CNRS UMR5286, Université Lyon I, Centre Léon Bérard, Lyon, France.

³ Small molecules for biological targets, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM U1052 – CNRS UMR5286, ISPB Rockefeller, Lyon, France.

⁴ Institut de Cancérologie des Hospices Civils de Lyon, CIRculating CANcer Program (CIRCAN), Lyon, France.

⁵ Yale School of Medicine, Yale University, New Haven, CT, United States.

⁶ Netris Pharma, Lyon, France.

⁷ Univ Lyon, Centre Léon Bérard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM U1052 – CNRS UMR5286, Lyon, France.

⁸ Cancer Cell Death laboratory, part of LabEx DEVweCAN, Cancer Initiation and Tumoral Cell Identity Department, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM U1052 – CNRS UMR5286, Centre Léon Bérard, Université Lyon I, Institut Convergence PLAsCAN Lyon, France.

⁹ Lumen Nuclear Medicine group, Hospices Civils de Lyon et Centre Léon Bérard, Lyon, France.

¹⁰ Hospices Civils de Lyon, Hôpital Édouard Herriot, Service de Gastroentérologie et d’Oncologie Digestive, Lyon, France.

¹¹ Department of Pediatrics, Stanford University, Stanford, CA, United States.

¹² Department of Genetics, Stanford University, Stanford, CA, United States.

#Corresponding authors: P. Mehlen: patrick.mehlen@lyon.unicancer.fr and B. Gibert: benjamin.gibert@lyon.unicancer.fr.

Key words: Small Cell Lung Cancer, Resistance, Plasticity, Netrin-3, Netrin-1, cell anchorage, cellular matrix.

ABSTRACT

Small cell lung cancer (SCLC) is the most lethal of all lung cancers. Its clinical management has seen minimal progress since the first chemotherapies. It is also the disease with the particularity of presenting a stepwise evolution with resistance to therapies, which is acquired with each treatment cycle. Its origins lie in a high degree of cellular plasticity, with cells transitioning from a neuroendocrine phenotype and losing this functionality in the most advanced stages of the disease. Understanding this cellular plasticity is therefore crucial for the development of future molecules. In this study, we show that the axonal guidance factor netrin-3 is associated with the NEUROD1 subgroup, which is significantly enriched in SCLC distant metastases. We show that netrin-3 disrupts the extracellular matrix (ECM), allowing detached cells to survive. Netrin-3 is thus present on the surface of circulating tumor cells in patients and promotes metastasis formation in mouse models.

INTRODUCTION

Axon navigation cues such as Semaphorins, Ephrins, SLITs/Robo and Netrins have been shown to play critical functions in many cellular processes during the central nervous system development^{1,2}. They have also been associated with a number of pathologies and identified as crucial elements in the initiation and progression of cancers³. It appears that these guidance proteins are massively deregulated in many types of tumors, where they are assumed to support functions favoring invasion, proliferation, and immune system blockade.

In this context, one of these proteins called netrin-1 is among the most promising in terms of clinical perspective for patients. It is the most studied member of the netrin family and is upregulated in a large fraction of human tumors, where it promotes cancer cell survival. An effort to assay the clinical relevance of blocking netrin-1/receptors interactions is currently ongoing with an anti-netrin-1 monoclonal IgG1 antibody named NP137⁴. Data from the phase I trial performed on patients with advanced solid cancer have recently been published, underlining an anti-cancer activity in patients with gynecological tumors correlated with a reduction of epithelial to mesenchymal transition (EMT)^{5,6}. A phase II trial investigating NP137 in combination with chemotherapy (Carboplatin) or/and anti-PD1 in uterus and endometrium cancer is also ongoing (NCT02977195). Phase II trials are also planned/underway in liver and pancreatic cancers to evaluate whether this modification of EMT and more generally of cellular plasticity can block the evolution of these pathologies.

More generally, other members of the netrin family have already been shown to promote tumor development^{7,8}. We focused here on netrin-3, which is structurally very close to netrin-1, but has been little studied. We have recently shown that its expression correlates with poor prognosis in Neuroblastoma, a childhood cancer⁹. Its expression is also restrictive to the most fatal subtype of lung carcinomas, small cell lung cancer. This neuroendocrine pathology is distinguished from other lung cancers by its elevated proliferation rate and ability to rapidly disseminate to peripheral sites, with more than 60% of SCLC patients diagnosed with widespread disease, frequently involving metastases to brain, liver and bones¹⁰. Four subtypes have been defined in the pathology: two neuroendocrine ASCL-1 (SCLC-A) and NEUROD1 (SCLC-N) and two non-neuroendocrine, one characterized by the POU2F3 marker (SCLC-P) and the other inflammatory (SCLC-I)¹¹.

It has recently been supposed that axonal guidance factors may play an important role in the cell shaping of SCLC primary cells contributing to the migratory and metastatic phenotype of these cells¹². To challenge this hypothesis, we emphasized the role of netrin-3 in the

regulation of neuroendocrine fate and migratory potential of SCLC cells, that has not been already characterized.

In the present study, we show that netrin-3 is expressed in neuroendocrine-high forms of SCLC but is more specifically upregulated in tumors associated with the SCLC-N subtype. We prove that netrin-3 enhances the plasticity of SCLC, and characterize the first mechanism of action described for netrin-3. It thus directly binds to and disrupts the extracellular matrix formation, leading to the inhibition of cell anchorage in SCLC, which is likely a key step in metastasis dissemination.

RESULTS

Netrin-3 is specifically expressed in non-adherent cells.

One of the most important aspects of our future understanding of SCLC is the plasticity between the SCLC-A, -N and -P subgroups. This transition is accompanied by the loss of the neuroendocrine markers Chromogranin-A (ChgA) and Synaptophysin (SYP) expressed in the -A and -N subtypes towards the late -P subtype, as illustrated in **Supplementary Figure 1A**. We took advantage of certain cell lines phenotypically marked by the coexistence of floating and adherent growth, as already observed by other groups (**Figure 1A**)^{13,14}. As shown in **Figure 1B**, we were able to isolate sub-clones capable of remaining constitutively buoyant, as is the case for most SCLC cells in vitro, as well as constitutively adherent clones. It appears that these cells are losing their neuroendocrine fate, as shown by a fall in ChgA protein levels, the most widely recognized marker for neuroendocrine cells, concomitant with a drop in SYP expression. Similarly, a decrease in NEUROD1 was observed, as well as an increase in POU2F3, YAP1 and REST, a transcription factor involved in the repression of neuronal genes (**Figure 1C**). These cells were then subjected to RNA sequencing analysis, which revealed that netrin-3 was expressed exclusively in floating cells, while adherent cells exhibited a distinct mesenchymal phenotype (**Figure 1D, Supplementary Figure 1B**). Of note, one of its putative receptors UNC5B is more abundantly present in the adherent cells. To confirm these results at the protein level and due to the lack of available tools to analyze netrin-3, we developed a new antibody specific for netrin-3 (Materials and Methods section). We thus confirmed by immunoblotting that netrin-3 expression is observed in floating cells and, in contrast, absent from the adherent cells (**Figure 1E**). Furthermore, in a similar manner, the receptors UNCB and NEO1 are more highly expressed in the adherent population compared to the floating cells. The other netrins receptors are not expressed in these conditions. To determine whether the

expression of netrin-3 is restrictive to a small number of cell lines or a broader phenomenon, we took culture conditions from 40 cell lines from UT SouthWestern (UTSW) set and it appears that netrin-3 expression is specific to non-adherent cell lines (**Figure 1F**). Moreover, Lim *et al.*¹⁵ examined NE to non-NE differentiation in SCLC using immunostaining for Hes1 and a genetically engineered mouse model (TKO Hes1GFP/+) where GFP is expressed from the endogenous Hes1 promoter. GFP^{neg} (NE) cells grow as floating clusters, while GFP^{high} (non-NE) cells grow adherently. Interestingly, microarray gene expression analysis of GFP^{neg} and GFP^{high} cells revealed an enrichment of netrin-3 expression and neuroendocrine/neuronal differentiation markers in GFP^{neg} cells (**Supplementary Figure 1C-D**). To note, Lim *et al.*¹⁵ also showed that GFP^{neg} cells not only had higher proliferation rates but also formed faster-growing tumors than those derived from GFP^{high} cells. This correlation suggests that the molecular profile of GFP^{neg} cells, characterized by elevated netrin-3 and neuroendocrine markers, may underlie their more aggressive tumor behavior.

Netrin-3 decreases cell anchorage and promotes tumor growth.

To determine whether netrin-3 plays a role in the phenotype of floating cells, we established a H69AR-Ntn3 SCLC cell model that stably overexpresses netrin-3 (**Figure 2A**). This H69AR cell line was chosen because it is constitutively resistant to chemotherapies and constitutively grows adherently in cell culture. Nevertheless, after 3 weeks in culture, the netrin-3 overexpressing cells appeared to detach from the culture dishes (**Figure 2B**). We tried to make these cells adhere to fibronectin-coated wells and found that cell adhesion was greatly reduced by approximately 50% in cells expressing netrin-3, indicating an anchorage-dependant detachment (**Figure 2C**). We have previously shown that netrin-3 expression is specific to SCLC, whereas it is not expressed in NSCLC⁹. To determine the role of netrin-3 in SCLC, we first analyzed whether netrin-3 expression correlated with specific signatures in primary tumors from 81 patients (**Figure 2D**). Pathway enrichment analyses show that its expression is associated with increased cell division, as indicated by its correlation with hallmark G2M and Mitotic Spindle signatures (**Figure 2E**). It appears that the expression of the protein alone is sufficient to increase the proliferation of these cells in vitro, as depicted by MTS assays (**Figure 2F**). This hyperproliferative effect was also achieved in vivo in xenografted Nude mice. As a result, tumor growth was slowed ($p \leq 0.01$) and animal survival was enhanced ($p = 0.0002$) (**Figure 2G-H**). All these data support the idea that netrin-3 promotes tumorigenesis in SCLCs and reduces cell anchorage.

Netrin-3 directly binds and regulates integrity of the extracellular matrix.

To further investigate the role of netrin-3 in cell adhesion, we analyzed its localization using direct immunofluorescence. As a result, netrin-3 is detectable in the intercellular space of the cells (**Supplementary Figure 2A**). We then confirmed this result with transmission electron microscopy analysis. Netrin-3 is thus clearly detectable at the cell periphery using a gold-labeled antibody, and more particularly in the matrix associated with the membranes that form the cell-plastic contacts under culture conditions (**Figure 3A**). We conducted immunoblot analysis on cells expressing or not netrin-3, with or without SDS, a detergent capable of solubilizing matrix proteins. Netrin-3 could be easily measured under detergent conditions, where it is detached from the matrix, compared to control cells, indicating that it may bind to the matrix coating at the bottom of the cell culture dish (**Figure 3B**). We thus treated the cells with heparin, a procedure routinely used to dissociate matrix and sugar residues from cells growing on plastic plates^{16,17}. While no netrin-3 was detected in the conditioned medium from H69AR-Ntn3 cells under non-heparin-treated conditions, netrin-3 was detected by Western blot when heparin was added (**Figure 3C**). Together, these data support the view that netrin-3, like netrin-1 and -4, is poorly diffusible and binds to the matrix. To study the effect of netrin-3 on the ECM *in vitro*, we used a polymerized Matrigel matrix, primarily composed of laminin-111 and collagen-IV, and treated it with either recombinant netrin-3 protein or vehicle (PBS). The addition of recombinant netrin-3 protein results in increasing ECM pore area, as assessed by immunofluorescence (**Figure 3D-E**). Subsequently, we conducted atomic force microscopy (AFM) on the Matrigel matrix, and our data show that treatment with recombinant netrin-3 protein significantly reduces the stiffness (**Figure 3F**). Altogether, these results argue that netrin-3 directly binds and reshapes the ECM.

Netrin-3 inhibits cell anchorage by modulating the FAK pathway.

To determine how netrin-3 regulates cell adhesion and which molecular pathways are involved, we carried out a pan-kinase screen in cells expressing netrin-3, with the same cells not expressing it as a reference (**Figure 4A, Supplementary Figure 3A**). Pathways were specifically activated in the presence of netrin-3 (**Figure 4B**). The focal adhesion kinase (FAK) is a recognized regulator of cell adhesion and appears to be hypophosphorylated in this experiment. To confirm these analyses, we performed an immunoblot analysis of cells with and without netrin-3. As a result, FAK autophosphorylation (Tyr397), which is crucial for cell adhesion, is greatly reduced in cells overexpressing netrin-3 (**Figure 4C**). In addition, phosphorylation of Paxillin (Tyr118), another key protein involved in focal adhesions

formation, is also largely diminished. In the reverse experiment, cells in which netrin-3 expression was invalidated by the CRISPR-Krab system were analyzed (**Figure 4D, Supplementary Figure 3B**). Under these conditions, the FAK signaling pathway is most active (**Supplementary Figure 3C**). This result was confirmed by Western blot where FAK is hyperphosphorylated at Tyr397 in both CRISPR clones (**Figure 4E**). To assess whether the UNC5B and NEO1 receptors mediate the regulation of FAK signaling, we used siRNA to inhibit their expression. Our results demonstrate that suppression of these receptors does not induce any changes in FAK phosphorylation at Tyr397 (**Figure 4F**). Therefore, the modulation of FAK activity by netrin-3 does not seem to be mediated through these receptors. Nonetheless, further investigations are necessary to confirm this hypothesis.

Netrin-3 inhibits adherence through β 1 integrin signaling.

To elucidate how netrin-3 regulates cell adhesion, we analyzed the activity and expression of various integrins at the protein level (**Figure 5A**). Integrins are heterodimeric receptors located on the cell surface that mediate interactions with the extracellular matrix proteins, thereby regulating cellular functions like adhesion, proliferation, migration and survival¹⁸. It appears that both β 1 integrin activity and α 7 integrin expression levels are significantly reduced in cells overexpressing netrin-3. These results were further validated by the mirror experiment, which demonstrated increased β 1 integrin activity in both netrin-3 knockdown clones (**Figure 2C**). To study the molecular mechanism and protein interactions involved, we aimed to determine whether netrin-3 can bind to integrins to regulate their activity using bio-layer interferometry (BLI) (**Figure 5D**). We identified that netrin-3 strongly bound to the α 1 β 1 (Kd = 3.69 nM), α V β 1 (Kd = 13.1 nM), α 6 β 1 (Kd = 4.05 nM) and α 7 β 1 (Kd = 14.3 nM) integrins (**Figure 5E**). Human fibronectin was used as a negative control (data not shown). Together, these results suggest that netrin-3 controls cell adhesion through β 1 integrin signaling.

Netrin-3 expression is enriched in the NEUROD1 subtype and promotes metastatic dissemination of SCLCs.

To understand whether netrin-3 might be involved in the progression and phenotypic changes of SCLC subtypes, we analyzed its expression in the only available SCLC cohort (n=81 human tumors)¹⁹ (**Figure 6A, Supplementary Figure 4A-B**). This clearly shows that netrin-3 is highly expressed in the NEUROD1 subtype (SCLC-N), whereas it is virtually absent from the SCLC-P subtype. Furthermore, there was a very high correlation between the expression of

the NEUROD1 transcription factor and netrin-3 in the patient tumors (Pearson correlation: 0.43; $p < 0.0001$) (**Figure 6B**). We confirmed these findings in UTSW set of SCLC cell lines, where netrin-3 is readily detectable in the SCLC-A subtype and highly enriched in SCLC-N subtype (**Figure 6C**). In a reverse manner, netrin-3 expression is lower in the POU2F3-low groups, probably because POU2F3 expression is inversely correlated with NEUROD1. These results obtained from patients underline that netrin-3 is likely important in the SCLC subtype evolution.

The SCLC-N subtype has been described as highly enriched in nodal and distant metastases²⁰. To test whether this hypothesis is correct, we conducted an analysis of the blood samples of SCLC patients. Cancer cells are typically epithelial in origin and are generally not found in the bloodstream. However, circulating tumor cells (CTCs), which are crucial for metastasis, can be detected in the blood. These CTCs can be isolated using filtration techniques and then directly labeled with an anti-netrin-3 antibody for further analysis. Direct labeling against immune cells characterized as CD45⁺CD41⁺ allows the removal of non-epithelial cells that have non-specifically clung to the filter (**Figure 6E, Supplementary Table 1**). As a result, CTCs express netrin-3 on their surface, suggesting that netrin-3 at least in part promotes their detachment and facilitates the development of metastases. This result was confirmed in every patient tested (ongoing, n=4).

DISCUSSION

In the present paper, we describe a novel invasion mechanism for SCLC. Netrin-3 appears to be essential for modulating ECM formation and integrity. It appears that netrin-3 is crucial for the survival of SCLC cells with a floating phenotype. Additionally, its expression is sufficient to regulate cell adhesion by modulating the FAK signaling pathway, and it seems tempting to consider that we could block the invasion of SCLC not by treating adherent cells with FAK inhibitors, but by counterintuitively treating floating cells so they cannot adhere and progress to the non-neuroendocrine and chemoresistant state.

Overexpression of netrin-3 enhances the survival of cancer cells in an environment subjected to numerous negative pressures (blood pressure, immune cells, etc.). Interestingly, one group has demonstrated that netrin-3 is a crucial survival factor for ovarian cancer cells, which leave the primary organ and enter the peritoneal space, where they can survive for years. This mechanism relies on netrin-3 for establishing cellular dormancy²¹. Although linked to cell

detachment, this mechanism may not be entirely applicable to SCLC, as it progresses extremely rapidly in patients.

Netrin-3 is predominantly expressed in the SCLC-N subtype, which is known to be the most commonly found subtype in nodal and distant metastases. We found strong netrin-3 expression on CTCs purified from patient blood samples. This suggests that netrin-3 promotes invasion and survival of non-adherent cells. This raises the question of whether targeting this protein could effectively eliminate CTCs in patients.

MATERIALS AND METHODS

Human and Mouse Transcriptomic Data Analysis

RNAseq data processing

Data preprocessing was carried out at Gastroenterology and technologies for health team, using the nf-core pipeline rnaseq (3.9) [nf-core/rnaseq]. Human reference genome used was GRCm38 NCBI, with the corresponding gtf file. Mapping was performed with STAR²² version 2.7.10a defaults and RNA control metrics were evaluated using RSeQC (v3.0.1). Gene expression was then quantified with RSEM (1.3.1) from the raw sequencing reads.

Gene expression analysis

Variance stabilizing transformation (vst) (provided by DESeq2²³) was calculated on raw count matrices then Principal Component Analysis (PCA) was applied to reveal global effects across libraries. Differential expression analyses were performed using the R package DESeq2 (v1.32.0), with the Wald test, sequencing batches correction and apeglm shrinkage estimator (v1.14.0).

Pathway enrichment analysis

All tested pathway lists originated from MSigDB (Molecular Signatures Database): Hallmark (H) gene sets and C8 gene sets subset REACTOME. Pathway enrichment was performed via fgsea package²⁴ version 1.16.0 using all genes in the whole expression matrix (all cell types gathered), sorted by $\text{padj} * (\log_2\text{FoldChange} / \text{abs}(\log_2\text{FoldChange}))$ for the statistic option.

Circulating Cancer Cells study

Blood samples were collected into EDTA tubes (BD Vacutainer). In 7.5mL of total blood, red blood cells were lysed using an RBC lysis buffer (Biolidics limited®, #CBB-F016003), following the manufacturer's protocol. Lysis buffer was added in a 1:4 v/v ratio (blood/lysis buffer) and incubated for 10 min at room temperature (RT). Then, the samples were centrifuged at $500 \times g$ for 10 min and supernatant carrying lysed red blood cells was discarded. Cell pellet containing white blood cells and circulating tumor cells was resuspended in 4 mL of a custom ClearCell resuspension buffer and loaded on the size-based separation system ClearCell FX (Biolidics limited®). After CTC enrichment process, the output is centrifuged at $500 \times g$ for 10 min. Supernatant is removed until 100 μ L to concentrate and count the isolated cells using a KOVA slide (Dutscher, #50126).

To perform immunofluorescence staining, 10^5 cells were centrifuged in EZ Cytofunnel (Eridia, #A78710003) at 400 rpm for 4 min on poly-L-lysine coated glass slides. Spotted cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min at RT. After washing with PBS, cells were then blocked for 30 min at RT, protected from the light, with an in-house saturation solution mix containing 5% fetal goat serum (ThermoFisher, #31872), 1% bovine serum albumin (ThermoFisher, #A8412), and 5% Fc receptor blocking reagent (Miltenyi Biotec, #130-059-901) diluted in PBS. Then, cells were immunostained overnight at 4°C with primary antibodies: (i) for white blood cell staining, anti-CD45 antibody (rat anti-human, ThermoFisher, #MA5-17687) and AlexaFluor488-conjugated anti-CD41 antibody (mouse anti-human, BioLegend, #303723); (ii) for the detection of Netrin3 positive cells, anti-netrin-3 antibody (rabbit anti-human, Covalab). The day after, cells were washed and then incubated 1h at RT in the dark with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, ThermoFisher, #62248) and secondary antibodies, including AlexaFluor488-conjugated anti-rat antibody (ThermoFisher, #A-11006), and AlexaFluor647-conjugated anti-rabbit antibody (ThermoFisher, #VB296618). Finally, the slides were mounted with Fluoromount aqueous mounting solution (Merck, #F4680) and scanned using the BioTek Lionheart™ FX Automated fluorescence microscope (Agilent).

SCLC patients involved in these experiments were provided informed consent for blood samples collection, in compliance with the relevant laws and institutional guidelines in France.

Cell culture

Human SCLC cell lines H82, H446 and H69AR were cultured in RPMI-1640 (Gibco, #61870-010). Floating and adherent isogenic cell lines were isolated 7 days after the appearance of adherent cells, cultivated in suspension or in adherent conditions respectively, and passaged until they formed a uniform cell line. All media were supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, #A3840402), 1% penicillin/streptomycin solution (Gibco, #15140-122) and cells were incubated at 37°C with 5% CO₂. All cell lines were obtained from ATCC and frequently tested for mycoplasma contamination (Lonza, #LT07-318).

Generation of netrin-3 overexpressing and knock-out cell lines

For stable transduction of cells, lentiviral particles were produced in 293T cells (gift from Dr. Fabrice Laval, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon). First, 293T cells were plated in OptiMEM medium + GlutaMAX (Life tech, #51985026) supplemented with 1mM Sodium Pyruvate (Life tech, #11360039) and 5% FBS one day prior in 6 well plates at a confluence of 70-80% at the day of transfection. Lentiviral particles were produced by co-transfecting 293T cells with lentiviral vector pWPXLd-hNetrin-3 plus pCMV-dR8.91 and pCMV-VSV-g plasmids (gift from Dr. Carine Maise, INRA UMR754, Lyon) using Lipofectamine 3000 (Life tech, #L300008). 6 hours after transfection, medium was replaced with OptiMEM supplemented with pyruvate and 5% FBS. 48 hours after transfection, lentiviral supernatant was collected and filtered using a 0.45 µm syringe filter. The filtered supernatant was either used immediately or snap frozen. For transduction, cell lines of interest were seeded in 24-well plates at a volume of 0.25 ml per well. Then, 0.25 ml of viral supernatant fortified with 10 µg/ml polybrene (Sigma-Aldrich, #9268) was added to each well. The viral supernatant was removed 24 hours later. Stable H82 cell lines with netrin-3 knockout were produced as described previously⁹.

Production of netrin-3 polyclonal antibody

Anti-netrin-3 rabbit polyclonal antibody raised against netrin-3 peptides (GRPATRACDASDPRAHSPA, CVKTIPIGPTEDSSPVQPQD) was produced commercially (Covalab, France). Antiserum was obtained by immunizing rabbits with (KLH)-conjugated peptides. The resulting IgG fraction was purified by passing the antisera through columns charged with the peptides followed by elution. Specificities of the antibodies were confirmed by ELISA tests.

Immunoblotting

SCLC cells protein extraction was performed using SDS lysis buffer (25% SDS, 10% Glycerol, 1% 1M Tris-HCl pH 7.6, 1% Triton X-100, 0.25mM DTT) and sonicated briefly to break down cellular DNA. Protein concentration was quantified using the Pierce 660nm Protein Assay Reagent (ThermoFischer Scientific, #22660). 35 µg of every protein lysate were then separated by electrophoresis on 4 to 15% gradient sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gels (mini-Protean TGX Stain-Free, Bio-Rad, #456-8084) and transferred onto nitrocellulose membrane (Trans Blot Turbo, Bio-Rad, #1704156). Blocking was made with 10% milk diluted in tris-buffered saline 0.1% Tween-20 for 1 hour at room temperature with shaking. Overnight incubation with primary antibodies (1/1000) was performed at 4°C, followed by a 1-hour incubation with goat anti-rabbit IgG HRP (Jackson ImmunoResearch, #111-035-144) or goat anti-mouse IgG HRP (Jackson ImmunoResearch, #115-035-044) secondary antibodies (1/10000). Western blots were developed with SuperSignal West DURA Extended Duration Substrate (ThermoFischer Scientific, #34075) and figured on a ChemiDoc (Bio-Rad). All blots underwent subsequent reprobing for a sample loading control (β -Actin) on the same blot. Two to three lysates from distinct SCLC cell culture plates were independently run on separate gels, with one representative blot depicted per experiment. Proteins were quantified using integrated density analysis with ImageJ software.

Cell proliferation assay

Adherent SCLC cells were seeded in triplicate in a 96-well plate (1×10^4 cells per well in 100 µl of media) and cells were allowed to recover for 24 hours. 20 µl of MTS reagent (CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, #G3582) were added to each well and the plate was incubated for 2 hours at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. Absorbance at 490 nm was then measured by Infinite[®] M1000 PRO (Tecan) microplate reader.

Cell adhesion assays

To assess changes in the adhesion of H69AR cells following netrin-3 overexpression, cells were seeded at a density of 0.15×10^6 cells/well in a CytoSelect 48-well Cell Adhesion Assay plate (Cell Biolabs, #CBA-050) and incubated overnight at 37°C. Each well was washed 5 times with PBS containing 2 mM CaCl₂ and 2 mM MgCl₂ and stained for 10 minutes with a Cell Stain Solution according manufacturer's recommendations. 200 µl of Extraction Solution were then added to each well and absorbance at 560 nm was read using an Infinite[®] M1000 PRO (Tecan) microplate reader.

Heparin sodium salt and SDS treatment

0.5 x 10⁶ cells were seeded in 6-well plates and left to recover at 37°C for 24 hours. Cells were then treated with 200 µg/ml heparin sodium salt solution (Sigma-Aldrich, #H3393) diluted in serum-free medium and incubated overnight at 37°C. 5 ml of cell supernatant was collected and concentrated with Amicon Ultra-4 (Sigma-Aldrich, #UFC805024) and final concentrate was analyzed by immunoblotting.

To investigate the level of netrin-3 diffusion, SCLC cells were seeded at the same density in 6-well plates. 24 hours later, cells were harvested in non-denaturing (20 mM Tris HCl pH 8, 140 mM NaCl, 10% glycerol, 1% NP-40, 2mM EDTA) or SDS lysis buffer (see recipe above) and proteins were then analyzed by Western blot.

siRNA transfections

For all knockdowns described, 250 µl of serum-free media and 4 µl of Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen, #13778-150) were mixed per single 6-well and incubated for 10 min at room temperature (tube A). Additional 250 µl of serum-free media and 1 µl of siRNA (stock 20 µM) were mixed and incubated as mentioned above (tube B). The two tubes were then mixed and incubated for 10 min at room temperature. 500 µl of mixture were added to each well of a 6-well plate containing SCLC cells at 60-80% confluency. Cells were incubated at 37°C for 48h before Western blot analysis.

Immunofluorescence

0.5 x 10⁶ cells were seeded in 24-well plate containing sterile coverslips and incubated at 37°C for 3 days. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 2.5 min and washed 3 times with phosphate-buffered saline (PBS) and incubated with CellMask plasma membrane stain solution (1:1000, ThermoFischer Scientific, #C10045) during 30 min. After 3 additional washes with PBS, cells were incubated with anti-netrin-3 antibody (1:1000, Covalab) for 2 hours, followed by goat anti-rabbit AlexaFluor-647 (1:500, Abcam, #150083) secondary antibody for 45 min. These steps were performed at room temperature, in the dark with gentle shaking. Primary and second antibodies were diluted with 3% bovine serum albumin (BSA) in PBS. Cells were then counterstained with Hoechst 33342 staining dye solution (1:10000, Abcam, #228551) for 5 min at room temperature, mounted and imaged on LSM 980 confocal microscope (Zeiss). Images were analyzed using ZEN software.

For ECM pore size assays, coverslips were coated with 2% Matrigel (Corning, #356231) supplemented with 10% vehicle or recombinant netrin-3 protein (R&D) and incubated at 37°C overnight. Coverslips were then fixed with 2% glutaraldehyde for 20 minutes and incubated with goat anti-collagen-IV (1:100, Abcam, #235296), rabbit anti-laminin-111 (1:1000, Arigo Biolaboratories, #ARG10736) and rabbit anti-netrin-3 (1:100, Covalab) antibodies for 2 hours. Coverslips were mounted and imaged on LSM 980 confocal microscope (Zeiss).

Kinome activity profiling

PamChip peptide arrays (PamGene International BV) allow to measure the capacity of active kinases present in a protein lysate to phosphorylate specific peptides imprinted on multiplex peptide arrays. Cells were lysed on ice with M-PER Mammalian Extraction Buffer (ThermoFischer Scientific, #78501) supplemented with Halt Phosphatase Inhibitor Cocktail (ThermoFischer Scientific, #78420) and Halt Protease Inhibitor Cocktail EDTA free (ThermoFischer Scientific, #87785) according to PamGene's instructions. Proteins were quantified using Pierce Coomassie Plus (Bradford) Assay kit (ThermoFischer Scientific, #23236). Kinome activity measurements were conducted using a PamStation-12. In a single-step reaction, the PamChip protein tyrosine kinase array (PTK, #32112) was processed by dispensing 5 µg of protein lysate onto the PTK array mixed with 1% PK buffer and additives such as 1% BSA, 10 mM DTT, 1% PTK additive, 400 µM ATP and FITC-conjugated PY20 antibody. The Serine Threonine kinase array (STK, #32201) was processed in a two-step reaction. 1 µg of protein lysate was combined with 1% PK buffer, 1% BSA, 400 µM ATP and primary STK antibodies mix. After an initial incubation of approximately 2 hours, secondary FITC-labeled antibody mix was added to each array for phosphorylation activity detection. Both PTK and STK arrays employed software-based image analysis on BioNavigator (PamGene International BV), which consolidated signals obtained throughout the kinase lysate's incubation on the chip into a single value for each peptide. Top predicted kinases from significant (paired t test, $P < 0.05$) PTK and STK peptide sets are depicted as bar plots or on phylogenetic tree of the human protein kinase family generated by Coral (<http://phanstiel-lab.med.unc.edu/CORAL/>).

Tumor xenograft studies

For subcutaneous tumor growth study of H69AR-Ntn3 and -Ctrl cells, 5×10^6 cells were implanted into the right flank region of 8-week-old female immunocompromised NMRI-Foxn1nu/nu (NMRI-nu, Janvier Labs) mice with a 30-gauge needle. Mice were maintained in

a pathogen-free environment (Imthernat facility, Hospices Civils de Lyon, France) and provided with food and water *ad libitum*. Tumor volumes were evaluated by measuring the length (a) and the width (b) of the tumor with a digital caliper and then calculated using the following formula: $V=(a+b^2)/2$. No animals were excluded from the study. Mice with tumor volumes at or exceeding the 1800 mm³ limit, permitted by the local ACCeS Ethics Committee in accordance with European and French institutional guidelines, were immediately sacrificed. At this point, the animals were deemed deceased in the Kaplan-Meier survival analysis.

Biolayer interferometry

Biolayer interferometry experiments were conducted with the Octet RED96 system (ForteBio) at 30°C with constant shaking at 1,000 rpm in Octet[®] Kinetics Buffer 1X (KB1X, Sartorius, #18-1105). To determine the affinity of recombinant human netrin-3 (rhNTN3, R&D) with integrins, rhNTN3-coated APS biosensors (Sartorius, #18-5045) were incubated with numerous concentrations (see **Figure 5D**) of $\alpha 1\beta 1$ rhIntegrin (R&D, #7064-AB-025), $\alpha V\beta 1$ rhIntegrin (R&D, #6579-AVB-050), $\alpha 6\beta 1$ rhIntegrin (R&D, #7809-A6-050) and $\alpha 7\beta 1$ rhIntegrin (R&D, #7958-A7-050) during 150s. Incubation with rhFibronectin (R&D, #1918-FN-02M) was used as the negative control. Biosensors were subsequently incubated in KB1X for an additional 300s to observe dissociation of the complex. The ForteBio Octet RED Evaluation software 6.1 was used to assess binding kinetics, with a 1:1 binding model to determine k_{on} , k_{off} and K_d values.

Transmission Electron Microscopy (TEM)

Samples were fixed with 2% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.4, for 1h at 4°C. Samples were then postfixed with 1% osmium tetroxide containing 1.5% potassium cyanoferrate and contrasted with 0.2% Oolong tea extract in cacodylate buffer. Then, they were gradually dehydrated in Ethanol (30–100%), substituted progressively in an Ethanol–Epon mixture, and embedded in Epon (DELTA Microscopies, France). Inclusion was obtained by polymerization at 60°C for 72 hours. Thin sections (100 nm) were collected onto 150-mesh Nickel grids. Immunogold labeling was performed by floating the grids on drops of reactive media. The first step of epitope unmasking was the treatment with 12.5% metaperiodate during 15 min at room temperature. Nonspecific sites were coated with 1% BSA and 1% normal goat serum in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, for 2 hours at room temperature. Thereafter, incubation was carried out overnight at 4°C in wet chamber with primary antibody (anti-netrin-3, Covalab). Sections were successively washed 3 times in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 and pH 8.2 at room

temperature. They were incubated in a wet chamber for 25 min at room temperature in 1% BSA, 50 mM Tris-HCl, pH 8.2, and labeled with gold conjugated secondary antibody Goat-anti-Rabbit IgG 10nm (Aurion, #810.011) during 90 min. Sections were successively washed 3 times in 50 mM Tris-HCl pH8.2 and pH 7.4 and 3 times with distilled water. The immunocomplex was fixed by a wash in glutaraldehyde 4% for 3 min. Sections were stained with lead citrate and observed with a transmission electron microscope JEOL 1400JEM (Tokyo, Japan) operating at 80kV equipped with a camera Orius 1000 gatan and Digital Micrograph. This microscope is located at the Centre d'Imagerie Quantitative Lyon Est (CIQLE), a platform of Université Lyon I.

Atomic Force Miscroscopy (AFM)

AFM experiments were performed on a stand-alone JPK Nanowizard III microscope equipped with a CellHesion module and a 100 μm -range Z piezo driven by a JPK Nanowizard software 6.0. The whole setup was placed inside a custom-built 1 m³ soundproof box to reduce the influence of ambient noise. The acquisitions were done in Force mapping mode (FM). AFM experiments were carried out in PBS at room temperature, using silicon nitride MLCT-E cantilevers (Bruker) with a nominal spring constant of $\sim 0.1 \text{ N m}^{-1}$ for Matrigel experiments. Maps of 5×5 force–distance curves were recorded with a $20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$ scan area, at a z-piezo velocity (approach and retraction) of $5 \mu\text{m s}^{-1}$ and a ramp size of $30 \mu\text{m}$. The indentation force was set at 1 nN. At least three force maps on a minimum of three different gels were analyzed. Cantilever calibration was performed following the standard thermal noise method. We measured the deflection sensitivity by doing a linear fit of the contact part of a force curve acquired on sapphire in PBS. Then, we determined the spring constant by acquiring the thermal noise spectrum of the cantilever and fitting the first normal mode peak using a single harmonic oscillator model. The same tip was used for several experiments in different days as long as possible. To reduce the offsets in force that can be introduced by each new calibration, especially by the measurements of the deflection sensitivity, we followed the SNAP protocol²⁵.

In the mixing approach, 60 μl of Matrigel matrix (Corning, #356231) was gently mixed with 10% recombinant netrin-3 protein (R&D) in PBS-0.1% BSA on ice and pipetted into a preformed ring with an inner diameter of 1 cm in a precooled 30 mm culture dish and incubated for 20 min at 37 °C. The Matrigel sample was then immersed in 3 ml of PBS and transferred to the AFM stage for measurements.

Statistical analysis

Statistical tests were performed using GraphPad Prism software. Sample sizes were determined based on our past experience with comparable experiments (3-4 biological replicates for in vitro assays and 10-12 mice per group for in vivo studies). Data are represented as means +/- standard error of the mean (SEM) unless otherwise specified. Statistical significance was evaluated by the Mann-Whitney U-test, Student's unpaired t tests with 95% confidence intervals or one-way ANOVA depending on the experiment and p values under 0.05 considered statistically significant. Further details are provided in the corresponding figure legends. Survival curves were generated according to the Kaplan-Meier method. Data were analyzed with a Mantel-Cox test.

CONFLICTS OF INTEREST

DG and PM declare to have a conflict of interest as an employee (DG) and as the founder and shareholder (PM) of NETRIS Pharma, respectively.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Brigitte Manship for proofreading the manuscript. This work was supported by institutional grants from Centre Léon Bérard (BG), ANR JCJC (BG), and industrial ANR (BG).

REFERENCES

1. Chédotal, A. Roles of axon guidance molecules in neuronal wiring in the developing spinal cord. *Nat Rev Neurosci* **20**, 380–396 (2019).
2. Dominici, C. *et al.* Floor-plate-derived netrin-1 is dispensable for commissural axon guidance. *Nature* **545**, 350–354 (2017).
3. Gibert, B. & Mehlen, P. Dependence Receptors and Cancer: Addiction to Trophic Ligands. *Cancer Res.* **75**, 5171–5175 (2015).
4. Grandin, M. *et al.* Structural Decoding of the Netrin-1/UNC5 Interaction and its Therapeutical Implications in Cancers. *Cancer Cell* **29**, 173–185 (2016).
5. Lengrand, J. *et al.* Pharmacological targeting of netrin-1 inhibits EMT in cancer. *Nature* **620**, 402–408 (2023), doi:10.1038/s41586-023-06372-2.
6. Cassier, P. A. *et al.* Netrin-1 blockade inhibits tumour growth and EMT features in endometrial cancer. *Nature* **620**, 409–416 (2023), doi:10.1038/s41586-023-06367-z.
7. Reuten, R. *et al.* Structural decoding of netrin-4 reveals a regulatory function towards mature basement membranes. *Nat Commun* **7**, 13515 (2016).
8. Francescone, R. *et al.* Netrin G1 Promotes Pancreatic Tumorigenesis through Cancer-Associated Fibroblast–Driven Nutritional Support and Immunosuppression. *Cancer Discov* **11**, 446–479 (2021).
9. Jiang, S. *et al.* Targeting netrin-3 in small cell lung cancer and neuroblastoma. *EMBO Mol Med* **13**, (2021).
10. Nakazawa, K. *et al.* Specific organ metastases and survival in small cell lung cancer. *Oncology Letters* **4**, 617–620 (2012).
11. Gay, C. *et al.* Patterns of transcription factor programs and immune pathway define four major subtypes of SCLC with distinct therapeutic vulnerabilities. *Cancer Cell* **3**, 346–360 (2021).
12. Yang, D. *et al.* Axon-like protrusions promote small cell lung cancer migration and metastasis. *eLife* **8**, e50616 (2019).
13. Carney, D. *et al.* Establishment and identification of small cell lung cancer cell lines having classic and variant features. *Cancer Res.* **45**, 2913–2923 (1985).
14. Calbo, J. *et al.* A functional role for tumor cell heterogeneity in a mouse model of small cell lung cancer. *Cancer Cell* **19**, 244–256 (2011).
15. Lim, J. *et al.* Intratumoral heterogeneity generated by Notch signaling promotes small cell lung cancer. *Nature* **545**, 360–364 (2017).

16. Serafini, T. *et al.* Netrin-1 Is Required for Commissural Axon Guidance in the Developing Vertebrate Nervous System. *Cell* **87**, 1001–1014 (1996).
17. Serafini, T. *et al.* The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* **78**, 409–424 (1994).
18. Desgrosellier, J. *et al.* Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* **10**, 9-22 (2010).
19. George, J. *et al.* Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature* **524**, 47–53 (2015).
20. Chan, J. *et al.* Signatures of plasticity, metastasis and immunosuppression in an atlas of human small cell lung cancer. *Cancer Cell* **11**, 1479-1496 (2021).
21. Perampalam, P. *et al.* Netrin signaling mediates survival of dormant epithelial ovarian cancer cells. *eLife*, RP91766 (2024).
22. Dobin, A. *et al.* STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **1**, 15-21 (2013).
23. Love, M. *et al.* Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**, 550 (2014).
24. Korotkevich, G. *et al.* Fast gene set enrichment analysis. *BioRxiv* 060012, doi : <https://doi.org/10.1101/060012> (2021).
25. Schillers, H. *et al.* Standardized Nanomechanical Atomic Force Microscopy Procedure (SNAP) for measuring Soft and Biological Samples. *Sci Rep* **7**, 5117 (2017).

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Netrin-3 is selectively expressed in non-adherent SCLC cells.

(A) Representative bright-field images of floating (top row) and adherent (bottom row) H82 (left) and H446 (right) cells after 3 weeks of culture. F : floating cells; A : adherent cells. Scale bar : 100 μ m.

(B) Schematic illustration of floating and adherent cells isolation. Protein and RNA were then extracted and respectively sent for immunoblotting or transcriptomic analysis.

(C) Immunoblot analysis of NE, non-NE and SCLC subtype markers in H82 floating and adherent cell lysates.

(D) Volcano plot of differentially expressed (DE) genes in H82 floating cells compared to adherent cells. Significant DE genes enriched in floating cells are shown in fuchsia boxes, whereas DE genes enriched in adherent cells are shown in blue boxes.

(E) Representative immunoblots of netrin-3 (NTN3) and netrin's putative receptors in H82 floating and adherent cell lysates.

(F) Differential netrin-3 expression across 40 suspension or adherent growing human SCLC cell lines from UTSW set. Each dot represents a different cell line. Data indicate means with SEM. The evaluation of statistical significance was conducted using a Mann-Whitney U-test.

Figure 2. Netrin-3 reduces cell anchorage and enhances tumor progression.

(A) Efficient overexpression of netrin-3 in H69AR cells.

(B) Representative images of netrin-3 overexpressing cells (bottom row) compared to control cells (top row) after 1 (left) or 3 (right) weeks of culture. F : floating cells; A : adherent cells. Scale bar : 100 μ m.

(C) Cell adhesion quantification of netrin-3 overexpressing cells compared to control cells. Representative images are shown, and data were pooled from three biological replicates. Data indicate means with SEM. The evaluation of statistical significance was conducted using a Mann-Whitney U-test.

(D) Heatmap of differentially expressed genes in NTN3_High and NTN3_Low SCLC human primary tumors from George et al.¹⁹

(E) GSEA of G2M Checkpoint (top) and Mitotic Spindle (bottom) signatures in NTN3_High versus NTN3_Low patient tumor transcriptomes from George et al.¹⁹

(F) Cell proliferation assay between netrin-3 overexpressing cells compared to control cells. Data indicate means with SD from four biological replicates. The evaluation of statistical

significance was conducted using multiple Mann-Whitney U-tests.

(G) Tumor growth analysis of NMRI Nude mice bearing H69AR-Ntn3 (n=10) and H69AR-Ctrl (n=10) tumors. Data indicate means with SEM. The evaluation of statistical significance was conducted using multiple Mann-Whitney U-tests.

(H) Kaplan-Meier survival curves of NMRI Nude mice bearing H69AR-Ntn3 (median survival 54 months) or H69AR-Ctrl (median survival 78.5 months) tumors. The evaluation of statistical significance was conducted using a log-rank (Mantel-Cox) test.

Figure 3. Netrin-3 binds and modulates the structural stability of the ECM.

(A) Immunogold labeling of netrin-3 in H69AR-Ntn3 and H69AR-Ctrl cells with anti-NTN3 antibody (each black dot represents NTN3-gold particle of 15nm). LysI : lysosome I, M : mitochondria, P : cell protrusion, RER : rough endoplasmic reticulum. Scale bar : 0.2 μ m.

(B) Netrin-3 protein quantification by immunoblot of H69AR-Ntn3 and H69AR-Ctrl cells harvested under denaturing (SDS lysis buffer) and non-denaturing conditions.

(C) Immunoblot quantification of soluble netrin-3 protein in H69AR-Ntn3 and H69AR-Ctrl cell concentrated supernatants upon treatment with heparin sodium salt.

(D) Representative immunofluorescence images of ECM supplemented with vehicle (PBS) or recombinant human netrin-3 (rhNTN3) protein and immunostained for collagen-IV (blue), laminin-111 (red) or NTN3 (grey). Scale bar : 100 μ m.

(E) ECM pore area quantification in presence of vehicle (PBS) or rhNTN3. Each dot represents an individual pore. Data indicate means with SD. The evaluation of statistical significance was conducted using a Mann-Whitney U-test.

(F) Mechanical properties as Young's Modulus (Pa) of ECM supplemented with vehicle (PBS) or rhNTN3 protein. Data indicate means with SD. The evaluation of statistical significance was conducted using an unpaired t-test.

Figure 4. Netrin-3 affects cell anchorage by regulating the FAK signaling pathway.

(A) Top predicted kinases regulated in H69AR-Ntn3 cell lysate compared to H69AR-Ctrl cell lysate visualized on the Coral kinome tree plot. Branch and node colors indicate mean kinase statistic and represent overall change of the peptide set encoding the kinase with value <0 for lower activity in H69AR-Ntn3 cells. The average kinase scores, represented by node size, were used to rank kinases in terms of their significance and specificity regarding the set of peptides.

(B) Enrichr analysis of biological pathways (BioPlanet 2019) significantly downregulated in H69AR-Ntn3 cells compared to control cells. The top-ten pathways ranked by the log of p-

value are shown.

(C) Representative immunoblots of netrin-3 overexpressing and control cell lysates as indicated.

(D) Efficient knockdown of netrin-3 in H82 cells.

(E) Representative immunoblots of netrin-3 knockdown or control H82 cells.

(F) Immunoblot analysis of netrin-3 overexpressing and control cells transfected with UNC5B and/or NEO1 or Control siRNA as indicated.

Figure 5. Netrin-3 modulates cell adhesion through β 1 integrin signaling.

(A) Representative immunoblots showing integrins expression in H69AR-Ntn3 and H69AR-Ctrl cells, as indicated.

(B) Ongoing work.

(C) Representative immunoblots showing integrins expression in netrin-3 knockdown or control H82 cells, as indicated.

(D) Biolayer interferometry binding kinetic analysis of netrin-3 to α 1 β 1 integrin (top left), α V β 1 integrin (top right), α 6 β 1 (bottom left) and α 7 β 1 (bottom right).

(E) Equilibrium dissociation constant (Kd) calculation after biolayer interferometry analysis.

Figure 6. Netrin-3 expression is elevated in SCLC-N subtype and facilitates metastatic progression of the disease.

(A) Heatmap of relative gene expression of netrin-3 and key transcription factors defining SCLC subtypes, including primary tumors from George et al.¹⁹ (n=81). Clustering was computed using the R statistical environment.

(B) Pearson correlation between NEUROD1 and netrin-3 (NTN3) expression (Pearson : 0.43, p<0.0001) in primary tumors from George et al.¹⁹ cohort. Each dot represents an independent tumor sample.

(C) Differential expression of NTN3 across 70 human SCLC cell lines within each SCLC subtype. RNA-seq data were taken from public UTSW set available on SCLC-CellMiner. The evaluation of statistical significance was conducted using an ordinary one-way ANOVA test.

(D) Ongoing work.

(E) Representative images of SCLC patient blood cells fixed and immunostained for netrin-3 (red), white blood cells (CD45+/CD41+, green) and nucleus (blue). Scale bar : 100 μ m.

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Supplementary Figure 1, Related to Figure 1. Netrin-3 is selectively expressed in non-adherent SCLC cells.

(A) Differential expression of NE markers across 70 human SCLC cell lines within each SCLC subtype, including comparison of mean expression of ChgA (left) and SYP (right). RNA-seq data were taken from public UTSW set available on SCLC-CellMiner. The evaluation of statistical significance was conducted using an ordinary one-way ANOVA test.

(B) GSEA of hallmarks downregulated in H82 floating cells compared with H82 adherent cells.

(C) Volcano plot of normalized microarray gene analysis of non-NE (GFP^{high}) compared with NE (GFP^{neg}) SCLC tumor cells sorted from four Hes1GFP/+ mice tumors (Lim et al.¹⁵).

(D) Enrichr analysis of biological pathways (BioPlanet 2019) significantly enriched in NE (GFP^{neg}) cells. The top eight pathways ranked by the log of q-value are shown.

Supplementary Figure 2, Related to Figure 3. Netrin-3 binds and modulates the structural stability of the ECM.

(A) Representative confocal microscopy images of H69AR-Ntn3 and H69AR-Ctrl cells grown on coverslips for 4 days, fixed and immunostained for netrin-3 (red), plasma membrane (orange) and nucleus (blue). Scale bar : 75 μ m.

(B) Ongoing work.

Supplementary Figure 3, Related to Figure 4. Netrin-3 affects cell anchorage by regulating the FAK signaling pathway.

(A) Top downregulated kinases in H69AR-Ntn3 compared to H69AR-Ctrl cells ranked by median kinase statistic. Colors indicate kinase family.

(B) Top predicted upstream kinases in netrin-3 knockdown H82 cells compared to control cells visualized on the Coral kinome tree plot.

(C) Enrichr analysis of biological pathways (BioPlanet 2019) significantly upregulated in netrin-3 knockdown H82 cells compared to control cells. The top-ten pathways ranked by the log of p-value are shown.

Supplementary Figure 4, Related to Figure 6. Netrin-3 modulates cell adhesion through β 1 integrin signaling.

(A) Principal component analysis (PCA) of normalized gene expression values of SCLC patient

tumors from George et al.¹⁹, patients are coloured according to their NTN3_High or NTN3_Low expression.

(B) PCA of normalized gene expression values of SCLC patient tumors from George et al.¹⁹, patients are coloured according to their subtype assignment.

Supplementary Table 1, Related to Figure 6. Netrin-3 expression is elevated in SCLC-N subtype and facilitates metastatic progression of the disease.

Figure 1.

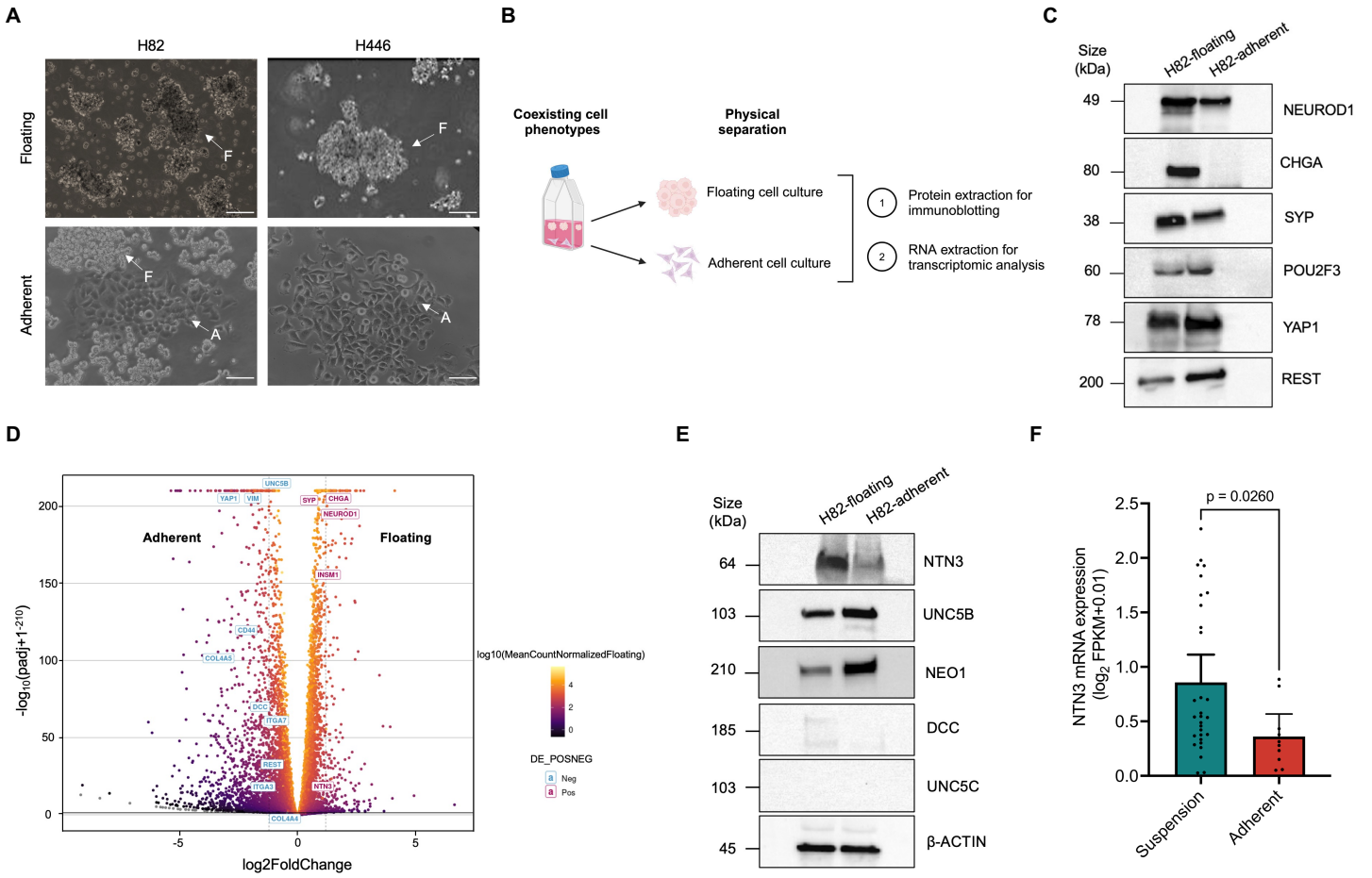


Figure 2.

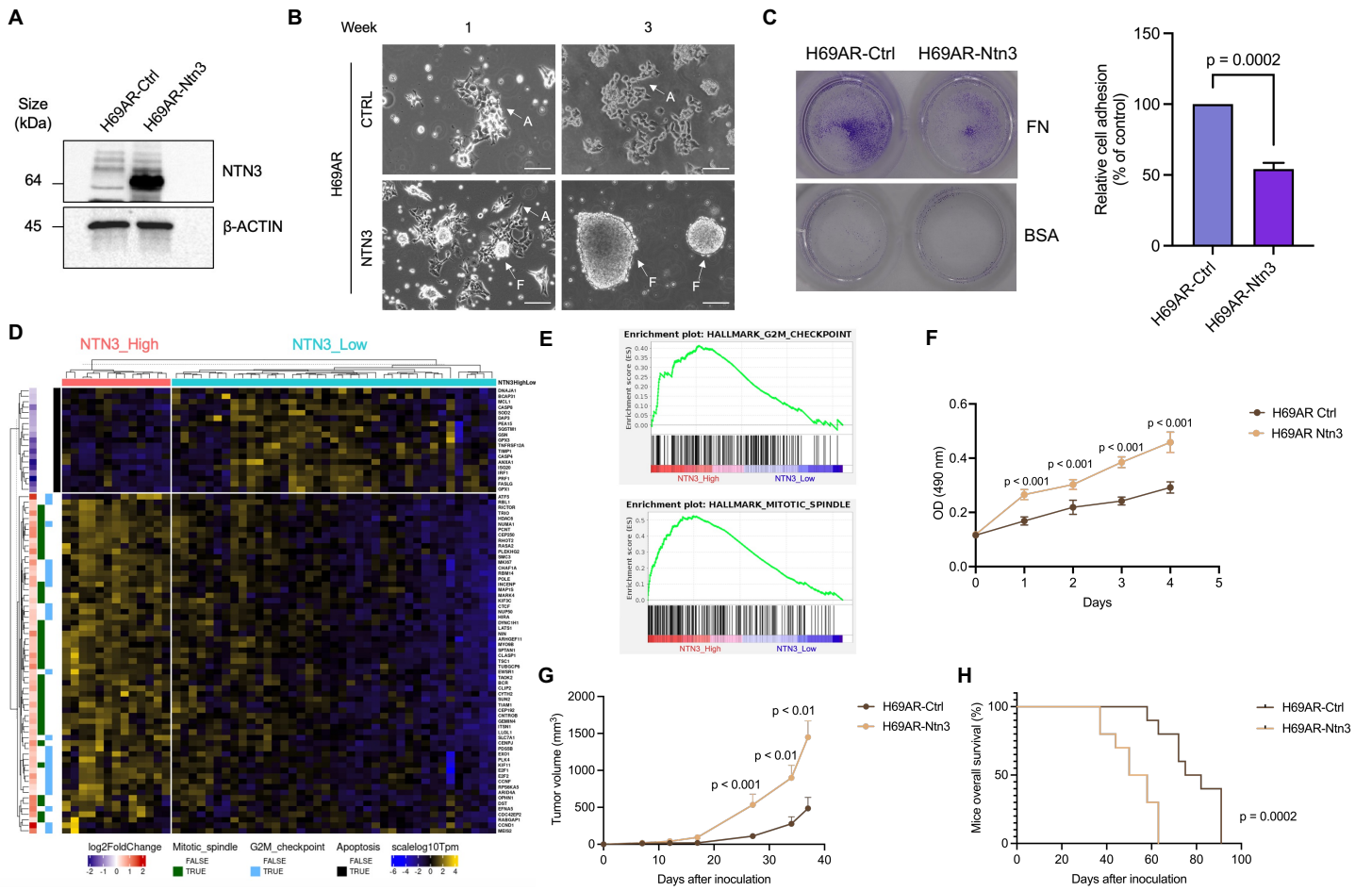


Figure 3.

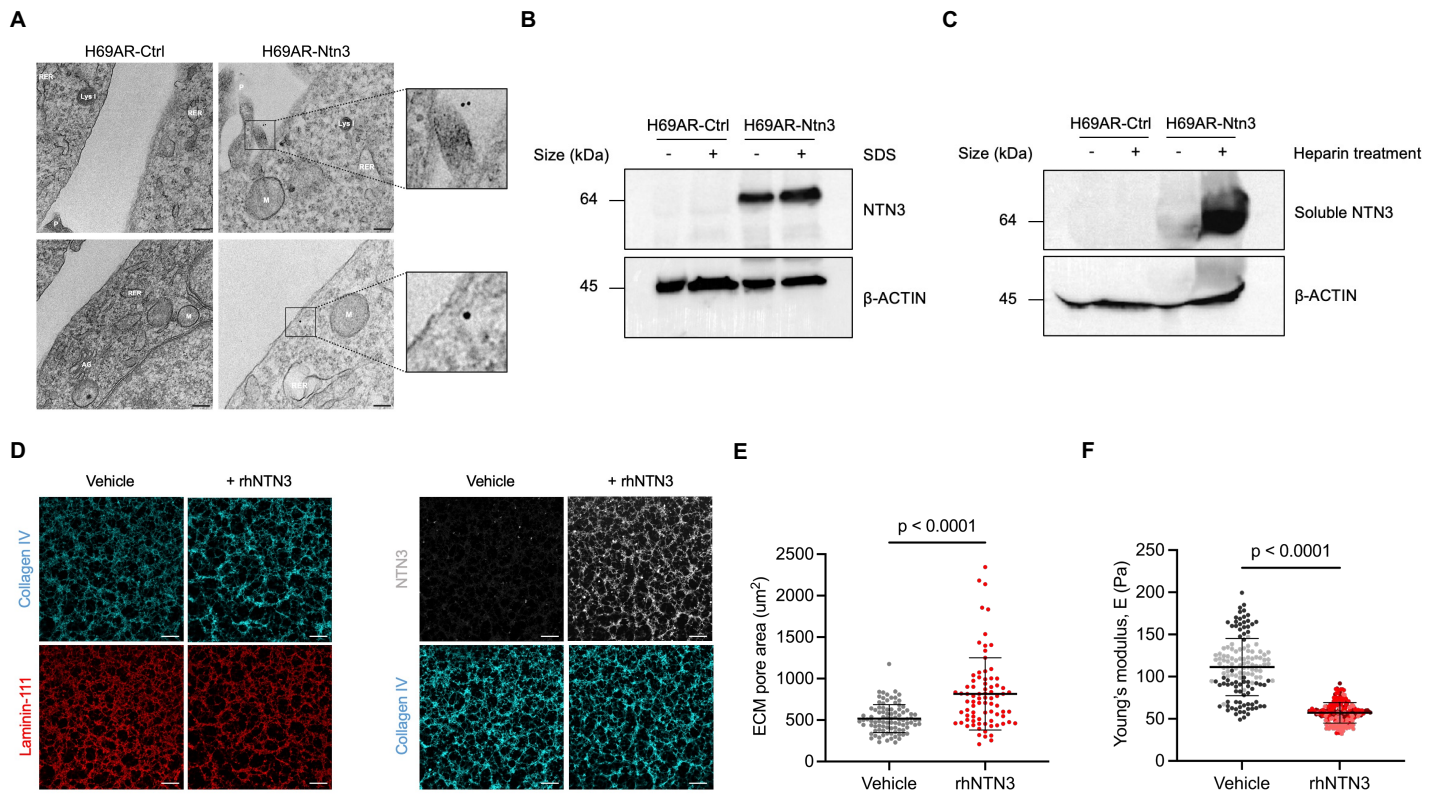


Figure 4.

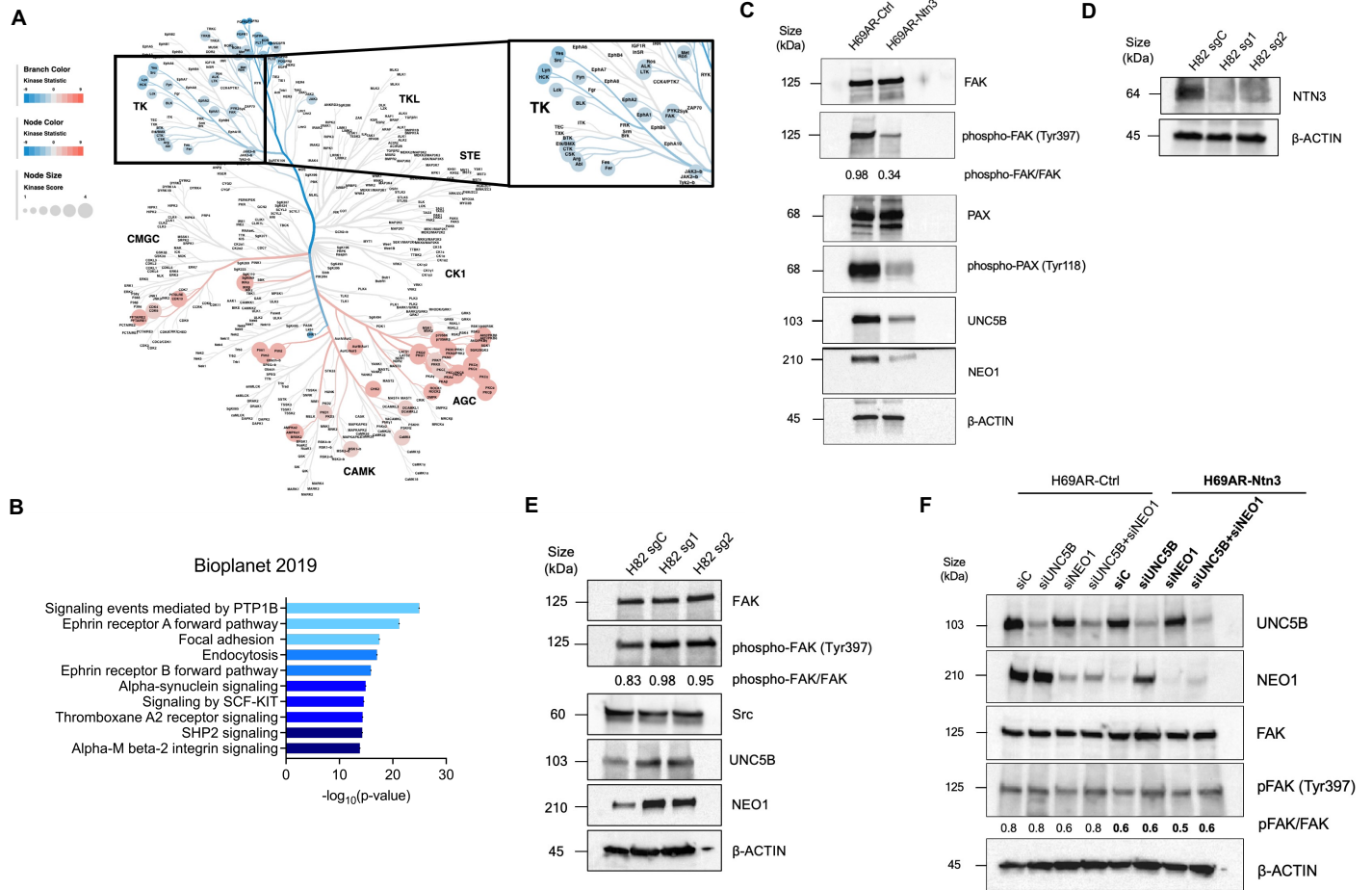
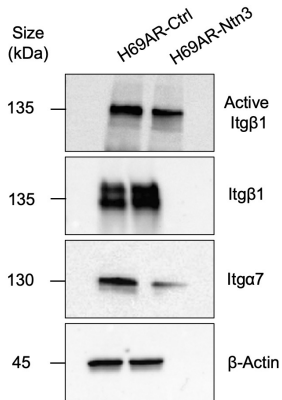
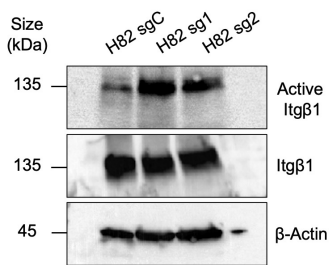


Figure 5.

A



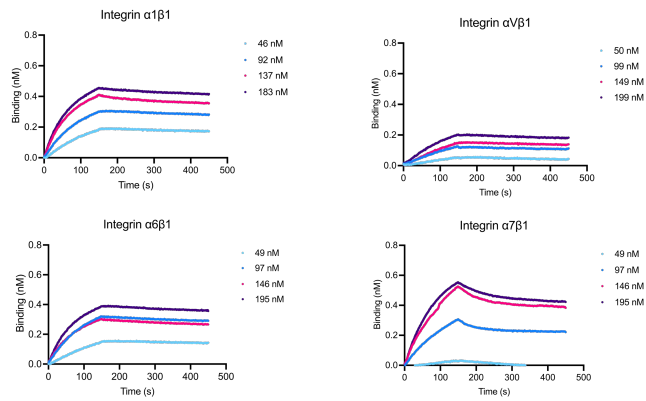
C



B

Ongoing work
Confirmation of ITGβ1, ITGαV and ITGα7
expression by confocal microscopy

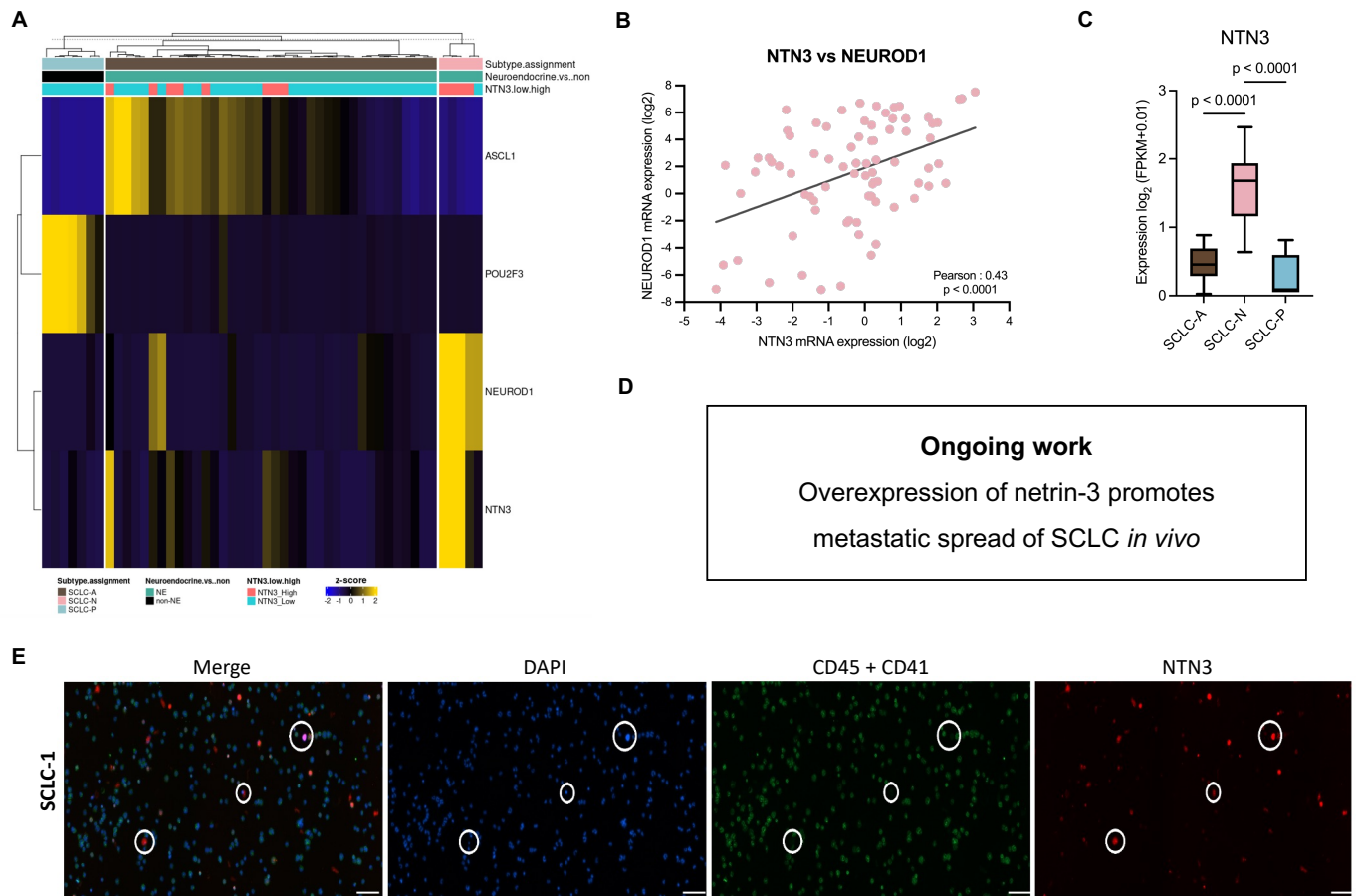
D



E

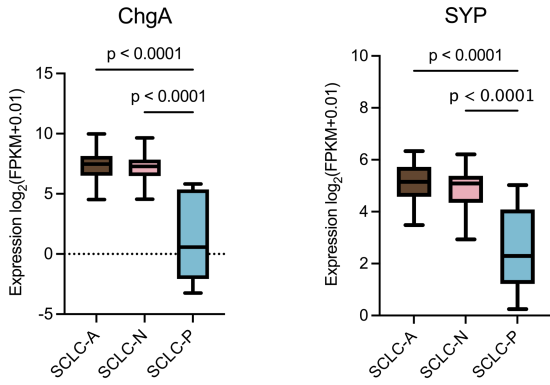
	rhIntegrin α1β1	rhIntegrin αVβ1	rhIntegrin α6β1	rmIntegrin α7β1
rhNTN3	3.69 ± 0.1nM	13.1 ± 3nM	4.05 ± 0.8nM	14.3 ± 3nM

Figure 6.

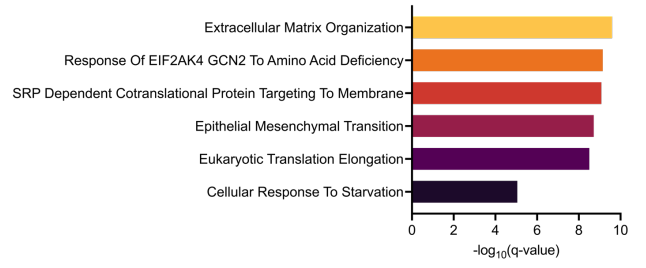


Supplementary Figure 1.

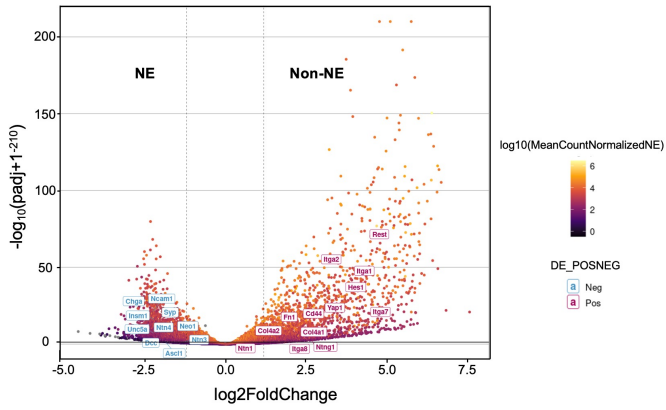
A



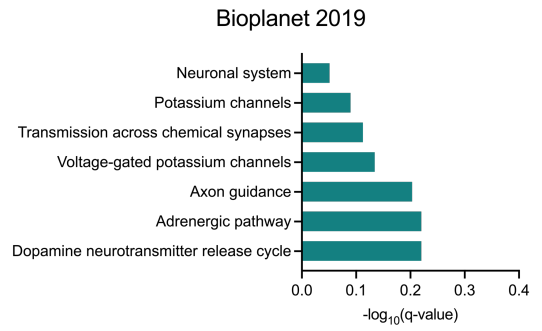
B



C

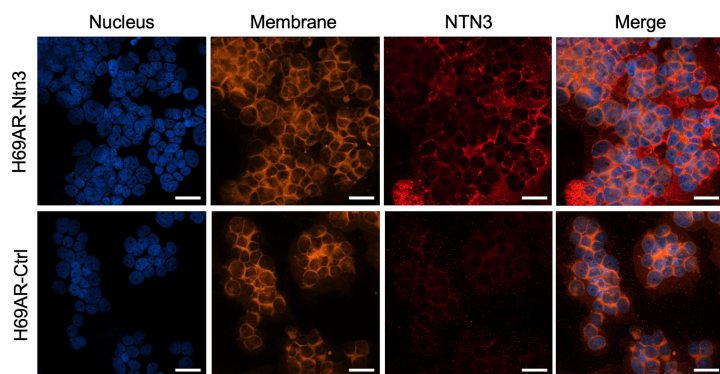


D



Supplementary Figure 2.

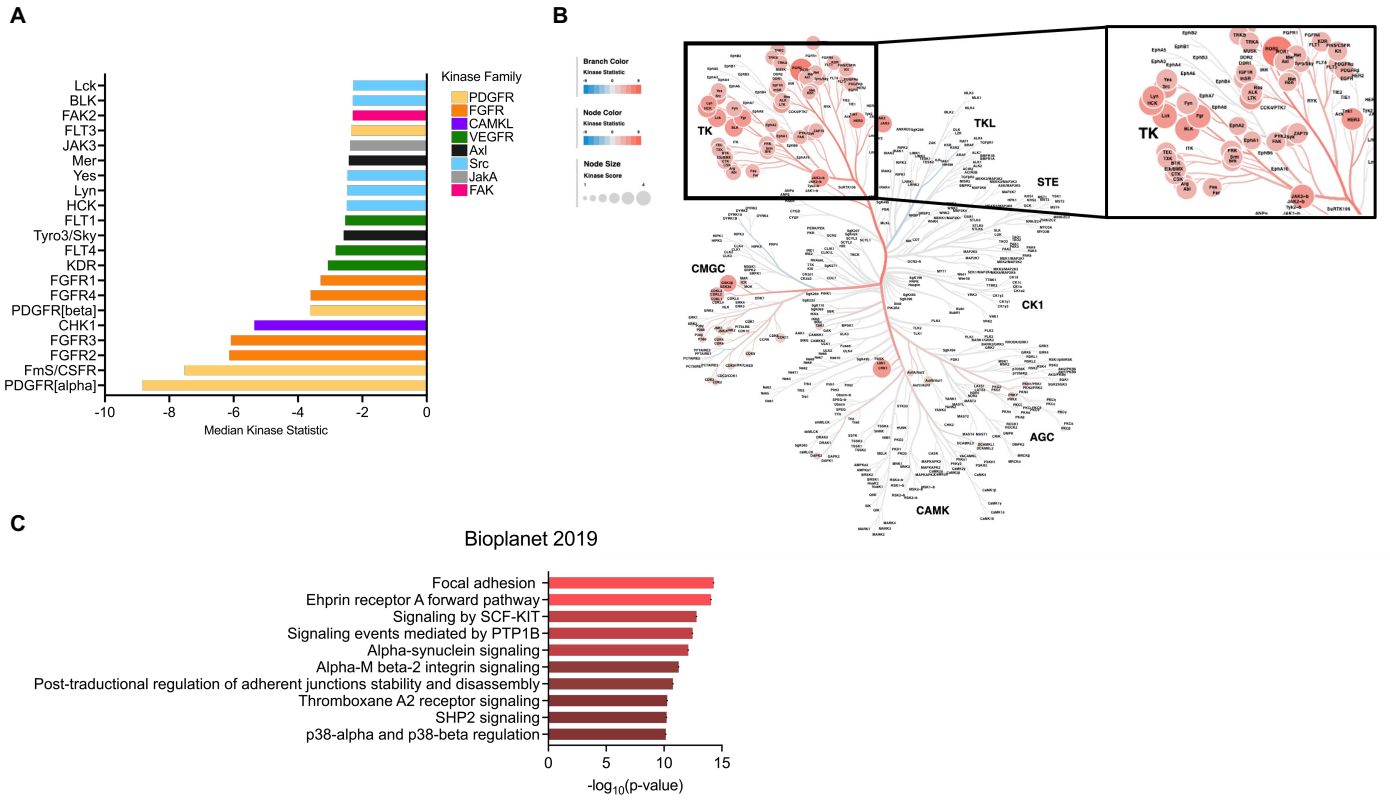
A



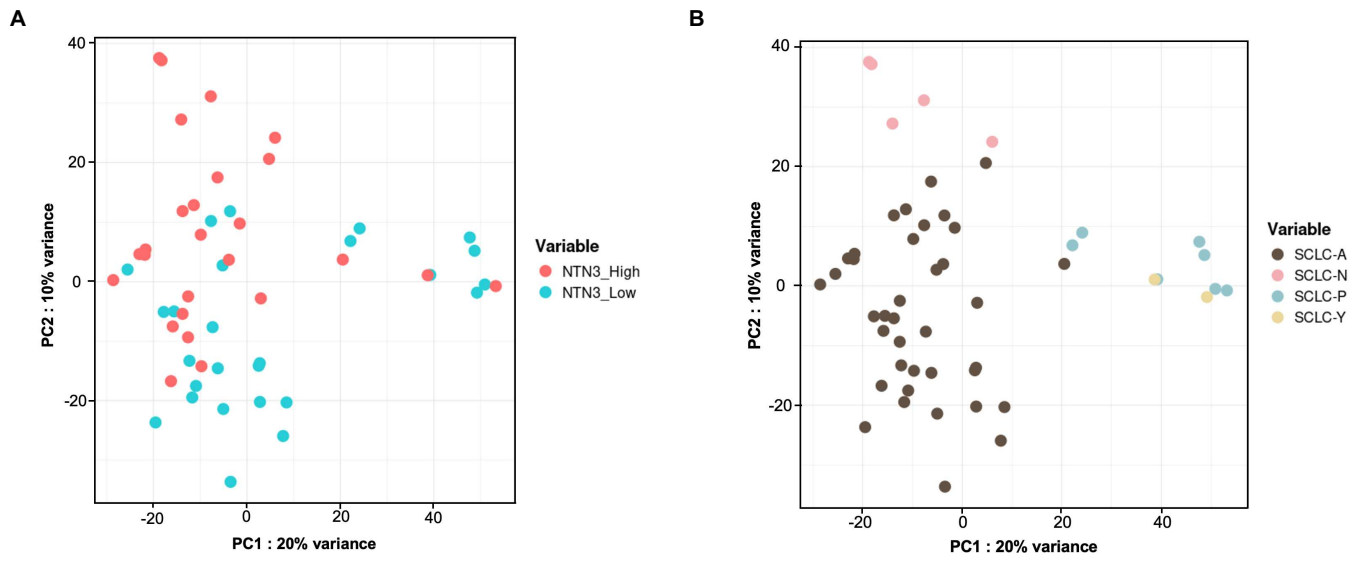
B

Ongoing work
Netrin-3 promotes cellular migration *in vitro*

Supplementary Figure 3.



Supplementary Figure 4.



Supplementary Table 1.

Table S1. NTN3+ CTC counts and clinical characteristics of patients with small cell lung cancer		
Anonymization	CTC counts	Clinical information
SCLC-1	15 NTN3-positive out of 21 CD45-negative in 7.5ml blood sample	86-year-old patient, smoker (50 packs/year), who has been abstinent since March 2024, presents with a pulmonary lesion and multiple hepatic lesions, along with right supraclavicular lymphadenopathy. Ultrasound-guided biopsy of the supraclavicular lymph node reveals small cell neuroendocrine carcinoma, positive for synaptophysin and chromogranin A (+ +), Ki67 index of 70%
SCLC-2	14 NTN3-positive out of 64 CD45-negative in 7.5ml blood sample	69-year-old patient, active smoker (50 packs/year), presents with a lung lesion and hepatic, pancreatic, and bone metastases. Brain MRI is normal. Fine-needle aspiration of the left supraclavicular lymph node reveals a small cell neuroendocrine carcinoma, chromogranin A negative, Ki67 index of 100%
SCLC-3	11 NTN3-positive out of 15 CD45-negative in 7.5ml blood sample	72-year-old patient, active smoker (55 packs/year), with a lung lesion in the right upper lobe with emphysema, mediastinal lymphadenopathy, and hepatic metastases. Transbronchial fine-needle aspiration reveals a small cell neuroendocrine bronchial carcinoma, chromogranin A and synaptophysin positive, TTF1 positive, Ki67 index of 50%
SCLC-4	23 NTN3-positive out of 98 CD45-negative in 7.5ml blood sample	90-year-old patient, former smoker, with a large lung lesion in the left upper lobe and lymphadenopathy, but no extrathoracic involvement. Endobronchial biopsy reveals a small cell neuroendocrine carcinoma, chromogranin and synaptophysin positive, TTF1 positive, Ki67 index >90%

Discussion et perspectives

Les travaux réalisés au cours de ma thèse ont abouti à la première caractérisation détaillée d'un mécanisme d'action de la Nétrine-3, offrant ainsi de nouvelles perspectives sur la compréhension de la plasticité tumorale dans le cancer bronchique à petites cellules et révélant un nouveau mécanisme d'invasion spécifique à cette pathologie (**Figure 28**). La Nétrine-3 est exprimée dans les tumeurs neuroendocrines, en particulier dans le sous-type CBPC-N. Les cellules de ce sous-type se distinguent par leur prolifération rapide, leur croissance non/peu-adhérente et leur forte prévalence dans les métastases distantes des patients atteints de CBPC. Nos résultats soulignent que la Nétrine-3 est indispensable à la survie des cellules « flottantes » et favorise leur motilité en perturbant leur ancrage à la matrice extracellulaire. De plus, sa seule expression est suffisante pour moduler la formation des adhésions focales en inhibant l'activité de la voie de signalisation FAK, un processus qui semble constituer une étape clé dans la dissémination métastatique de la maladie.

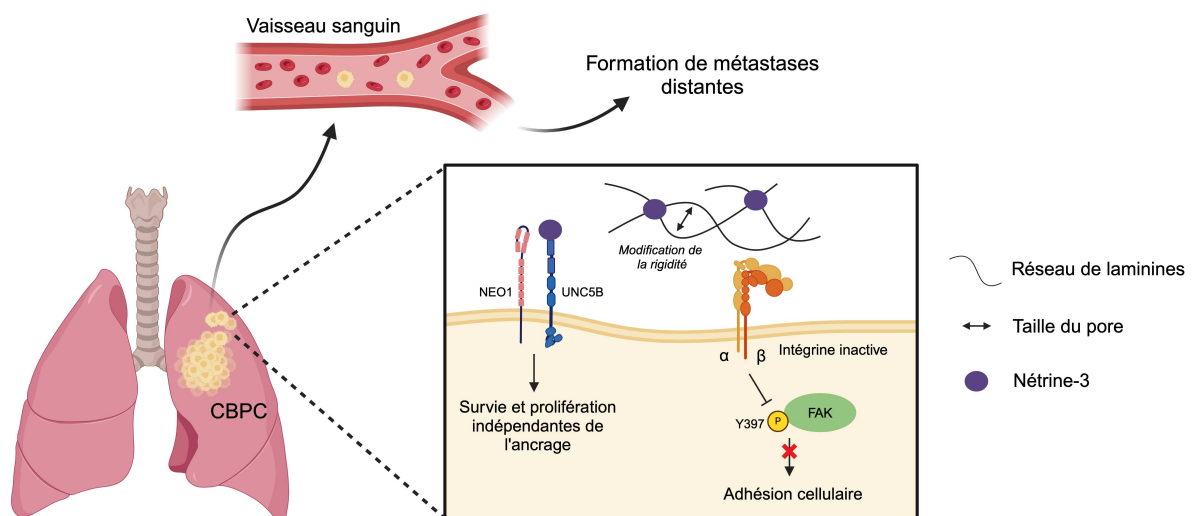


Figure 28 : Schéma hypothétique de la signalisation de la Nétrine-3 dans le CBPC

Ces résultats ouvrent la voie à une nouvelle approche thérapeutique pour les patients atteints de cette maladie. Il serait en effet pertinent d'évaluer l'efficacité d'un traitement ciblant spécifiquement les cellules flottantes, afin de prévenir leur adhésion et leur progression vers un état non-neuroendocrine et chimiorésistant. Cette stratégie pourrait se révéler plus prometteuse

que le traitement des cellules adhérentes déjà établies avec des inhibiteurs de FAK, dans le but de contourner la résistance.

Dans cette section, nous commencerons par discuter des difficultés et des limites rencontrées au cours de cette étude. Ensuite, nous aborderons chacune des découvertes présentées dans le manuscrit de l'article pour mettre en lumière les hypothèses et questions qu'elles soulèvent d'un point de vue mécanistique et pathologique. Enfin, nous analyserons les perspectives diagnostiques et thérapeutiques de ces résultats pour la prise en charge clinique des patients.

I. Difficultés rencontrées et limites de l'étude

- Les outils moléculaires

Le manque d'outils moléculaires adaptés pour l'étude de la Nétrine-3 a été la principale difficulté rencontrée au cours de mon projet de thèse. Depuis sa découverte en 1999, cette protéine est restée une cible peu décrite, principalement en raison de l'absence d'outils fiables pour étudier les processus biologiques qui lui sont associés. À mon arrivée au laboratoire, nous avons été confrontés à un changement de lot des lapins immunisés pour la production de l'anticorps polyclonal commercial dirigé contre la Nétrine-3 (Abcam, #185200), ce qui a entraîné une diminution significative de la réactivité de l'anticorps et a compromis la sensibilité de la détection de la cible. Malgré de nombreux essais de validation avec divers lots d'anticorps, nous ne sommes jamais parvenus à détecter les niveaux d'expression endogène de la Nétrine-3 chez les lignées cellulaires de CBPC, pourtant préalablement sélectionnées pour leur haute expression de la cible par RT-qPCR. Cette incapacité à détecter, isoler et quantifier la protéine par Western blot ou par immunohistochimie dans les échantillons biologiques a considérablement retardé notre compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la maladie. En 2022, nous avons donc sollicité la société Covalab (Lyon, France) pour développer un nouvel anticorps polyclonal anti-Nétrine-3 à partir de peptides hautement immunogènes. Après un protocole d'immunisation de 88 jours et la validation de l'anticorps purifié, nous avons pu à nouveau détecter la protéine au sein de nos échantillons.

Comme mentionné dans l'introduction, nos premières tentatives d'identification des partenaires protéiques de la Nétrine-3 ont été réalisées avec la protéine Nétrine-2 de poulet recombinante,

en raison de l'échec de production rencontré avec la Nétrine-3 humaine recombinante. En effet, la protéine présentait des problèmes d'agrégation qui ont entraîné des difficultés de purification et une perte d'activité biologique. Grâce à l'émergence de nouvelles stratégies de production, nous avons finalement obtenu une protéine recombinante humaine pour la Nétrine-3 quelques années plus tard. Nous avons alors reproduit les analyses de l'interaction entre la Nétrine-3, les récepteurs de la Nétrine-1 et l'anticorps NP137 décrites dans l'article de Jiang et al. (**Annexe 1**). Les résultats ont montré des différences par rapport à ceux obtenus avec la Nétrine-2 de poulet, suggérant que la Nétrine-3 n'est pas un orthologue strict de la Nétrine-2. En effet, l'affinité mesurée entre la Nétrine-3 et le récepteur DCC est nettement plus élevée que celle mesurée pour la Nétrine-2, tandis que l'affinité mesurée pour le récepteur NEO1 est plus faible. Cette observation souligne l'importance cruciale de disposer d'outils spécifiques pour améliorer la fiabilité de nos recherches.

- Le statut sécrété de la Nétrine-3

Les protéines sécrétées se trouvent souvent à des concentrations plus faibles dans les échantillons biologiques par rapport aux protéines intracellulaires, ce qui complique leur détection. De plus, elles peuvent être associées à la matrice extracellulaire ou à d'autres composants du milieu de culture, rendant leur purification encore plus difficile. La nature sécrétée de la Nétrine-3 a donc constitué un défi majeur pour sa détection et sa quantification. Pour surmonter ces difficultés, nous avons employé les stratégies spécifiques suivantes : (i) lyse cellulaire dans un volume réduit de tampon contenant du dodécyl sulfate de sodium (SDS), un détergent capable de solubiliser les protéines de la matrice ; (ii) traitement avec du milieu conditionné à l'héparine pour séparer les protéines de la matrice liées aux cellules cultivées en 2D et les concentrer dans le surnageant ; (iii) concentration des lysats cellulaires préalablement au chargement des protéines sur le gel d'électrophorèse à l'aide d'une colonne de concentration.

- La culture des lignées cellulaires de CBPC

La recherche préclinique sur le CBPC repose principalement sur des méthodes traditionnelles telles que les cultures cellulaires et les modèles animaux, en raison des difficultés d'accès au matériel tumoral frais (Gazdar et al., 2010; Solta et al., 2024). Comme son nom l'indique, ce cancer est caractérisé par des cellules de très petite taille, ce qui entraîne une quantité réduite

de matériel génétique et protéique. Ce matériel est souvent de faible qualité ou dégradé, ce qui complique la réalisation des expérimentations *in vitro* et *in vivo*.

Bien que les tumeurs de CBPC se développent très rapidement, l'établissement et le maintien à long terme des cultures cellulaires se sont révélés complexes et chronophages. En effet, la majorité des cellules tumorales de CBPC ne présentent pas de propriétés adhérentes et se développent sous la forme d'agrégats tridimensionnels ou « sphéroïdes » en suspension, nécessitant des milieux de culture spécifiques. Ces agrégats cellulaires, constituant les seules populations viables de cellules de CBPC, sont particulièrement sensibles aux variations des conditions de culture. Une attention particulière doit par exemple être portée à la densité cellulaire car une faible confluence peut sérieusement compromettre leur viabilité, et la disruption des agrégats entraîne l'arrêt de la croissance et la mort cellulaire. Cela complique les tests biologiques, tels que les tests de viabilité au MTS, et rend difficile le comptage précis des cellules, affectant ainsi la reproductibilité des résultats.

Nous avons également rencontré des difficultés majeures lors de la génération de lignées cellulaires modifiées et des transfections de siRNA, en raison de rendements d'infection ou de transfection nettement inférieurs avec des cellules en suspension. Cela a nécessité une adaptation de tous nos protocoles pour maintenir les lignées modifiées à long terme, avec des vérifications fréquentes de la surexpression ou de l'inhibition des gènes cibles, tant au niveau transcriptionnel que traductionnel. En outre, l'évaluation de l'adhésion et du potentiel migratoire est plus complexe chez les cellules en suspension que chez les cellules adhérentes, ce qui nous a contraints à sélectionner des lignées adhérentes pour certains tests *in vitro*.

- Apports et limites des données publiques de séquençage

La nature hétérogène du CBPC, son évolution rapide, ainsi que la rareté des résections chirurgicales ont historiquement limité la constitution de cohortes et de bases de données RNA-seq et scRNA-seq pour cette maladie. Ce manque d'accès à ces ressources a considérablement entravé les progrès de la recherche, rendant plus difficile la validation des résultats obtenus à partir de modèles *in vitro* chez les patients. Dans le cadre de mon projet de thèse, nous avons utilisé les données RNA-seq de l'unique cohorte de tumeurs de patients disponible pour la communauté scientifique (George et al., 2015, n=81 tumeurs). Le faible nombre de tumeurs dans cette cohorte constitue une limitation importante, car elle risque de ne pas être

représentative de l'ensemble de la pathologie, nécessitant ainsi une validation supplémentaire dans d'autres cohortes. Pour pallier le manque d'échantillons frais disponibles et renforcer les résultats de mon projet de thèse, nous avons également utilisé la ressource en ligne de lignées cellulaires dérivées de patients atteints de CBPC appelée SCLC-CellMiner (Tlemsani et al., 2020), accessible à l'adresse suivante : <https://discover.nci.nih.gov/rsconnect/SclcCellMinerCDB/>.

Bien que précieuses, les lignées cellulaires présentent certaines limites. Plusieurs études ont révélé qu'elles peuvent subir une dérive transcriptomique au fil des passages ou lorsqu'elles sont cultivées dans différents laboratoires, ce qui soulève des inquiétudes quant à leur fidélité par rapport aux échantillons cliniques. Cependant, d'autres études ont souligné l'importance des panels de lignées cellulaires humaines pour la recherche (Barretina et al., 2012; Reinhold et al., 2019). En ce qui concerne les lignées de cancer du poumon, la dérive génétique au cours de la culture cellulaire n'est pas prédominante (Wistuba et al., 1999). En effet, des analyses récentes des lignées de CBPC, des modèles PDX et des tissus humains confirment que les caractéristiques moléculaires du CBPC restent stables, comme le démontre la base de données SCLC-CellMiner (Rudin et al., 2019).

Les données de séquençage mentionnées précédemment se réfèrent à la technologie de séquençage « bulk », qui mesure l'expression génique moyenne à partir d'échantillons constitués de populations cellulaires hétérogènes. Cette approche présente plusieurs limites, notamment la perte d'informations sur l'hétérogénéité cellulaire. En effet, elle ne permet pas de distinguer les contributions des différents types cellulaires au sein d'un échantillon, ce qui peut poser des problèmes pour l'étude de tissus complexes tels que les tumeurs de CBPC, caractérisées par une coexistence importante de différents sous-types cellulaires. De plus, le séquençage « bulk » ne permet pas de suivre les transitions d'états cellulaires ou les dynamiques de différenciation. En revanche, l'avènement du scRNA-seq a permis de mettre en évidence la plasticité intratumorale du CBPC en offrant la possibilité d'identifier les différentes sous-populations cellulaires au sein de la tumeur ainsi que les signatures transcriptomiques uniques qui leur sont associées.

À la suite de la publication de plusieurs bases de données de scRNA-seq, nous avons exploré l'expression de la Nétrine-3 dans des populations cellulaires spécifiques au sein des tumeurs de CBPC. Nous avons utilisé la cohorte disponible en ligne de Chan et al., 2021. Nous avons été

surpris de constater que la Nétrine-3 est très faiblement représentée dans les échantillons de cette étude. Nous avons corrélié cette observation avec une autre constatation antérieure concernant la faible expression transcriptionnelle de la Nétrine-3 généralement retrouvée dans les bases de données publiques, en comparaison avec d'autres membres de la famille des Nétrines, et avons mis en relation ces résultats avec ceux obtenus au laboratoire.

Cette observation peut s'expliquer par le fait que l'ARNm de la Nétrine-3 possède une queue poly-A très courte, ce qui influence sa détection dans les bases de données RNA-seq ou scRNA-seq. Les ARNm avec des queues poly-A courtes sont souvent sous-représentés dans ces bases de données pour plusieurs raisons : (i) les méthodes de séquençage RNA-seq reposent fréquemment sur l'enrichissement des ARNm *via* leur queue poly-A avant la séquence. Si la queue poly-A est très courte, elle peut ne pas être suffisamment longue pour être capturée efficacement lors de ce processus, ce qui réduit la quantité du transcrit dans les données obtenues. (ii) au cours de la conversion de l'ARNm en ADN complémentaire (ADNc), une queue poly-A courte peut diminuer l'efficacité de l'amplification de l'ADNc, ce qui impacte la quantité de ce transcrit disponible pour le séquençage.

Pour quantifier ce biais d'expression du transcrit de la Nétrine-3, nous avons comparé ses niveaux d'expression par RT-qPCR en utilisant soit des hexamères aléatoires, soit des amorces spécifiques. Les hexamères aléatoires se lient de manière fortuite à diverses séquences d'ARNm, permettant l'amplification du transcrit même si la queue poly-A est courte. En revanche, les amorces spécifiques sont conçues pour se lier à des séquences particulières de l'ARNm, souvent proches de la région de la queue poly-A à l'extrémité 3'. Ainsi, une queue poly-A courte peut réduire l'efficacité de la liaison des amorces spécifiques, entraînant une diminution de l'intensité de l'amplification et, par conséquent, du niveau d'expression mesuré.

L'analyse des résultats a révélé une différence de 2 cycles (Cq) dans l'expression de la Nétrine-3 entre la méthode utilisant des hexamères aléatoires et celle utilisant des amorces spécifiques, ce qui correspond à une différence d'expression 4 fois supérieure. Cette différence s'explique par le fait qu'un cycle supplémentaire dans une qPCR quantitative représente approximativement un doublement de la quantité d'ADN amplifié. Ainsi, l'approche utilisant les hexamères aléatoires détecte une quantité d'ARNm plus élevée que celle observée avec les amorces spécifiques.

Pour confirmer et affiner ces résultats, nous prévoyons d'utiliser la technologie Poly(A)-seq, qui permet de séquencer spécifiquement la queue poly-A de l'ARNm, afin de mesurer sa longueur avec une précision accrue.

II. Découvertes, interrogations et directions futures

- La Nétrine-3 est exprimée spécifiquement dans les populations de cellules non-adhérentes

Nos résultats suggèrent que l'expression de la Nétrine-3 est spécifiquement associée aux cellules tumorales de CBPC caractérisées par une croissance non-adhérente. De manière intéressante, et en complément de ce qui a été rapporté dans l'article, notre analyse des données publiques de scRNA-seq a révélé que la Nétrine-3 est également exprimée dans les cellules tumorales présentes dans les effusions pleurales des patients atteints de CBPC, une observation qui concorde avec nos résultats expérimentaux.

Nous avons analysé si l'expression de la Nétrine-3 était suffisante pour induire un phénotype non adhérent, ou si ce phénotype dépendait exclusivement de l'expression des marqueurs neuroendocrines et/ou neuronaux. Pour cela, nous avons cultivé un large panel de lignées cellulaires représentant les quatre sous-types de CBPC et avons corrélé leur type de croissance avec leurs niveaux d'expression transcriptionnelle et traductionnelle de la Nétrine-3. Nous avons découvert que toutes les lignées exprimant la Nétrine-3 présentaient une croissance non-adhérente, ce que l'analyse des 70 lignées cellulaires de la base de données CellMiner, mentionnée dans le manuscrit, a confirmé. De manière surprenante, parmi ces lignées non-adhérentes et positives pour la Nétrine-3, nous avons identifié une lignée non neuroendocrine (NCI-H526), appartenant au sous-type CBPC-P. De plus, certaines lignées neuroendocrines des sous-types CBPC-A et CBPC-N présentaient une croissance adhérente et n'exprimaient pas la Nétrine-3. Ces résultats suggèrent que le phénotype non adhérent est intrinsèquement lié à l'expression de la Nétrine-3, tandis que l'expression des marqueurs neuroendocrines et neuronaux à elle seule n'est pas suffisante pour induire ce phénotype.

Comme indiqué dans l'article, nous avons également observé que la surexpression de la Nétrine-3 dans une lignée cellulaire résistante de CBPC suffisait à inverser le phénotype

adhérent des cellules. Nous avons tenté de réaliser l'expérience miroir en inhibant l'expression de la Nétrine-3 dans des cellules non-adhérentes. Cependant, nous n'avons pas réussi à inverser le phénotype non adhérent dans cette expérience. Ce résultat pourrait s'expliquer par deux facteurs : (i) les rendements d'infection des cellules non-adhérentes avec la technologie CRISPR/Cas9 sont considérablement inférieurs à ceux des cellules adhérentes, ce qui a empêché l'obtention d'un knock-out complet du gène *NTN3*. Une expression endogène résiduelle, bien que très faible, pourrait avoir suffi à maintenir le phénotype non adhérent. (ii) il est possible que l'expression de la Nétrine-3 seule ne soit pas suffisante pour modifier le phénotype des cellules, ce qui est plausible étant donné que des changements phénotypiques sont rarement dus à un seul facteur. Néanmoins, il apparaît que la Nétrine-3 joue un rôle essentiel dans la détermination de ce phénotype.

- La Nétrine-3 permet la survie et la prolifération des cellules non-adhérentes

Lors de la dissémination métastatique, les cellules cancéreuses doivent recourir à des mécanismes alternatifs leur permettant de se détacher du site primaire et de survivre dans des environnements normalement défavorables. Elles peuvent notamment activer des voies de signalisation qui soutiennent leur survie même en l'absence d'ancrage. Par exemple, les voies PI3K/Akt et MAPK/ERK peuvent être hyperactivées pour favoriser la survie et la prolifération.

L'analyse de l'enrichissement des voies de signalisation entre les tumeurs de CBPC positives et négatives pour la Nétrine-3 a révélé que l'expression de la Nétrine-3 est associée à une diminution des gènes signatures de la mort cellulaire par apoptose, ainsi qu'à une augmentation des signatures liées à la division cellulaire. Ces observations suggèrent que l'expression de la Nétrine-3 pourrait favoriser la survie et la prolifération des cellules tumorales qui l'expriment.

Les signatures transcriptionnelles des voies apoptotiques fournissent des informations sur l'expression des gènes impliqués dans l'apoptose, comme les caspases, les protéines Bcl-2 et les facteurs de transcription tels que p53. Cependant, ces signatures ne reflètent pas toujours l'activité fonctionnelle des caspases ou les niveaux de protéines actives, car la régulation post-transcriptionnelle et les modifications protéiques jouent également un rôle crucial dans le processus apoptotique. Par conséquent, il sera nécessaire de compléter notre analyse du rôle de la Nétrine-3 dans la survie des cellules non-adhérentes de CBPC par d'autres approches expérimentales pour obtenir une compréhension plus approfondie de ses effets.

Dans l'article de Jiang et al. (**Annexe 1**), nous avons tenté d'évaluer la mort cellulaire en mesurant l'activité des caspases sur nos cellules KO pour la Nétrine-3. Nous n'avons observé aucune différence significative en termes de mort cellulaire entre les cellules KO et les cellules témoins, un résultat similaire ayant été obtenu avec l'utilisation de siRNA. Ces observations pourraient être attribuées au fait que les cellules croissent de façon non-adhérente, ce qui complique la réalisation de ce type de tests. De plus, le processus de comptage des cellules, qui nécessite la dissociation des agrégats, peut introduire des biais dans ces analyses. Par ailleurs, l'expression résiduelle du gène *NTN3*, liée au faible rendement d'infection ou de transfection, pourrait également influencer les résultats. Il sera donc nécessaire de répéter les tests de mort cellulaire avec nos lignées cellulaires adhérentes modifiées pour l'expression du gène *NTN3*, ou en utilisant la cytométrie en flux sur les populations de cellules en suspension, une méthode potentiellement mieux adaptée à ce type de cellules.

En parallèle, nous avons observé une augmentation de l'expression des récepteurs UNC5B et NEO1 chez les cellules KO pour la Nétrine-3. Ce résultat a été confirmé par des expériences complémentaires, montrant une diminution de l'expression de ces récepteurs dans les cellules surexprimant la Nétrine-3. Ces observations suggèrent que ces récepteurs pourraient être internalisés lorsqu'ils se lient à la Nétrine-3, de façon similaire à ce qui a été précédemment décrit pour la liaison du récepteur DCC avec la Nétrine-1 (Bin et al., 2015). Ainsi, il semblerait que la liaison de la Nétrine-3 au récepteur UNC5B puisse favoriser la survie des cellules de CBPC, de manière similaire à la Nétrine-1. Cependant, des analyses supplémentaires seront nécessaires pour confirmer cette hypothèse et mieux comprendre les mécanismes sous-jacents.

De manière intéressante, une étude récente a révélé que la signalisation des Nétrines, en particulier celle de la Nétrine-3, joue un rôle essentiel dans la survie des cellules sphéroïdes du cancer ovarien séreux de haut grade (HGSOC) (Perampalam et al., 2024, **Annexe 2**). Ces cellules, capables de se détacher du site tumoral primaire, migrent dans la cavité péritonéale où elles peuvent rester viables pendant des années, contribuant ainsi à la dormance et à la rechute de la maladie. L'étude a démontré que la perte d'expression de la Nétrine-3 réduit significativement la survie des cellules dans plusieurs lignées de HGSOC. De plus, des analyses immunohistochimiques effectuées sur des sphéroïdes dormants isolés des ascites de patientes atteintes de HGSOC ont révélé une expression élevée de Nétrine-3, renforçant ainsi son rôle crucial dans la survie des cellules en état de dormance.

En cherchant à élucider les mécanismes sous-jacents, les chercheurs ont découvert que la Nétrine-3 et ses récepteurs favorisent la survie des sphéroïdes de HGSOC en inhibant l'activation de la kinase ERK. L'inhibition de la voie MEK-ERK a entraîné la mort des cellules en suspension, confirmant ainsi l'importance de cette voie pour la survie des sphéroïdes en dormance. Ces données suggèrent que cette signalisation pourrait s'effectuer *via* un hétérodimère ou un complexe multi-récepteurs impliquant un récepteur UNC5 et la Nétrine-3, ce qui fournirait une activation de faible intensité de MEK et ERK, spécifiquement dans des conditions de dormance cellulaire.

Bien que ce mécanisme soit associé au détachement cellulaire et à la dormance, il pourrait ne pas s'appliquer entièrement au CBPC, en raison de la progression extrêmement rapide de ce type de cancer chez les patients. Nos propres résultats montrent d'ailleurs que la surexpression de la Nétrine-3 est associée à une augmentation de la prolifération cellulaire, tant *in vitro* qu'*in vivo*, ce qui contraste avec les observations des chercheurs sur le HGSOC. Toutefois, les résultats de ces deux études convergent pour souligner un rôle crucial de la Nétrine-3 dans la survie des cellules cancéreuses en l'absence d'ancrage et suggèrent également une relation similaire entre la Nétrine-3 et la progression tumorale dans ces deux types de cancer.

- La Nétrine-3 modifie l'ancrage cellulaire en régulant l'intégrité de la matrice

Pour faciliter leur détachement et leur migration, les cellules cancéreuses peuvent sécréter des molécules capables d'altérer l'intégrité de la matrice extracellulaire. Nos résultats montrent que la Nétrine-3 est faiblement diffusible et qu'elle se lie à la matrice extracellulaire, de manière similaire aux autres membres de la famille, tels que la Nétrine-1 et la Nétrine-4 (Kryza et al., 2023, **Annexe 3**; Reuten et al., 2016). Dans le cadre de nos recherches futures, nous prévoyons de déterminer les partenaires d'interaction de la Nétrine-3 au sein de la MEC. Pour ce faire, nous allons réaliser une nouvelle expérience d'interférométrie sur bio-couche afin d'étudier l'interaction de la Nétrine-3 avec divers composants de la MEC, tels que la laminine, le lumican, le glypican et la vitronectine. Il sera ensuite particulièrement intéressant d'examiner si la Nétrine-3 peut bloquer la polymérisation de certains composants, comme cela a été observé pour la Nétrine-4 en ce qui concerne les laminines (Reuten et al., 2016; Schneiders et al., 2007).

Grâce à une collaboration avec d'autres chercheurs du CRCL, nous avons pu quantifier l'effet de la présence de Nétrine-3 recombinante humaine sur la matrice extracellulaire. Nos résultats montrent qu'en présence de Nétrine-3, les pores de la matrice sont plus larges que dans les conditions témoins. De plus, la technologie de microscopie à force atomique (AFM) a révélé que la Nétrine-3 recombinante réduit significativement la rigidité de la matrice. Des expériences similaires réalisées avec la Nétrine-1 recombinante humaine ont montré des effets opposés, à savoir une diminution de la taille des pores de la matrice et une augmentation de sa rigidité. Cette observation suggère que ces deux protéines ont des rôles distincts dans la migration des cellules cancéreuses. Alors que la Nétrine-1 semble favoriser l'ancrage des cellules à la MEC, la Nétrine-3 semble moduler la structure de la MEC de manière à altérer sa capacité à maintenir l'ancrage cellulaire, facilitant ainsi la dissémination des cellules cancéreuses vers des sites périphériques ou distants.

Ces tests *in vitro* ne constituent qu'une première étape dans la caractérisation de l'effet de la Nétrine-3 sur la MEC. Bien qu'ils permettent de simuler la présence de la Nétrine-3 dans la matrice, ces tests réalisés en l'absence de cellules ne reflètent pas pleinement la complexité biologique de la pathologie. Pour mieux évaluer le rôle de la Nétrine-3 dans le CBPC, nous prévoyons d'analyser la matrice extracellulaire des tumeurs issues de xéno greffes de cellules H69AR-Ntn3 et H69AR-Ctrl. Ces échantillons seront marqués avec le Picosirius Red, un colorant spécifique principalement utilisé pour visualiser les fibrilles de collagène dans les tissus. Lorsqu'il est utilisé en microscopie polarisante, ce colorant permet une évaluation détaillée de la structure et de l'organisation de la MEC.

- La Nétrine-3 régule l'adhésion cellulaire en modifiant la voie de signalisation intracellulaire FAK *via* l'activité des intégrines $\beta 1$

Pour permettre son détachement, la cellule cancéreuse doit réguler les voies de signalisation intracellulaires, en particulier celles liées à l'adhésion. La rigidité de la matrice extracellulaire joue un rôle crucial dans la régulation de l'assemblage des complexes d'adhésion focale. Sur une matrice rigide, les forces de traction générées par les cellules sont transmises *via* les intégrines aux fibres de la MEC, favorisant ainsi le recrutement et l'activation de protéines d'adhésion focale telles que FAK, taline, paxilline et vinculine. Ces interactions renforcent la formation et la stabilisation des adhésions focales, créant des complexes matures essentiels pour la signalisation cellulaire et la régulation de l'adhésion.

En présence de la Nétrine-3, nous avons montré que la rigidité de la MEC est fortement réduite. Par conséquent, la transmission des forces de traction est moins efficace, ce qui diminue la tension mécanique au niveau des sites d'adhésion focale. Cette réduction de la tension mécanique limite le recrutement des protéines d'adhésion focale, notamment FAK, qui reste dans une conformation inactive (forme repliée) et n'est donc pas phosphorylée sur la tyrosine 397. Cela réduit la disponibilité de ses autres sites de phosphorylation pour les domaines SH2 d'autres protéines, entraînant une diminution de l'activation des voies de signalisation en aval associées à l'adhésion.

Nos recherches ont démontré que l'expression de la Nétrine-3 est associée à une diminution de l'autophosphorylation de la kinase FAK sur la tyrosine 397. Bien que ces données ne soient pas incluses dans l'article, nous avons également analysé par Western blot l'activité d'autres sites clés de l'activité de FAK, en particulier les tyrosines 576/577 et 925, qui sont connues pour interagir avec les protéines contenant un domaine SH2, telles que Src. Nos résultats indiquent que l'expression de la Nétrine-3 est liée à une diminution de la phosphorylation de la tyrosine 925. Ces observations peuvent s'expliquer par la diminution de la rigidité de la matrice induite par la Nétrine-3.

De plus, nous avons constaté que l'expression de la Nétrine-3 est associée à une réduction des niveaux d'expression des récepteurs UNC5B et NEO1, suggérant leur internalisation après liaison avec la Nétrine-3. Nous avons alors émis l'hypothèse que l'internalisation du complexe Nétrine-3/récepteur puisse initier une cascade de signalisation conduisant à l'inactivation de FAK. Nos résultats montrent que l'inhibition des récepteurs UNC5B et NEO1 ne restaure pas la phosphorylation de FAK sur la Y397. Ce résultat suggère que la signalisation induite par les récepteurs UNC5B/NEO1 et la Nétrine-3 n'est pas directement impliquée dans la régulation de cette voie.

En revanche, nous avons montré que la Nétrine-3 est capable de se lier à plusieurs hétérodimères contenant l'intégrine $\beta 1$ et que l'expression de la Nétrine-3 dans les cellules de CBPC est associée à une diminution de l'activité de l'intégrine $\beta 1$. Ces résultats suggèrent que la liaison de la Nétrine-3 à l'intégrine $\beta 1$ pourrait potentiellement concurrencer les ligands

activateurs de la MEC ou stabiliser la conformation inactive de l'intégrine, interférant ainsi avec l'activation des intégrines et, par conséquent, avec l'activation de FAK en aval.

- L'expression de la Nétrine-3 est enrichie dans le sous-type NEUROD1 (CBPC-N) et favorise la dissémination métastatique des CBPC

Les gènes associés à la différenciation neuronale et à la signalisation des neuropeptides, tels que les éphrines et les sémaphorines, sont fortement enrichis dans le sous-type CBPC-N (Pitulescu & Adams, 2010; Yoshida, 2012). Des études récentes ont démontré que le programme d'axonogenèse, qui régule la migration neuronale (Zhang et al., 2019b), est également impliqué dans les métastases du CBPC (Yang et al., 2019). De plus, ces études ont identifié que les composants des voies des éphrines et des sémaphorines sont des cibles du facteur de transcription NEUROD1 (Borromeo et al., 2016) ou des régulateurs du phénotype NEUROD1 (Wooten et al., 2019), suggérant que leur expression pourrait contribuer au potentiel métastatique des cellules CBPC-N. Cependant, le rôle de la Nétrine-3 dans ce contexte n'a pas encore été exploré, bien que NEUROD1 et ASCL1 aient été identifiés comme activateurs du gène de la Nétrine-3 (Jiang et al., 2021, **Annexe 1**), soulignant ainsi son importance potentielle dans la régulation du phénotype métastatique du CBPC-N.

Au cours de mon projet de thèse, j'ai étudié le rôle potentiel de la Nétrine-3 dans les changements phénotypiques des sous-types du CBPC, qui sont impliqués dans des mécanismes complexes affectant la progression et la dissémination du cancer. Nos données révèlent une forte expression de la Nétrine-3 dans les tumeurs de patients appartenant au sous-type NEUROD1, alors qu'elle est presque absente dans les tumeurs du sous-type non-neuroendocrine POU2F3. De plus, une corrélation élevée a été observée entre l'expression du facteur de transcription NEUROD1 et celle de la Nétrine-3, tant dans les échantillons tumoraux de patients que dans les lignées cellulaires dérivées. Ces résultats suggèrent que la Nétrine-3 joue un rôle significatif dans la plasticité phénotypique du CBPC.

Contrairement au sous-type CBPC-A, qui est significativement surreprésenté dans les tumeurs primaires, le sous-type CBPC-N est fortement enrichi dans les métastases ganglionnaires et distantes (Chan et al., 2021). La forte expression de la Nétrine-3 observée dans le sous-type CBPC-N soulève ainsi la question de son rôle potentiel dans ce phénomène. Pour explorer cette hypothèse, nous avons examiné les CTC présentes dans les échantillons sanguins de patients

atteints de CBPC. Nos résultats montrent que les CTC expriment la Nétrine-3 à leur surface, ce qui suggère que cette molécule pourrait faciliter le détachement des cellules tumorales et, par conséquent, leur dissémination métastatique. Ces observations ont été confirmées chez tous les patients analysés jusqu'à présent (n=4). Nous prévoyons d'élargir cette étude en incluant un plus grand nombre de patients et en explorant le marquage du facteur NEUROD1. Nous envisageons également de réaliser une analyse scRNA-seq sur ces échantillons afin d'approfondir notre compréhension des voies de signalisation associées à la Nétrine-3 dans les CTC du CBPC.

Par ailleurs, il est pertinent de noter qu'une équipe de chercheurs a observé que la surexpression de la Nétrine-3 est corrélée à un mauvais pronostic clinique chez les patientes atteintes de HGSOc, et qu'elle induit également une augmentation de la propagation métastatique de la maladie dans un modèle murin de xénogreffe. Ces résultats soutiennent notre hypothèse selon laquelle la Nétrine-3 pourrait jouer un rôle crucial dans la dissémination métastatique, en particulier dans le contexte du CBPC-N.

III. Perspectives diagnostiques et thérapeutiques

Actuellement, la prise en charge clinique du CBPC ne bénéficie pas d'une classification précise des patients selon les sous-types tumoraux. Les biomarqueurs diagnostiques couramment utilisés incluent les marqueurs neuroendocriniens traditionnels tels que la synaptophysine et la chromogranine A. Bien que ces marqueurs soient détectables dès les premiers stades de la maladie, leur capacité à refléter la dynamique évolutive du CBPC reste limitée. En effet, ces marqueurs ne sont pas spécifiques à un sous-type particulier du CBPC et ne capturent pas pleinement les variations phénotypiques et les changements associés à la progression de la maladie.

Il est donc crucial de découvrir de nouveaux biomarqueurs liquides capables de fournir une évaluation plus précise de la maladie. Les biomarqueurs liquides ont le potentiel de fournir des informations plus détaillées sur la biologie tumorale et la progression de la maladie, facilitant ainsi un diagnostic plus précis et un suivi plus efficace des patients. En particulier, les CTC et d'autres biomarqueurs circulants, tels que les exosomes ou les microARN, pourraient jouer un rôle crucial dans cette démarche. En se concentrant sur les caractéristiques uniques des CTC et

des biomarqueurs associés au CBPC, il serait possible de développer des approches thérapeutiques plus ciblées et de surveiller la réponse au traitement de manière non invasive.

Dans ce contexte, nos résultats suggèrent que la détection de la Nétrine-3 dans les échantillons sanguins pourrait émerger comme un biomarqueur innovant pour le CBPC, répondant ainsi à un besoin clinique encore non satisfait. La forte spécificité de l'expression de la Nétrine-3 pour le sous-type pro-métastatique CBPC-N pourrait permettre, par une simple prise de sang, de sélectionner les patients en fonction de l'expression de ce biomarqueur. Cela faciliterait l'orientation vers des thérapies ciblées visant à traiter les cellules tumorales NTN3/NEUROD1-positives, tant au niveau du site tumoral primaire que dans les métastases.

Le CBPC est largement reconnu pour sa nature hautement agressive, caractérisée par une progression rapide et une forte propension à la métastase. Bien que des avancées aient été réalisées dans la compréhension de sa biologie moléculaire, les options thérapeutiques restent très limitées, et le développement de nouvelles immunothérapies et thérapies ciblées n'a malheureusement pas permis d'améliorer significativement la survie globale des patients atteints de cette maladie (Rudin et al., 2019). Ces limitations pourraient s'expliquer en partie par l'absence de sélection des patients basée sur l'expression spécifique des cibles moléculaires en clinique, ce qui réduit l'efficacité des traitements.

Nos données suggèrent non seulement que la Nétrine-3 pourrait émerger comme un biomarqueur d'intérêt majeur, mais également que son ciblage pourrait offrir de nouvelles perspectives thérapeutiques pour les patients atteints de CBPC. En effet, évaluer l'efficacité d'un traitement ciblé contre la Nétrine-3 pourrait s'avérer particulièrement prometteur pour inhiber la transition des cellules neuroendocrines du CBPC vers un phénotype adhérent et chimiorésistant. De plus, en limitant le détachement de ces cellules du site tumoral primaire, une telle approche pourrait ralentir la progression métastatique de la maladie, offrant ainsi une stratégie innovante pour améliorer les résultats cliniques.

Nous avons récemment démontré que l'anticorps anti-Nétrine-1, actuellement en évaluation clinique, présente une affinité importante pour la Nétrine-3 et inhibe de manière efficace les interactions entre la Nétrine-3 et ses récepteurs, ce qui est associé à une diminution de la croissance tumorale dans des modèles précliniques de CBPC (Jiang et al., 2021, **Annexe 1**). Les découvertes issues de mes travaux de thèse apportent des éléments cruciaux sur le rôle de

la Nétrine-3 dans la progression du CBPC. Ces résultats ouvrent la voie à des recherches futures qui devront approfondir l'efficacité du NP137, notamment lorsqu'il est combiné avec des chimiothérapies ou des thérapies ciblées, tout en intégrant une sélection des patients basée sur l'expression de la Nétrine-3 afin d'améliorer les chances de réponse au traitement pour les patients atteints de CBPC.

Bibliographie

- Aboubakar Nana, F., Hoton, D., Ambroise, J., Lecocq, M., Vanderputten, M., Sibille, Y., Vanaudenaerde, B., Pilette, C., Bouzin, C., & Ocak, S. (2019). Increased Expression and Activation of FAK in Small-Cell Lung Cancer Compared to Non-Small-Cell Lung Cancer. *Cancers*, *11*(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/cancers11101526>
- Ackerman, S. L., Kozak, L. P., Przyborski, S. A., Rund, L. A., Boyer, B. B., & Knowles, B. B. (1997). The mouse rostral cerebellar malformation gene encodes an UNC-5-like protein. *Nature*, *386*(6627), 838-842. <https://doi.org/10.1038/386838a0>
- Ahmed, G., Shinmyo, Y., Ohta, K., Islam, S. M., Hossain, M., Naser, I. B., Riyadh, M. A., Su, Y., Zhang, S., Tessier-Lavigne, M., & Tanaka, H. (2011). Draxin Inhibits Axonal Outgrowth through the Netrin Receptor DCC. *The Journal of Neuroscience*, *31*(39), 14018-14023. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0943-11.2011>
- Alanko, J., Mai, A., Jacquemet, G., Schauer, K., Kaukonen, R., Saari, M., Goud, B., & Ivaska, J. (2015). Integrin endosomal signalling suppresses anoikis. *Nature Cell Biology*, *17*(11), 1412-1421. <https://doi.org/10.1038/ncb3250>
- Almodovar, K., Iams, W. T., Meador, C. B., Zhao, Z., York, S., Horn, L., Yan, Y., Hernandez, J., Chen, H., Shyr, Y., Lim, L. P., Raymond, C. K., & Lovly, C. M. (2018). Longitudinal Cell-Free DNA Analysis in Patients with Small Cell Lung Cancer Reveals Dynamic Insights into Treatment Efficacy and Disease Relapse. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, *13*(1), 112-123. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2017.09.1951>
- Amano, K., Fujii, M., Arata, S., Ogawa, M., Yamakawa, K., & Arata, A. (2010). Loss of pre-inspiratory neuron synchronicity in mice with DSCAM deficiency. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *669*, 15-19. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5692-7_3
- An, S., Vo, T. T. L., Son, T., Choi, H., Kim, J., Lee, J., Kim, B. H., Choe, M., Ha, E., Surh, Y.-J., Kim, K.-W., & Seo, J. H. (2023). SAMHD1-induced endosomal FAK signaling promotes human renal clear cell carcinoma metastasis by activating Rac1-mediated lamellipodia protrusion. *Experimental & Molecular Medicine*, *55*(4), 779-793. <https://doi.org/10.1038/s12276-023-00961-x>
- Aoki-Suzuki, M., Yamada, K., Meerabux, J., Iwayama-Shigeno, Y., Ohba, H., Iwamoto, K., Takao, H., Toyota, T., Suto, Y., Nakatani, N., Dean, B., Nishimura, S., Seki, K., Kato, T., Itohara, S., Nishikawa, T., & Yoshikawa, T. (2005). A family-based association study and gene expression analyses of netrin-G1 and -G2 genes in schizophrenia. *Biological Psychiatry*, *57*(4), 382-393. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.11.022>
- Arimori, T., Miyazaki, N., Mihara, E., Takizawa, M., Taniguchi, Y., Cabañas, C., Sekiguchi, K., & Takagi, J. (2021). Structural mechanism of laminin recognition by integrin. *Nature Communications*, *12*(1), 4012. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24184-8>
- Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C. B., & Seed, B. (1990). CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell*, *61*(7), 1303-1313. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90694-a](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90694-a)
- Aumailley, M. (2013). The laminin family. *Cell Adhesion & Migration*, *7*(1), 48-55. <https://doi.org/10.4161/cam.22826>

Aung, H. H., Sivakumar, A., Gholami, S. K., Venkateswaran, S. P., Gorain, B., & Shadab. (2019). Chapter 1—An Overview of the Anatomy and Physiology of the Lung. In P. Kesharwani (Éd.), *Nanotechnology-Based Targeted Drug Delivery Systems for Lung Cancer* (p. 1-20). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815720-6.00001-0>

Aupérin, A., Arriagada, R., Pignon, J. P., Le Péchoux, C., Gregor, A., Stephens, R. J., Kristjansen, P. E., Johnson, B. E., Ueoka, H., Wagner, H., & Aisner, J. (1999). Prophylactic cranial irradiation for patients with small-cell lung cancer in complete remission. Prophylactic Cranial Irradiation Overview Collaborative Group. *The New England Journal of Medicine*, 341(7), 476-484. <https://doi.org/10.1056/NEJM199908123410703>

Bae, G.-U., Yang, Y.-J., Jiang, G., Hong, M., Lee, H.-J., Tessier-Lavigne, M., Kang, J.-S., & Krauss, R. S. (2009). Neogenin Regulates Skeletal Myofiber Size and Focal Adhesion Kinase and Extracellular Signal-regulated Kinase Activities In Vivo and In Vitro. *Molecular Biology of the Cell*, 20(23), 4920-4931. <https://doi.org/10.1091/mbc.E09-06-0491>

Baine, M. K., Febres-Aldana, C. A., Chang, J. C., Jungbluth, A. A., Sethi, S., Antonescu, C. R., Travis, W. D., Hsieh, M.-S., Roh, M. S., Homer, R. J., Ladanyi, M., Egger, J. V., Lai, W. V., Rudin, C. M., & Rekhman, N. (2022). POU2F3 in SCLC : Clinicopathologic and Genomic Analysis With a Focus on Its Diagnostic Utility in Neuroendocrine-Low SCLC. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 17(9), 1109-1121. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2022.06.004>

Baine, M. K., Hsieh, M.-S., Lai, W. V., Egger, J. V., Jungbluth, A. A., Daneshbod, Y., Beras, A., Spencer, R., Lopardo, J., Bodd, F., Montecalvo, J., Sauter, J. L., Chang, J. C., Buonocore, D. J., Travis, W. D., Sen, T., Poirier, J. T., Rudin, C. M., & Rekhman, N. (2020). SCLC Subtypes Defined by ASCL1, NEUROD1, POU2F3, and YAP1 : A Comprehensive Immunohistochemical and Histopathologic Characterization. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 15(12), 1823-1835. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2020.09.009>

Barretina, J., Caponigro, G., Stransky, N., Venkatesan, K., Margolin, A. A., Kim, S., Wilson, C. J., Lehár, J., Kryukov, G. V., Sonkin, D., Reddy, A., Liu, M., Murray, L., Berger, M. F., Monahan, J. E., Morais, P., Meltzer, J., Korejwa, A., Jané-Valbuena, J., ... Garraway, L. A. (2012). The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature*, 483(7391), 603-607. <https://doi.org/10.1038/nature11003>

Basumallik, N., & Agarwal, M. (2024). Small Cell Lung Cancer. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482458/>

Bensch, K. G., Corrin, B., Pariente, R., & Spencer, H. (1968). Oat-cell carcinoma of the lung. Its origin and relationship to bronchial carcinoid. *Cancer*, 22(6), 1163-1172. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(196811\)22:6<1163::aid-cnrcr2820220612>3.0.co;2-l](https://doi.org/10.1002/1097-0142(196811)22:6<1163::aid-cnrcr2820220612>3.0.co;2-l)

Bernet, A., & Mehlen, P. (2007). Dependence receptors : When apoptosis controls tumor progression. *Bulletin Du Cancer*, 94(4), E12-17.

Berniker, A. V., Abdulrahman, A. A., Teytelboym, O. M., Galindo, L. M., & Mackey, J. E. (2015). Extrapulmonary small cell carcinoma: Imaging features with radiologic-pathologic correlation. *Radiographics: A Review Publication of the Radiological Society of North America, Inc*, 35(1), 152-163. <https://doi.org/10.1148/rg.351140050>

Berta, J., Rózsás, A., Megyesfalvi, Z., Ostoros, G., & Döme, B. (2023). Thoracic irradiation as consolidation therapy in patients with extensive-stage small cell lung cancer. *Current Opinion in Oncology*, 35(1), 54-60. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000911>

- Berthenet, K., Castillo Ferrer, C., Fanfone, D., Popgeorgiev, N., Neves, D., Bertolino, P., Gibert, B., Hernandez-Vargas, H., & Ichim, G. (2020). Failed Apoptosis Enhances Melanoma Cancer Cell Aggressiveness. *Cell Reports*, 31(10), 107731. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107731>
- Beyreuther, K., Bush, A. I., Dyrks, T., Hilbich, C., König, G., Mönning, U., Multhaup, G., Prior, R., Rumble, B., & Schubert, W. (1991). Mechanisms of amyloid deposition in Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 640, 129-139. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1991.tb00204.x>
- Bin, J. M., Han, D., Lai Wing Sun, K., Croteau, L.-P., Dumontier, E., Cloutier, J.-F., Kania, A., & Kennedy, T. E. (2015). Complete Loss of Netrin-1 Results in Embryonic Lethality and Severe Axon Guidance Defects without Increased Neural Cell Death. *Cell Reports*, 12(7), 1099-1106. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.028>
- Bischof, M., Debus, J., Herfarth, K., Muley, T., Kappes, J., Storz, K., & Hoffmann, H. (2007). Surgery and chemotherapy for small cell lung cancer in stages I-II with or without radiotherapy. *Strahlentherapie Und Onkologie: Organ Der Deutschen Rontgengesellschaft ... [et Al]*, 183(12), 679-684. <https://doi.org/10.1007/s00066-007-1740-z>
- Blackhall, F., Jao, K., Greillier, L., Cho, B. C., Penkov, K., Reguart, N., Majem, M., Nackaerts, K., Syrigos, K., Hansen, K., Schuette, W., Cetnar, J., Cappuzzo, F., Okamoto, I., Erman, M., Langer, S. W., Kato, T., Groen, H., Sun, Z., ... Reinmuth, N. (2021). Efficacy and Safety of Rovalpituzumab Tesirine Compared With Topotecan as Second-Line Therapy in DLL3-High SCLC : Results From the Phase 3 TAHOE Study. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 16(9), 1547-1558. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2021.02.009>
- Bloom, L., Ingham, K. C., & Hynes, R. O. (1999). Fibronectin regulates assembly of actin filaments and focal contacts in cultured cells via the heparin-binding site in repeat III13. *Molecular Biology of the Cell*, 10(5), 1521-1536. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.5.1521>
- Bonnans, C., Chou, J., & Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(12), 786-801. <https://doi.org/10.1038/nrm3904>
- Bono, P., Rubin, K., Higgins, J. M., & Hynes, R. O. (2001). Layilin, a novel integral membrane protein, is a hyaluronan receptor. *Molecular Biology of the Cell*, 12(4), 891-900. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.4.891>
- Borelli, C., Vergara, D., Simeone, A., Paziienza, L., Castorani, G., Graziano, P., Di Micco, C., Quarato, C. M. I., & Sperandio, M. (2022). CT-Guided Transthoracic Biopsy of Pulmonary Lesions : Diagnostic versus Nondiagnostic Results. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 12(2), 359. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12020359>
- Borg, I., Freude, K., Kübart, S., Hoffmann, K., Menzel, C., Laccone, F., Firth, H., Ferguson-Smith, M. A., Tommerup, N., Ropers, H.-H., Sargan, D., & Kalscheuer, V. M. (2005). Disruption of Netrin G1 by a balanced chromosome translocation in a girl with Rett syndrome. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 13(8), 921-927. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201429>
- Borromeo, M. D., Savage, T. K., Kollipara, R. K., He, M., Augustyn, A., Osborne, J. K., Girard, L., Minna, J. D., Gazdar, A. F., Cobb, M. H., & Johnson, J. E. (2016). ASCL1 and NEUROD1 Reveal Heterogeneity in Pulmonary Neuroendocrine Tumors and Regulate Distinct Genetic Programs. *Cell Reports*, 16(5), 1259-1272. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.081>
- Böttger, F., Semenova, E. A., Song, J.-Y., Ferone, G., van der Vliet, J., Cozijnsen, M., Bhaskaran, R., Bombardelli, L., Piersma, S. R., Pham, T. V., Jimenez, C. R., & Berns, A. (2019). Tumor Heterogeneity

Underlies Differential Cisplatin Sensitivity in Mouse Models of Small-Cell Lung Cancer. *Cell Reports*, 27(11), 3345-3358.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.057>

Boussouar, A., Tortereau, A., Manceau, A., Paradisi, A., Gadot, N., Vial, J., Neves, D., Larue, L., Battistella, M., Leboeuf, C., Lebbé, C., Janin, A., & Mehlen, P. (2020). Netrin-1 and Its Receptor DCC Are Causally Implicated in Melanoma Progression. *Cancer Research*, 80(4), 747-756. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-1590>

Boyd, N. F., Guo, H., Martin, L. J., Sun, L., Stone, J., Fishell, E., Jong, R. A., Hislop, G., Chiarelli, A., Minkin, S., & Yaffe, M. J. (2007). Mammographic density and the risk and detection of breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 356(3), 227-236. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa062790>

Boyer, N. P., & Gupton, S. L. (2018). Revisiting Netrin-1 : One Who Guides (Axons). *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00221>

BROUTIER, L., CREVEAUX, M., VIAL, J., TORTEREAU, A., DELCROS, J., CHAZOT, G., MCCARRON, M. J., LÉON, S., PANGAULT, C., GADOT, N., COLOMBE, A., BOULLAND, M., BLACHIER, J., MARIE, J. C., TRAVERSE-GLEHEN, A., DONZÉ, O., CHASSAGNE-CLÉMENT, C., SALLES, G., TARTE, K., ... CASTETS, M. (2016). Targeting netrin-1/DCC interaction in diffuse large B-cell and mantle cell lymphomas. *EMBO Molecular Medicine*, 8(2), 96-104. <https://doi.org/10.15252/emmm.201505480>

Bunn, P. A., Minna, J. D., Augustyn, A., Gazdar, A. F., Ouadah, Y., Krasnow, M. A., Berns, A., Brambilla, E., Rekhtman, N., Massion, P. P., Niederst, M., Peifer, M., Yokota, J., Govindan, R., Poirier, J. T., Byers, L. A., Wynes, M. W., McFadden, D. G., MacPherson, D., ... Hirsch, F. R. (2016). Small Cell Lung Cancer : Can Recent Advances in Biology and Molecular Biology Be Translated into Improved Outcomes? *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 11(4), Article 4. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.01.012>

Burgess, R. W., Jucius, T. J., & Ackerman, S. L. (2006). Motor Axon Guidance of the Mammalian Trochlear and Phrenic Nerves : Dependence on the Netrin Receptor Unc5c and Modifier Loci. *Journal of Neuroscience*, 26(21), 5756-5766. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0736-06.2006>

Butcher, D. T., Alliston, T., & Weaver, V. M. (2009). A tense situation : Forcing tumour progression. *Nature Reviews. Cancer*, 9(2), 108-122. <https://doi.org/10.1038/nrc2544>

Byers, L. A., Wang, J., Nilsson, M. B., Fujimoto, J., Saintigny, P., Yordy, J., Giri, U., Peyton, M., Fan, Y. H., Diao, L., Masrourpour, F., Shen, L., Liu, W., Duchemann, B., Tumula, P., Bhardwaj, V., Welsh, J., Weber, S., Glisson, B. S., ... Heymach, J. V. (2012). Proteomic profiling identifies dysregulated pathways in small cell lung cancer and novel therapeutic targets including PARP1. *Cancer Discovery*, 2(9), 798-811. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0112>

Caeser, R., Egger, J. V., Chavan, S., Socci, N. D., Jones, C. B., Kombak, F. E., Asher, M., Roehrl, M. H., Shah, N. S., Allaj, V., Manoj, P., Tischfield, S. E., Kulick, A., Meneses, M., Iacobuzio-Donahue, C. A., Lai, W. V., Bhanot, U., Baine, M. K., Rekhtman, N., ... Sen, T. (2022). Genomic and transcriptomic analysis of a library of small cell lung cancer patient-derived xenografts. *Nature Communications*, 13(1), 2144. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29794-4>

Calabrese, C. R., Almassy, R., Barton, S., Batey, M. A., Calvert, A. H., Canan-Koch, S., Durkacz, B. W., Hostomsky, Z., Kumpf, R. A., Kyle, S., Li, J., Maegley, K., Newell, D. R., Notarianni, E., Stratford, I. J., Skalitzky, D., Thomas, H. D., Wang, L.-Z., Webber, S. E., ... Curtin, N. J. (2004). Anticancer chemosensitization and radiosensitization by the novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor AG14361. *Journal of the National Cancer Institute*, 96(1), 56-67. <https://doi.org/10.1093/jnci/djh005>

- Callaghan, B. C., Cheng, H. T., Stables, C. L., Smith, A. L., & Feldman, E. L. (2012). Diabetic neuropathy : Clinical manifestations and current treatments. *The Lancet. Neurology*, *11*(6), 521-534. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70065-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70065-0)
- Capurro, M. I., Xiang, Y.-Y., Lobe, C., & Filmus, J. (2005). Glypican-3 promotes the growth of hepatocellular carcinoma by stimulating canonical Wnt signaling. *Cancer Research*, *65*(14), 6245-6254. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4244>
- Carney, D. N., Gazdar, A. F., Bepler, G., Guccion, J. G., Marangos, P. J., Moody, T. W., Zweig, M. H., & Minna, J. D. (1985). Establishment and identification of small cell lung cancer cell lines having classic and variant features. *Cancer Research*, *45*(6), 2913-2923.
- Carter, L., Rothwell, D. G., Mesquita, B., Smowton, C., Leong, H. S., Fernandez-Gutierrez, F., Li, Y., Burt, D. J., Antonello, J., Morrow, C. J., Hodgkinson, C. L., Morris, K., Priest, L., Carter, M., Miller, C., Hughes, A., Blackhall, F., Dive, C., & Brady, G. (2017). Molecular analysis of circulating tumor cells identifies distinct copy-number profiles in patients with chemosensitive and chemorefractory small-cell lung cancer. *Nature Medicine*, *23*(1), 114-119. <https://doi.org/10.1038/nm.4239>
- Cassier, P. A., Navaridas, R., Bellina, M., Rama, N., Ducarouge, B., Hernandez-Vargas, H., Delord, J.-P., Lengrand, J., Paradisi, A., Fattet, L., Garin, G., Gheit, H., Dalban, C., Pastushenko, I., Neves, D., Jelin, R., Gadot, N., Braissand, N., Léon, S., ... Mehlen, P. (2023). Netrin-1 blockade inhibits tumour growth and EMT features in endometrial cancer. *Nature*, *620*(7973), 409-416. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06367-z>
- Cassier, P., Eberst, L., Garin, G., Courbebaisse, Y., Terret, C., Robert, M., Frenel, J.-S., Depil, S., Delord, J.-P., Perol, D., Ray-Coquard, I. L., Bidaux, A.-S., Tabone-Eglinger, S., Gilles-Afchain, L., Treilleux, I., Wang, Q., Ducarouge, B., Mehlen, P., Blay, J.-Y., & Gomez-Roca, C. A. (2019). 4390 - A first in human, phase I trial of NP137, a first-in-class antibody targeting netrin-1, in patients with advanced refractory solid tumors. *Annals of Oncology*, *30*, v159. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz244.001>
- Castets, M., & Mehlen, P. (2010). Netrin-1 role in angiogenesis : To be or not to be a pro-angiogenic factor? *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, *9*(8), 1466-1471. <https://doi.org/10.4161/cc.9.8.11197>
- Causseret, F., Sumia, I., & Pierani, A. (2016). Kremen1 and Dickkopf1 control cell survival in a Wnt-independent manner. *Cell Death and Differentiation*, *23*(2), 323-332. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.100>
- Chan, J. M., Quintanal-Villalonga, Á., Gao, V. R., Xie, Y., Allaj, V., Chaudhary, O., Masilionis, I., Egger, J., Chow, A., Walle, T., Mattar, M., Yarlagadda, D. V. K., Wang, J. L., Uddin, F., Offin, M., Ciampricotti, M., Qeriqi, B., Bahr, A., de Stanchina, E., ... Rudin, C. M. (2021). Signatures of plasticity, metastasis, and immunosuppression in an atlas of human small cell lung cancer. *Cancer Cell*, *39*(11), 1479-1496.e18. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.09.008>
- Chan, S. S., Zheng, H., Su, M. W., Wilk, R., Killeen, M. T., Hedgecock, E. M., & Culotti, J. G. (1996). UNC-40, a *C. elegans* homolog of DCC (Deleted in Colorectal Cancer), is required in motile cells responding to UNC-6 netrin cues. *Cell*, *87*(2), 187-195. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81337-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81337-9)
- Chang, J., & Chaudhuri, O. (2019). Beyond proteases : Basement membrane mechanics and cancer invasion. *The Journal of Cell Biology*, *218*(8), 2456-2469. <https://doi.org/10.1083/jcb.201903066>
- Charras, G., & Sahai, E. (2014). Physical influences of the extracellular environment on cell migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *15*(12), 813-824. <https://doi.org/10.1038/nrm3897>

- Chaturvedi, V., Fournier-Level, A., Cooper, H. M., & Murray, M. J. (2019). Loss of Neogenin1 in human colorectal carcinoma cells causes a partial EMT and wound-healing response. *Scientific Reports*, *9*(1), 4110. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40886-y>
- Chauhan, A., Kolesar, J., Yan, D., Maskey, A., Gaurav, K., McGarry, R., Miller, J., Khurana, A., O'Neal, R., Veedu, J., Kloecker, G., Park, C., Flora, D., Mullett, T., Evers, M., Anthony, L., Zinner, R., & Arnold, S. (2021). OA07.03 A Phase II Study of Frontline Rucaparib + Nivolumab in Platinum Sensitive ES SCLC : Interim Analysis. *Journal of Thoracic Oncology*, *16*(10), S859. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2021.08.056>
- Chauvin, J.-M., & Zarour, H. M. (2020). TIGIT in cancer immunotherapy. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, *8*(2), e000957. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-000957>
- Chen, H. J., Poran, A., Unni, A. M., Huang, S. X., Elemento, O., Snoeck, H.-W., & Varmus, H. (2019). Generation of pulmonary neuroendocrine cells and SCLC-like tumors from human embryonic stem cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *216*(3), 674-687. <https://doi.org/10.1084/jem.20181155>
- Chen, P., Kuang, P., Wang, L., Li, W., Chen, B., Liu, Y., Wang, H., Zhao, S., Ye, L., Yu, F., He, Y., & Zhou, C. (2020). Mechanisms of drugs-resistance in small cell lung cancer : DNA-related, RNA-related, apoptosis-related, drug accumulation and metabolism procedure. *Translational Lung Cancer Research*, *9*(3), 768-786. <https://doi.org/10.21037/tlcr-19-547>
- Chen, X. L., Nam, J.-O., Jean, C., Lawson, C., Walsh, C. T., Goka, E., Lim, S.-T., Tomar, A., Tancioni, I., Uryu, S., Guan, J.-L., Acevedo, L. M., Weis, S. M., Cheresch, D. A., & Schlaepfer, D. D. (2012). VEGF-induced vascular permeability is mediated by FAK. *Developmental Cell*, *22*(1), 146-157. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.11.002>
- Chen, Y., Yang, S., Tavormina, J., Tampe, D., Zeisberg, M., Wang, H., Mahadevan, K. K., Wu, C.-J., Sugimoto, H., Chang, C.-C., Jenq, R. R., McAndrews, K. M., & Kalluri, R. (2022). Oncogenic collagen I homotrimers from cancer cells bind to $\alpha 3 \beta 1$ integrin and impact tumor microbiome and immunity to promote pancreatic cancer. *Cancer Cell*, *40*(8), 818-834.e9. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2022.06.011>
- Christodoulou, M., Blackhall, F., Mistry, H., Leylek, A., Knegjens, J., Remouchamps, V., Martel-Lafay, I., Farré, N., Zwitter, M., Lerouge, D., Pourel, N., Janicot, H., Scherpereel, A., Tissing-Tan, C., Peignaux, K., Geets, X., Konopa, K., & Faivre-Finn, C. (2019). Compliance and Outcome of Elderly Patients Treated in the Concurrent Once-Daily Versus Twice-Daily Radiotherapy (CONVERT) Trial. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, *14*(1), 63-71. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.09.027>
- Chung, H. C., Piha-Paul, S. A., Lopez-Martin, J., Schellens, J. H. M., Kao, S., Miller, W. H., Delord, J.-P., Gao, B., Planchard, D., Gottfried, M., Zer, A., Jalal, S. I., Penel, N., Mehnert, J. M., Matos, I., Bennouna, J., Kim, D.-W., Xu, L., Krishnan, S., ... Ott, P. A. (2020). Pembrolizumab After Two or More Lines of Previous Therapy in Patients With Recurrent or Metastatic SCLC : Results From the KEYNOTE-028 and KEYNOTE-158 Studies. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, *15*(4), 618-627. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2019.12.109>
- Cirulli, V., & Yebra, M. (2007). Netrins : Beyond the brain. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *8*(4), 296-306. <https://doi.org/10.1038/nrm2142>
- Colamarino, S. A., & Tessier-Lavigne, M. (1995). The axonal chemoattractant netrin-1 is also a chemorepellent for trochlear motor axons. *Cell*, *81*(4), 621-629. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90083-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90083-7)

- Combs, S. E., Hancock, J. G., Boffa, D. J., Decker, R. H., Detterbeck, F. C., & Kim, A. W. (2015). Bolstering the case for lobectomy in stages I, II, and IIIA small-cell lung cancer using the National Cancer Data Base. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 10(2), 316-323. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000402>
- Cornillon, J., Campos, L., & Guyotat, D. (2003). Focal adhesion kinase (FAK), une protéine aux fonctions multiples. *médecine/sciences*, 19(6-7), Article 6-7. <https://doi.org/10.1051/medsci/20031967743>
- Correa, R. J. M., Peart, T., Valdes, Y. R., DiMattia, G. E., & Shepherd, T. G. (2012). Modulation of AKT activity is associated with reversible dormancy in ascites-derived epithelial ovarian cancer spheroids. *Carcinogenesis*, 33(1), 49-58. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr241>
- Corset, V., Nguyen-Ba-Charvet, K. T., Forcet, C., Moyses, E., Chédotal, A., & Mehlen, P. (2000). Netrin-1-mediated axon outgrowth and cAMP production requires interaction with adenosine A2b receptor. *Nature*, 407(6805), 747-750. <https://doi.org/10.1038/35037600>
- Couchman, J. R. (2003). Syndecans : Proteoglycan regulators of cell-surface microdomains? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(12), 926-938. <https://doi.org/10.1038/nrm1257>
- Daly, M. E., Ismaila, N., Decker, R. H., Higgins, K., Owen, D., Saxena, A., Franklin, G. E., Donaldson, D., & Schneider, B. J. (2021). Radiation Therapy for Small-Cell Lung Cancer : ASCO Guideline Endorsement of an ASTRO Guideline. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 39(8), 931-939. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.03364>
- Das, M., Padda, S. K., Weiss, J., & Owonikoko, T. K. (2021). Advances in Treatment of Recurrent Small Cell Lung Cancer (SCLC) : Insights for Optimizing Patient Outcomes from an Expert Roundtable Discussion. *Advances in Therapy*, 38(11), 5431-5451. <https://doi.org/10.1007/s12325-021-01909-1>
- Davidson, C., Taggart, D., Sims, A. H., Lonergan, D. W., Canel, M., & Serrels, A. (2022). FAK promotes stromal PD-L2 expression associated with poor survival in pancreatic cancer. *British Journal of Cancer*, 127(10), 1893-1905. <https://doi.org/10.1038/s41416-022-01966-5>
- Dawson, J. C., Serrels, A., Stupack, D. G., Schlaepfer, D. D., & Frame, M. C. (2021). Targeting FAK in anticancer combination therapies. *Nature Reviews. Cancer*, 21(5), 313-324. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00340-6>
- Day, R., & Salzet, M. (2002). The neuroendocrine phenotype, cellular plasticity, and the search for genetic switches : Redefining the diffuse neuroendocrine system. *Neuro Endocrinology Letters*, 23(5-6), 447-451.
- de la Torre, J. R., Höpker, V. H., Ming, G. L., Poo, M. M., Tessier-Lavigne, M., Hemmati-Brivanlou, A., & Holt, C. E. (1997). Turning of retinal growth cones in a netrin-1 gradient mediated by the netrin receptor DCC. *Neuron*, 19(6), 1211-1224. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80413-4](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80413-4)
- De Martino, D., & Bravo-Cordero, J. J. (2023). Collagens in cancer : Structural regulators and guardians of cancer progression. *Cancer research*, 83(9), 1386-1392. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-22-2034>
- Della-Bianca, V., Rossi, F., Armato, U., Dal-Pra, I., Costantini, C., Perini, G., Politi, V., & Della Valle, G. (2001). Neurotrophin p75 receptor is involved in neuronal damage by prion peptide-(106-126). *The Journal of biological chemistry*, 276(42), 38929-38933. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107454200>
- Delloye-Bourgeois, C., Brambilla, E., Coissieux, M.-M., Guenebeaud, C., Pedoux, R., Firlej, V., Cabon, F., Brambilla, C., Mehlen, P., & Bernet, A. (2009a). Interference with netrin-1 and tumor cell death in

non-small cell lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 101(4), 237-247. <https://doi.org/10.1093/jnci/djn491>

Delloye-Bourgeois, C., Fitamant, J., Paradisi, A., Cappellen, D., Douc-Rasy, S., Raquin, M.-A., Stupack, D., Nakagawara, A., Rousseau, R., Combaret, V., Puisieux, A., Valteau-Couanet, D., Bénard, J., Bernet, A., & Mehlen, P. (2009b). Netrin-1 acts as a survival factor for aggressive neuroblastoma. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(4), 833-847. <https://doi.org/10.1084/jem.20082299>

Delloye-Bourgeois, C., Rama, N., Brito, J., Le Douarin, N., & Mehlen, P. (2014). Sonic Hedgehog promotes the survival of neural crest cells by limiting apoptosis induced by the dependence receptor CDON during branchial arch development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 452(3), 655-660. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.08.134>

Denny, S. K., Yang, D., Chuang, C.-H., Brady, J. J., Lim, J. S., Grüner, B. M., Chiou, S.-H., Schep, A. N., Baral, J., Hamard, C., Antoine, M., Wislez, M., Kong, C. S., Connolly, A. J., Park, K.-S., Sage, J., Greenleaf, W. J., & Winslow, M. M. (2016). Nfib Promotes Metastasis through a Widespread Increase in Chromatin Accessibility. *Cell*, 166(2), 328-342. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.052>

Diamond, B. H., Verma, N., Shukla, U. C., Park, H. S., & Koffer, P. P. (2022). Consolidative Thoracic Radiation Therapy After First-Line Chemotherapy and Immunotherapy in Extensive-Stage Small Cell Lung Cancer: A Multi-Institutional Case Series. *Advances in Radiation Oncology*, 7(2), 100883. <https://doi.org/10.1016/j.adro.2021.100883>

Diaz Osterman, C. J., Ozmadenci, D., Kleinschmidt, E. G., Taylor, K. N., Barrie, A. M., Jiang, S., Bean, L. M., Sulzmaier, F. J., Jean, C., Tancioni, I., Anderson, K., Uryu, S., Cordasco, E. A., Li, J., Chen, X. L., Fu, G., Ojalill, M., Rappu, P., Heino, J., ... Schlaepfer, D. D. (2019). FAK activity sustains intrinsic and acquired ovarian cancer resistance to platinum chemotherapy. *eLife*, 8, e47327. <https://doi.org/10.7554/eLife.47327>

Dominici, C., Moreno-Bravo, J. A., Puiggros, S. R., Rappeneau, Q., Rama, N., Vieugue, P., Bernet, A., Mehlen, P., & Chédotal, A. (2017). Floor plate-derived netrin-1 is dispensable for commissural axon guidance. *Nature*, 545(7654), 350-354. <https://doi.org/10.1038/nature22331>

Donlon, N. E., Power, R., Hayes, C., Reynolds, J. V., & Lysaght, J. (2021). Radiotherapy, immunotherapy, and the tumour microenvironment: Turning an immunosuppressive milieu into a therapeutic opportunity. *Cancer Letters*, 502, 84-96. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.12.045>

Dooley, A. L., Winslow, M. M., Chiang, D. Y., Banerji, S., Stransky, N., Dayton, T. L., Snyder, E. L., Senna, S., Whittaker, C. A., Bronson, R. T., Crowley, D., Barretina, J., Garraway, L., Meyerson, M., & Jacks, T. (2011). Nuclear factor I/B is an oncogene in small cell lung cancer. *Genes & Development*, 25(14), 1470-1475. <https://doi.org/10.1101/gad.2046711>

Dora, D., Rivard, C., Yu, H., Bunn, P., Suda, K., Ren, S., Lueke Pickard, S., Laszlo, V., Harko, T., Megyesfalvi, Z., Moldvay, J., Hirsch, F. R., Dome, B., & Lohinai, Z. (2020). Neuroendocrine subtypes of small cell lung cancer differ in terms of immune microenvironment and checkpoint molecule distribution. *Molecular Oncology*, 14(9), 1947-1965. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12741>

Doyle, A., Martin, W. J., Funa, K., Gazdar, A., Carney, D., Martin, S. E., Linnoila, I., Cuttitta, F., Mulshine, J., & Bunn, P. (1985). Markedly decreased expression of class I histocompatibility antigens, protein, and mRNA in human small-cell lung cancer. *The Journal of Experimental Medicine*, 161(5), 1135-1151. <https://doi.org/10.1084/jem.161.5.1135>

Drapkin, B. J., & Rudin, C. M. (2021). Advances in Small-Cell Lung Cancer (SCLC) Translational Research. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 11(4), a038240. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038240>

Ducarouge, B., Redavid, A.-R., Victoor, C., Chira, R., Fonseca, A., Hervieu, M., Bergé, R., Lengrand, J., Vieugué, P., Neves, D., Goddard, I., Richaud, M., Laval, P.-A., Rama, N., Goldschneider, D., Paradisi, A., Gourdin, N., Chabaud, S., Treilleux, I., ... Bernet, A. (2023). Netrin-1 blockade inhibits tumor associated Myeloid-derived suppressor cells, cancer stemness and alleviates resistance to chemotherapy and immune checkpoint inhibitor. *Cell Death and Differentiation*, 30(10), 2201-2212. <https://doi.org/10.1038/s41418-023-01209-x>

Eastwood, S. L., & Harrison, P. J. (2008). Decreased mRNA expression of netrin-G1 and netrin-G2 in the temporal lobe in schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 33(4), 933-945. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301457>

Eerola, A. K., Soini, Y., & Pääkkö, P. (2000). A high number of tumor-infiltrating lymphocytes are associated with a small tumor size, low tumor stage, and a favorable prognosis in operated small cell lung carcinoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 6(5), 1875-1881.

El-Bayoumi, E., & Silvestri, G. A. (2008). Bronchoscopy for the diagnosis and staging of lung cancer. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 29(3), 261-270. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1076746>

Elias, E., Ardalan, A., Lindberg, M., Reinsbach, S. E., Muth, A., Nilsson, O., Arvidsson, Y., & Larsson, E. (2021). Independent somatic evolution underlies clustered neuroendocrine tumors in the human small intestine. *Nature Communications*, 12(1), 6367. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26581-5>

Engelkamp, D. (2002). Cloning of three mouse *Unc5* genes and their expression patterns at mid-gestation. *Mechanisms of Development*, 118(1), 191-197. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(02\)00248-4](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(02)00248-4)

Enns, C. A., Jue, S., & Zhang, A.-S. (2021). Hepatocyte neogenin is required for hemojuvelin-mediated hepcidin expression and iron homeostasis in mice. *Blood*, 138(6), 486-499. <https://doi.org/10.1182/blood.2020009485>

Enoki, Y., Sato, T., Kokabu, S., Hayashi, N., Iwata, T., Yamato, M., Usui, M., Matsumoto, M., Tomoda, T., Ariyoshi, W., Nishihara, T., & Yoda, T. (2017). Netrin-4 Promotes Differentiation and Migration of Osteoblasts. *In vivo (Athens, Greece)*, 31(5), 793-799. <https://doi.org/10.21873/invivo.11132>

Ernst, A., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Perl, S., Tisdale, J., Possnert, G., Druid, H., & Frisén, J. (2014). Neurogenesis in the Striatum of the Adult Human Brain. *Cell*, 156(5), 1072-1083. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.044>

Esseghir, S., Kennedy, A., Seedhar, P., Nerurkar, A., Poulson, R., Reis-Filho, J. S., & Isacke, C. M. (2007). Identification of NTN4, TRA1, and STC2 as prognostic markers in breast cancer in a screen for signal sequence encoding proteins. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 13(11), 3164-3173. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0224>

Eveno, C., Broqueres-You, D., Feron, J.-G., Rampanou, A., Tijeras-Raballand, A., Ropert, S., Leconte, L., Levy, B. I., & Pocard, M. (2011). Netrin-4 delays colorectal cancer carcinomatosis by inhibiting tumor angiogenesis. *The American Journal of Pathology*, 178(4), Article 4. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.12.019>

Faivre-Finn, C., Snee, M., Ashcroft, L., Appel, W., Barlesi, F., Bhatnagar, A., Bezjak, A., Cardenal, F., Fournel, P., Harden, S., Le Pechoux, C., McMenemin, R., Mohammed, N., O'Brien, M., Pantarotto, J., Surmont, V., Van Meerbeeck, J. P., Woll, P. J., Lorigan, P., ... CONVERT Study Team. (2017).

- Concurrent once-daily versus twice-daily chemoradiotherapy in patients with limited-stage small-cell lung cancer (CONVERT) : An open-label, phase 3, randomised, superiority trial. *The Lancet. Oncology*, 18(8), 1116-1125. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30318-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30318-2)
- Fang, S., Luo, Y., Zhang, Y., Wang, H., Liu, Q., Li, X., & Yu, T. (2021). NTNG1 Modulates Cisplatin Resistance in Epithelial Ovarian Cancer Cells via the GAS6/AXL/Akt Pathway. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 652325. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.652325>
- Fazeli, A., Dickinson, S. L., Hermiston, M. L., Tighe, R. V., Steen, R. G., Small, C. G., Stoeckli, E. T., Keino-Masu, K., Masu, M., Rayburn, H., Simons, J., Bronson, R. T., Gordon, J. I., Tessier-Lavigne, M., & Weinberg, R. A. (1997). Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. *Nature*, 386(6627), 796-804. <https://doi.org/10.1038/386796a0>
- Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5), 759-767. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90186-i](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90186-i)
- Feldman, E. L., Nave, K.-A., Jensen, T. S., & Bennett, D. L. H. (2017). New Horizons in Diabetic Neuropathy : Mechanisms, Bioenergetics, and Pain. *Neuron*, 93(6), 1296-1313. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.02.005>
- Feldman, L. E., Shin, K. C., Natale, R. B., & Todd, R. F. (1991). Beta 1 integrin expression on human small cell lung cancer cells. *Cancer Research*, 51(4), 1065-1070.
- Fink, T. H., Huber, R. M., Heigener, D. F., Eschbach, C., Waller, C., Steinhauer, E. U., Virchow, J. C., Eberhardt, F., Schweisfurth, H., Schroeder, M., Ittel, T., Hummler, S., Banik, N., Bogenrieder, T., Acker, T., Wolf, M., & "Aktion Bronchialkarzinom" (ABC Study Group). (2012). Topotecan/cisplatin compared with cisplatin/etoposide as first-line treatment for patients with extensive disease small-cell lung cancer : Final results of a randomized phase III trial. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 7(9), 1432-1439. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e318260de75>
- Fisseler-Eckhoff, A., & Demes, M. (2012). Neuroendocrine tumors of the lung. *Cancers*, 4(3), 777-798. <https://doi.org/10.3390/cancers4030777>
- Fitamant, J., Guenebeaud, C., Coissieux, M.-M., Guix, C., Treilleux, I., Scoazec, J.-Y., Bachelot, T., Bernet, A., & Mehlen, P. (2008). Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(12), 4850-4855. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709810105>
- Fox, W., & Scadding, J. G. (1973). Medical Research Council comparative trial of surgery and radiotherapy for primary treatment of small-celled or oat-celled carcinoma of bronchus. Ten-year follow-up. *Lancet (London, England)*, 2(7820), 63-65. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(73\)93260-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(73)93260-1)
- Francescone, R., Barbosa Vendramini-Costa, D., Franco-Barraza, J., Wagner, J., Muir, A., Lau, A. N., Gabitova, L., Pazina, T., Gupta, S., Luong, T., Rollins, D., Malik, R., Thapa, R. J., Restifo, D., Zhou, Y., Cai, K. Q., Hensley, H. H., Tan, Y., Kruger, W. D., ... Cukierman, E. (2021). Netrin G1 Promotes Pancreatic Tumorigenesis through Cancer-Associated Fibroblast-Driven Nutritional Support and Immunosuppression. *Cancer Discovery*, 11(2), 446-479. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-0775>
- Friedl, P., Locker, J., Sahai, E., & Segall, J. E. (2012). Classifying collective cancer cell invasion. *Nature Cell Biology*, 14(8), 777-783. <https://doi.org/10.1038/ncb2548>
- Früh, M., De Ruyscher, D., Popat, S., Crinò, L., Peters, S., Felip, E., & ESMO Guidelines Working Group. (2013). Small-cell lung cancer (SCLC) : ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis,

treatment and follow-up. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 24 Suppl 6, vi99-105. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt178>

Furuta, Y., Ilić, D., Kanazawa, S., Takeda, N., Yamamoto, T., & Aizawa, S. (1995). Mesodermal defect in late phase of gastrulation by a targeted mutation of focal adhesion kinase, FAK. *Oncogene*, 11(10), 1989-1995.

Gad, J. M., Keeling, S. L., Wilks, A. F., Tan, S. S., & Cooper, H. M. (1997). The expression patterns of guidance receptors, DCC and Neogenin, are spatially and temporally distinct throughout mouse embryogenesis. *Developmental Biology*, 192(2), 258-273. <https://doi.org/10.1006/dbio.1997.8756>

Gan, W. B., Wong, V. Y., Phillips, A., Ma, C., Gershon, T. R., & Macagno, E. R. (1999). Cellular expression of a leech netrin suggests roles in the formation of longitudinal nerve tracts and in regional innervation of peripheral targets. *Journal of Neurobiology*, 40(1), 103-115.

Gandhi, L., & Johnson, B. E. (2006). Paraneoplastic syndromes associated with small cell lung cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN*, 4(6), 631-638. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2006.0052>

Ganti, A. K. P., Loo, B. W., Bassetti, M., Blakely, C., Chiang, A., D'Amico, T. A., D'Avella, C., Dowlati, A., Downey, R. J., Edelman, M., Florsheim, C., Gold, K. A., Goldman, J. W., Grecula, J. C., Hann, C., Iams, W., Iyengar, P., Kelly, K., Khalil, M., ... Hughes, M. (2021). Small Cell Lung Cancer, Version 2.2022, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN*, 19(12), 1441-1464. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2021.0058>

Gao, X., Lin, Y., Huang, X., Lu, C., Luo, W., Zeng, D., Li, Y., Su, T., Liang, R., & Ye, J. (2024). Comprehensive analysis of the role of Netrin G1 (NTNG1) in hepatocellular carcinoma cells. *European Journal of Pharmacology*, 963, 176262. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.176262>

Gardner, E. E., Connis, N., Poirier, J. T., Cope, L., Dobromilskaya, I., Gallia, G. L., Rudin, C. M., & Hann, C. L. (2014). Rapamycin rescues ABT-737 efficacy in small cell lung cancer. *Cancer Research*, 74(10), 2846-2856. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3460>

Gardner, E. E., Lok, B. H., Schneeberger, V. E., Desmeules, P., Miles, L. A., Arnold, P. K., Ni, A., Khodos, I., de Stanchina, E., Nguyen, T., Sage, J., Campbell, J. E., Ribich, S., Rekhman, N., Dowlati, A., Massion, P. P., Rudin, C. M., & Poirier, J. T. (2017). Chemosensitive Relapse in Small Cell Lung Cancer Proceeds through an EZH2-SLFN11 Axis. *Cancer Cell*, 31(2), 286-299. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.01.006>

Garrett, A. M., Jucius, T. J., Sigaud, L. P. R., Tang, F.-L., Xiong, W.-C., Ackerman, S. L., & Burgess, R. W. (2016). Analysis of Expression Pattern and Genetic Deletion of Netrin5 in the Developing Mouse. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 9, 3. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00003>

Gay, C., Diao, L., Stewart, C., Xi, Y., Cardnell, R., Swisher, S., Roth, J., Glisson, B., Wang, J., Heymach, J., & Byers, L. (2019). OA03.06 ASCL1, NEUROD1, and POU2F3 Drive Distinct Subtypes of Small Cell Lung Cancer with Unique Therapeutic Vulnerabilities. *Journal of Thoracic Oncology*, 14(10), S213. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2019.08.421>

Gay, C. M., Stewart, C. A., Park, E. M., Diao, L., Groves, S. M., Heeke, S., Nabet, B. Y., Fujimoto, J., Solis, L. M., Lu, W., Xi, Y., Cardnell, R. J., Wang, Q., Fabbri, G., Cargill, K. R., Vokes, N. I., Ramkumar, K., Zhang, B., Della Corte, C. M., ... Byers, L. A. (2021). Patterns of transcription factor programs and immune pathway activation define four major subtypes of SCLC with distinct therapeutic vulnerabilities. *Cancer Cell*, 39(3), 346-360.e7. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.12.014>

- Gayraud, C., Bernaudin, C., Déjardin, T., Seiler, C., & Borghi, N. (2018). Src- and confinement-dependent FAK activation causes E-cadherin relaxation and β -catenin activity. *The Journal of Cell Biology*, 217(3), 1063-1077. <https://doi.org/10.1083/jcb.201706013>
- Gazdar, A. F., Bunn, P. A., & Minna, J. D. (2017). Small-cell lung cancer : What we know, what we need to know and the path forward. *Nature Reviews Cancer*, 17(12), 725-737. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.87>
- Gazdar, A. F., Carney, D. N., Nau, M. M., & Minna, J. D. (1985). Characterization of variant subclasses of cell lines derived from small cell lung cancer having distinctive biochemical, morphological, and growth properties. *Cancer Research*, 45(6), 2924-2930.
- Gazdar, A. F., Gao, B., & Minna, J. D. (2010). Lung cancer cell lines : Useless artifacts or invaluable tools for medical science? *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 68(3), 309-318. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2009.12.005>
- Gazeu, A., Aubert, M., Pissaloux, D., Lantuejoul, S., Pérol, M., Ikhlef, N., Bouhamama, A., Franceschi, T., & Swalduz, A. (2023). Small-Cell Lung Cancer Transformation as a Mechanism of Resistance to Pralsetinib in RET-Rearranged Lung Adenocarcinoma : A Case Report. *Clinical Lung Cancer*, 24(1), 72-75. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2022.10.005>
- Geisbrecht, B. V., Dowd, K. A., Barfield, R. W., Longo, P. A., & Leahy, D. J. (2003). Netrin binds discrete subdomains of DCC and UNC5 and mediates interactions between DCC and heparin. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(35), 32561-32568. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302943200>
- George, E. L., Georges-Labouesse, E. N., Patel-King, R. S., Rayburn, H., & Hynes, R. O. (1993). Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development (Cambridge, England)*, 119(4), 1079-1091. <https://doi.org/10.1242/dev.119.4.1079>
- George, J., Lim, J. S., Jang, S. J., Cun, Y., Ozretić, L., Kong, G., Leenders, F., Lu, X., Fernández-Cuesta, L., Bosco, G., Müller, C., Dahmen, I., Jahchan, N. S., Park, K.-S., Yang, D., Karnezis, A. N., Vaka, D., Torres, A., Wang, M. S., ... Thomas, R. K. (2015). Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature*, 524(7563), 47-53. <https://doi.org/10.1038/nature14664>
- Gerber, D. E., Camidge, D. R., Morgensztern, D., Cetnar, J., Kelly, R. J., Ramalingam, S. S., Spigel, D. R., Jeong, W., Scagliioni, P. P., Zhang, S., Li, M., Weaver, D. T., Vaikus, L., Keegan, M., Horobin, J. C., & Burns, T. F. (2020). Phase 2 study of the focal adhesion kinase inhibitor defactinib (VS-6063) in previously treated advanced KRAS mutant non-small cell lung cancer. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 139, 60-67. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2019.10.033>
- Giancotti, F. G. (2013). Mechanisms governing metastatic dormancy and reactivation. *Cell*, 155(4), 750-764. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.029>
- Gibert, B., Delloye-Bourgeois, C., Gattolliat, C.-H., Meurette, O., Le Guernevel, S., Fombonne, J., Ducarouge, B., Laval, F., Bouhallier, F., Creveaux, M., Negulescu, A. M., Bénard, J., Janoueix-Lerosey, I., Harel-Bellan, A., Delattre, O., & Mehlen, P. (2014). Regulation by miR181 family of the dependence receptor CDON tumor suppressive activity in neuroblastoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 106(11), dju318. <https://doi.org/10.1093/jnci/dju318>
- Ginsberg, M. H. (2014). Integrin activation. *BMB Reports*, 47(12), 655-659. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2014.47.12.241>
- Glasgow, J. E., Byrnes, J. R., Barbee, S. D., Moreau, J. M., Rosenblum, M. D., & Wells, J. A. (2022). Identifying and antagonizing the interactions between layilin and glycosylated collagens. *Cell Chemical Biology*, 29(4), 597-604.e7. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2022.01.003>

- Glatzer, M., Schmid, S., Radovic, M., Früh, M., & Putora, P. M. (2017). The role of radiation therapy in the management of small cell lung cancer. *Breathe (Sheffield, England)*, 13(4), e87-e94. <https://doi.org/10.1183/20734735.009617>
- Glentis, A., Oertle, P., Mariani, P., Chikina, A., El Marjou, F., Attieh, Y., Zaccarini, F., Lae, M., Loew, D., Dingli, F., Sirven, P., Schoumacher, M., Gurchenkov, B. G., Plodinec, M., & Vignjevic, D. M. (2017). Cancer-associated fibroblasts induce metalloprotease-independent cancer cell invasion of the basement membrane. *Nature Communications*, 8(1), 924. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00985-8>
- Goldman, J. W., Dvorkin, M., Chen, Y., Reinmuth, N., Hotta, K., Trukhin, D., Statsenko, G., Hochmair, M. J., Özgüroğlu, M., Ji, J. H., Garassino, M. C., Voitko, O., Poltoratskiy, A., Ponce, S., Verderame, F., Havel, L., Bondarenko, I., Kaźarnowicz, A., Losonczy, G., ... CASPIAN investigators. (2021). Durvalumab, with or without tremelimumab, plus platinum-etoposide versus platinum-etoposide alone in first-line treatment of extensive-stage small-cell lung cancer (CASPIAN): Updated results from a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*, 22(1), 51-65. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30539-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30539-8)
- Golubovskaya, V. M., Finch, R., & Cance, W. G. (2005). Direct Interaction of the N-terminal Domain of Focal Adhesion Kinase with the N-terminal Transactivation Domain of p53 *. *Journal of Biological Chemistry*, 280(26), 25008-25021. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414172200>
- Gopal, S., Veracini, L., Grall, D., Butori, C., Schaub, S., Audebert, S., Camoin, L., Baudelet, E., Radwanska, A., Beghelli-de la Forest Divonne, S., Violette, S. M., Weinreb, P. H., Rekima, S., Ilie, M., Sudaka, A., Hofman, P., & Van Obberghen-Schilling, E. (2017). Fibronectin-guided migration of carcinoma collectives. *Nature Communications*, 8(1), 14105. <https://doi.org/10.1038/ncomms14105>
- Grandin, M., Meier, M., Delcros, J. G., Nikodemus, D., Reuten, R., Patel, T. R., Goldschneider, D., Orriss, G., Krahn, N., Boussouar, A., Abes, R., Dean, Y., Neves, D., Bernet, A., Depil, S., Schneiders, F., Poole, K., Dante, R., Koch, M., ... Stetefeld, J. (2016). Structural Decoding of the Netrin-1/UNC5 Interaction and its Therapeutical Implications in Cancers. *Cancer Cell*, 29(2), 173-185. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.01.001>
- Gridelli, C., Rossi, A., Carbone, D. P., Guarize, J., Karachaliou, N., Mok, T., Petrella, F., Spaggiari, L., & Rosell, R. (2015). Non-small-cell lung cancer. *Nature Reviews. Disease Primers*, 1, 15009. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.9>
- Gudjonsson, T., Rønnov-Jessen, L., Villadsen, R., Rank, F., Bissell, M. J., & Petersen, O. W. (2002). Normal and tumor-derived myoepithelial cells differ in their ability to interact with luminal breast epithelial cells for polarity and basement membrane deposition. *Journal of Cell Science*, 115(1), 39-50. <https://doi.org/10.1242/jcs.115.1.39>
- Guijarro, P., Simó, S., Pascual, M., Abasolo, I., Del Río, J. A., & Soriano, E. (2006). Netrin1 exerts a chemorepulsive effect on migrating cerebellar interneurons in a Dcc-independent way. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 33(4), 389-400. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2006.08.010>
- Guo, Q., Song, Y., Hua, K., & Gao, S. (2017). Involvement of FAK-ERK2 signaling pathway in CKAP2-induced proliferation and motility in cervical carcinoma cell lines. *Scientific Reports*, 7(1), 2117. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01832-y>
- Han, W., Chen, S., Yuan, W., Fan, Q., Tian, J., Wang, X., Chen, L., Zhang, X., Wei, W., Liu, R., Qu, J., Jiao, Y., Austin, R. H., & Liu, L. (2016). Oriented collagen fibers direct tumor cell intravasation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(40), 11208-11213. <https://doi.org/10.1073/pnas.1610347113>

- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer : The next generation. *Cell*, *144*(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Handa, T., Hayashi, T., Ura, A., Watanabe, I., Takamochi, K., Onagi, H., Kishi, M., Matsumoto, N., Tajima, K., Kishikawa, S., Saito, T., Takahashi, K., Suzuki, K., & Yao, T. (2023). Comparison of ASCL1, NEUROD1, and POU2F3 expression in surgically resected specimens, paired tissue microarrays, and lymph node metastases in small cell lung carcinoma. *Histopathology*, *82*(6), 860-869. <https://doi.org/10.1111/his.14872>
- Hao, W., Yu, M., Lin, J., Liu, B., Xing, H., Yang, J., Sun, D., Chen, F., Jiang, M., Tang, C., Zhang, X., Zhao, Y., & Zhu, Y. (2020). The pan-cancer landscape of netrin family reveals potential oncogenic biomarkers. *Scientific Reports*, *10*(1), 5224. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62117-5>
- Harbour, J. W., Lai, S. L., Whang-Peng, J., Gazdar, A. F., Minna, J. D., & Kaye, F. J. (1988). Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. *Science (New York, N.Y.)*, *241*(4863), 353-357. <https://doi.org/10.1126/science.2838909>
- Harris, R., Sabatelli, L. M., & Seeger, M. A. (1996). Guidance Cues at the Drosophila CNS Midline : Identification and Characterization of Two Drosophila Netrin/UNC-6 Homologs. *Neuron*, *17*(2), 217-228. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80154-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80154-3)
- Hassan, W. A., Yoshida, R., Kudoh, S., Hasegawa, K., Niimori-Kita, K., & Ito, T. (2014). Notch1 controls cell invasion and metastasis in small cell lung carcinoma cell lines. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, *86*(3), 304-310. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2014.10.007>
- Hastings, J. F., Skhinas, J. N., Fey, D., Croucher, D. R., & Cox, T. R. (2019). The extracellular matrix as a key regulator of intracellular signalling networks. *British Journal of Pharmacology*, *176*(1), 82-92. <https://doi.org/10.1111/bph.14195>
- Hatfield, L. A., Huskamp, H. A., & Lamont, E. B. (2016). Survival and Toxicity After Cisplatin Plus Etoposide Versus Carboplatin Plus Etoposide for Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer in Elderly Patients. *Journal of Oncology Practice*, *12*(7), 666-673. <https://doi.org/10.1200/JOP.2016.012492>
- Headley, M. B., Bins, A., Nip, A., Roberts, E. W., Looney, M. R., Gerard, A., & Krummel, M. F. (2016). Visualization of immediate immune responses to pioneer metastatic cells in the lung. *Nature*, *531*(7595), 513-517. <https://doi.org/10.1038/nature16985>
- Hecht, S. S. (2012). Lung carcinogenesis by tobacco smoke. *International Journal of Cancer*, *131*(12), 2724-2732. <https://doi.org/10.1002/ijc.27816>
- Hedgecock, E. M., Culotti, J. G., & Hall, D. H. (1990). The unc-5, unc-6, and unc-40 genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells on the epidermis in *C. elegans*. *Neuron*, *4*(1), 61-85. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90444-K](https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90444-K)
- Hiramoto, M., Hiromi, Y., Giniger, E., & Hotta, Y. (2000). The Drosophila Netrin receptor Frazzled guides axons by controlling Netrin distribution. *Nature*, *406*(6798), 886-889. <https://doi.org/10.1038/35022571>
- Hoda, M. A., Klikovits, T., & Klepetko, W. (2018). Controversies in oncology : Surgery for small cell lung cancer? It's time to rethink the case. *ESMO Open*, *3*(3), e000366. <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2018-000366>
- Hodgkinson, C. L., Morrow, C. J., Li, Y., Metcalf, R. L., Rothwell, D. G., Trapani, F., Polanski, R., Burt, D. J., Simpson, K. L., Morris, K., Pepper, S. D., Nonaka, D., Greystoke, A., Kelly, P., Bola, B., Krebs, M. G., Antonello, J., Ayub, M., Faulkner, S., ... Dive, C. (2014). Tumorigenicity and genetic

profiling of circulating tumor cells in small-cell lung cancer. *Nature Medicine*, 20(8), 897-903. <https://doi.org/10.1038/nm.3600>

Hogan, B. L. M., Barkauskas, C. E., Chapman, H. A., Epstein, J. A., Jain, R., Hsia, C. C. W., Niklason, L., Calle, E., Le, A., Randell, S. H., Rock, J., Snitow, M., Krummel, M., Stripp, B. R., Vu, T., White, E. S., Whitsett, J. A., & Morrissey, E. E. (2014). Repair and regeneration of the respiratory system : Complexity, plasticity, and mechanisms of lung stem cell function. *Cell Stem Cell*, 15(2), 123-138. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.07.012>

Horn, L., Mansfield, A. S., Szczęśna, A., Havel, L., Krzakowski, M., Hochmair, M. J., Huemer, F., Losonczy, G., Johnson, M. L., Nishio, M., Reck, M., Mok, T., Lam, S., Shames, D. S., Liu, J., Ding, B., Lopez-Chavez, A., Kabbinar, F., Lin, W., ... IMpower133 Study Group. (2018). First-Line Atezolizumab plus Chemotherapy in Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 379(23), 2220-2229. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1809064>

Horn, L., Reck, M., & Spigel, D. R. (2016). The Future of Immunotherapy in the Treatment of Small Cell Lung Cancer. *The Oncologist*, 21(8), 910-921. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2015-0523>

Hou, J.-M., Krebs, M. G., Lancashire, L., Sloane, R., Backen, A., Swain, R. K., Priest, L. J. C., Greystoke, A., Zhou, C., Morris, K., Ward, T., Blackhall, F. H., & Dive, C. (2012). Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 30(5), 525-532. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.33.3716>

Høye, A. M., & Erler, J. T. (2016). Structural ECM components in the premetastatic and metastatic niche. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 310(11), C955-967. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00326.2015>

Hoyt, R. F., McNelly, N. A., & Sorokin, S. P. (1990). Dynamics of neuroepithelial body (NEB) formation in developing hamster lung : Light microscopic autoradiography after 3H-thymidine labeling in vivo. *The Anatomical Record*, 227(3), 340-350. <https://doi.org/10.1002/ar.1092270309>

Hu, H.-H., Wang, S.-Q., Shang, H.-L., Lv, H.-F., Chen, B.-B., Gao, S.-G., & Chen, X.-B. (2024). Roles and inhibitors of FAK in cancer : Current advances and future directions. *Frontiers in Pharmacology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1274209>

Hu, X., Li, L., Li, F., Yang, Y., An, J., Zhou, X., Zhang, R., Shi, L., Zhao, H., Wang, J., Hu, Y., & Xu, Y. (2023). Neogenin suppresses tumor progression and metastasis via inhibiting Merlin/YAP signaling. *Cell Death Discovery*, 9(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41420-023-01345-w>

Huang, R., Wei, Y., Hung, R. J., Liu, G., Su, L., Zhang, R., Zong, X., Zhang, Z.-F., Morgenstern, H., Brüske, I., Heinrich, J., Hong, Y.-C., Kim, J. H., Cote, M., Wenzlaff, A., Schwartz, A. G., Stucker, I., McLaughlin, J., Marcus, M. W., ... Christiani, D. C. (2015). Associated Links Among Smoking, Chronic Obstructive Pulmonary Disease, and Small Cell Lung Cancer : A Pooled Analysis in the International Lung Cancer Consortium. *EBioMedicine*, 2(11), 1677-1685. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.09.031>

Huang, Y.-H., Klingbeil, O., He, X.-Y., Wu, X. S., Arun, G., Lu, B., Somerville, T. D. D., Milazzo, J. P., Wilkinson, J. E., Demerdash, O. E., Spector, D. L., Egeblad, M., Shi, J., & Vakoc, C. R. (2018). POU2F3 is a master regulator of a tuft cell-like variant of small cell lung cancer. *Genes & Development*, 32(13-14), 915-928. <https://doi.org/10.1101/gad.314815.118>

Huyghe, A., Furlan, G., Ozmadenci, D., Galonska, C., Charlton, J., Gaume, X., Combémoré, N., Riemenschneider, C., Allègre, N., Zhang, J., Wajda, P., Rama, N., Vieugué, P., Durand, I., Brevet, M., Gadot, N., Imhof, T., Merrill, B. J., Koch, M., ... Laval, F. (2020). Netrin-1 promotes naive

pluripotency through *Neo1* and *Unc5b* co-regulation of Wnt and MAPK signalling. *Nature Cell Biology*, 22(4), 389-400. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0483-2>

Hynes, R. O. (1992). Integrins : Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69(1), 11-25. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90115-s](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90115-s)

Hynes, R. O. (2002). Integrins : Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell*, 110(6), 673-687. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00971-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00971-6)

Hynes, R. O., & Naba, A. (2012). Overview of the matrisome—An inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(1), a004903. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004903>

Hystad, P., Demers, P. A., Johnson, K. C., Carpiano, R. M., & Brauer, M. (2013). Long-term residential exposure to air pollution and lung cancer risk. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 24(5), 762-772. <https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e3182949ae7>

Iams, W. T., Shiuan, E., Meador, C. B., Roth, M., Bordeaux, J., Vaupel, C., Boyd, K. L., Summitt, I. B., Wang, L. L., Schneider, J. T., Warner, J. L., Zhao, Z., & Lovly, C. M. (2019). Improved Prognosis and Increased Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Patients Who Have SCLC With Neurologic Paraneoplastic Syndromes. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 14(11), 1970-1981. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2019.05.042>

Ilić, D., Furuta, Y., Kanazawa, S., Takeda, N., Sobue, K., Nakatsuji, N., Nomura, S., Fujimoto, J., Okada, M., & Yamamoto, T. (1995). Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature*, 377(6549), 539-544. <https://doi.org/10.1038/377539a0>

Iozzo, R. V., & Gubbiotti, M. A. (2018). Extracellular Matrix : The driving force of mammalian diseases. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 71-72, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.03.023>

Ireland, A. S., Micinski, A. M., Kastner, D. W., Guo, B., Wait, S. J., Spainhower, K. B., Conley, C. C., Chen, O. S., Guthrie, M. R., Soltero, D., Qiao, Y., Huang, X., Tarapcsák, S., Devarakonda, S., Chalishazar, M. D., Gertz, J., Moser, J. C., Marth, G., Puri, S., ... Oliver, T. G. (2020). MYC Drives Temporal Evolution of Small Cell Lung Cancer Subtypes by Reprogramming Neuroendocrine Fate. *Cancer Cell*, 38(1), 60-78.e12. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.05.001>

Ishii, N., Wadsworth, W. G., Stern, B. D., Culotti, J. G., & Hedgecock, E. M. (1992). UNC-6, a laminin-related protein, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*. *Neuron*, 9(5), 873-881. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90240-E](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90240-E)

Ito, T., Udaka, N., Yazawa, T., Okudela, K., Hayashi, H., Sudo, T., Guillemot, F., Kageyama, R., & Kitamura, H. (2000). Basic helix-loop-helix transcription factors regulate the neuroendocrine differentiation of fetal mouse pulmonary epithelium. *Development (Cambridge, England)*, 127(18), 3913-3921. <https://doi.org/10.1242/dev.127.18.3913>

Jasmin, M., Ahn, E. H., Voutilainen, M. H., Fombonne, J., Guix, C., Viljakainen, T., Kang, S. S., Yu, L., Saarma, M., Mehlen, P., & Ye, K. (2021). Netrin-1 and its receptor DCC modulate survival and death of dopamine neurons and Parkinson's disease features. *The EMBO Journal*, 40(3), e105537. <https://doi.org/10.15252/embj.2020105537>

Jiang, S., Richaud, M., Vieugué, P., Rama, N., Delcros, J.-G., Siouda, M., Sanada, M., Redavid, A.-R., Ducarouge, B., Hervieu, M., Breusa, S., Manceau, A., Gattolliat, C.-H., Gadot, N., Combaret, V., Neves,

- D., Ortiz-Cuaran, S., Saintigny, P., Meurette, O., ... Gibert, B. (2021). Targeting netrin-3 in small cell lung cancer and neuroblastoma. *EMBO Molecular Medicine*, 13(4), e12878. <https://doi.org/10.15252/emmm.202012878>
- Johnson, T. R., Khandrika, L., Kumar, B., Venezia, S., Koul, S., Chandhoke, R., Maroni, P., Donohue, R., Meacham, R. B., & Koul, H. K. (2008). Focal Adhesion Kinase Controls Aggressive Phenotype of Androgen-Independent Prostate Cancer. *Molecular Cancer Research*, 6(10), 1639-1648. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-08-0052>
- Jones, S. F., Siu, L. L., Bendell, J. C., Cleary, J. M., Razak, A. R. A., Infante, J. R., Pandya, S. S., Bedard, P. L., Pierce, K. J., Houk, B., Roberts, W. G., Shreeve, S. M., & Shapiro, G. I. (2015). A phase I study of VS-6063, a second-generation focal adhesion kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Investigational New Drugs*, 33(5), 1100-1107. <https://doi.org/10.1007/s10637-015-0282-y>
- Jordan, E. J., Kim, H. R., Arcila, M. E., Barron, D., Chakravarty, D., Gao, J., Chang, M. T., Ni, A., Kundra, R., Jonsson, P., Jayakumaran, G., Gao, S. P., Johnsen, H. C., Hanrahan, A. J., Zehir, A., Rekhtman, N., Ginsberg, M. S., Li, B. T., Yu, H. A., ... Riely, G. J. (2017). Prospective Comprehensive Molecular Characterization of Lung Adenocarcinomas for Efficient Patient Matching to Approved and Emerging Therapies. *Cancer Discovery*, 7(6), 596-609. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-1337>
- Kai, F., Drain, A. P., & Weaver, V. M. (2019). The Extracellular Matrix Modulates the Metastatic Journey. *Developmental Cell*, 49(3), 332-346. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.03.026>
- Kalemkerian, G. P. (2012). Staging and imaging of small cell lung cancer. *Cancer Imaging: The Official Publication of the International Cancer Imaging Society*, 11(1), 253-258. <https://doi.org/10.1102/1470-7330.2011.0036>
- Kaltsas, G., Androulakis, I. I., de Herder, W. W., & Grossman, A. B. (2010). Paraneoplastic syndromes secondary to neuroendocrine tumours. *Endocrine-Related Cancer*, 17(3), R173-193. <https://doi.org/10.1677/ERC-10-0024>
- Kanchanawong, P., & Calderwood, D. A. (2023). Organization, dynamics and mechanoregulation of integrin-mediated cell-ECM adhesions. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 24(2), 142-161. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00531-5>
- Kang, J., Lemaire, H.-G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K.-H., Multhaup, G., Beyreuther, K., & Müller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, 325(6106), 733-736. <https://doi.org/10.1038/325733a0>
- Kappler, J., Franken, S., Junghans, U., Hoffmann, R., Linke, T., Müller, H. W., & Koch, K.-W. (2000). Glycosaminoglycan-Binding Properties and Secondary Structure of the C-Terminus of Netrin-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 271(2), 287-291. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2583>
- Kasama, H., Sakamoto, Y., Kasamatsu, A., Okamoto, A., Koyama, T., Minakawa, Y., Ogawara, K., Yokoe, H., Shiiba, M., Tanzawa, H., & Uzawa, K. (2015). Adenosine A2b receptor promotes progression of human oral cancer. *BMC Cancer*, 15, 563. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1577-2>
- Kass, L., Erler, J. T., Dembo, M., & Weaver, V. M. (2007). Mammary epithelial cell: Influence of extracellular matrix composition and organization during development and tumorigenesis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(11), 1987-1994. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.06.025>

- Kechagia, J. Z., Ivaska, J., & Roca-Cusachs, P. (2019). Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(8), 457-473. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0134-2>
- Keino-Masu, K., Masu, M., Hinck, L., Leonardo, E. D., Chan, S. S., Culotti, J. G., & Tessier-Lavigne, M. (1996). Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell*, 87(2), 175-185. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81336-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81336-7)
- Kessler, B. E., Sharma, V., Zhou, Q., Jing, X., Pike, L. A., Kerege, A. A., Sams, S. B., & Schweppe, R. E. (2016). FAK Expression, Not Kinase Activity, is a Key Mediator of Thyroid Tumorigenesis and Promutagenic Processes. *Molecular cancer research: MCR*, 14(9), 869-882. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0007>
- Khuder, S. A. (2001). Effect of cigarette smoking on major histological types of lung cancer : A meta-analysis. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 31(2-3), 139-148. [https://doi.org/10.1016/s0169-5002\(00\)00181-1](https://doi.org/10.1016/s0169-5002(00)00181-1)
- Kim, S., Burette, A., Chung, H. S., Kwon, S.-K., Woo, J., Lee, H. W., Kim, K., Kim, H., Weinberg, R. J., & Kim, E. (2006). NGL family PSD-95-interacting adhesion molecules regulate excitatory synapse formation. *Nature Neuroscience*, 9(10), 1294-1301. <https://doi.org/10.1038/nn1763>
- Ko, J., Winslow, M. M., & Sage, J. (2021). Mechanisms of small cell lung cancer metastasis. *EMBO Molecular Medicine*, 13(1), e13122. <https://doi.org/10.15252/emmm.202013122>
- Koch, A. W., Mathivet, T., Larrivée, B., Tong, R. K., Kowalski, J., Pibouin-Fragner, L., Bouvrée, K., Stawicki, S., Nicholes, K., Rathore, N., Scales, S. J., Luis, E., del Toro, R., Freitas, C., Bréant, C., Michaud, A., Corvol, P., Thomas, J.-L., Wu, Y., ... Eichmann, A. (2011). Robo4 maintains vessel integrity and inhibits angiogenesis by interacting with UNC5B. *Developmental Cell*, 20(1), 33-46. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.12.001>
- Koch, M., Murrell, J. R., Hunter, D. D., Olson, P. F., Jin, W., Keene, D. R., Brunken, W. J., & Burgeson, R. E. (2000). A novel member of the netrin family, beta-netrin, shares homology with the beta chain of laminin : Identification, expression, and functional characterization. *The Journal of Cell Biology*, 151(2), 221-234. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.2.221>
- Kohno, T., Sato, T., Takakura, S., Takei, K., Inoue, K., Nishioka, M., & Yokota, J. (2000). Mutation and Expression of the DCC Gene in Human Lung Cancer. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 2(4), 300-305.
- Kondo, R., Watanabe, S., Shoji, S., Ichikawa, K., Abe, T., Baba, J., Tanaka, J., Tsukada, H., Terada, M., Sato, K., Maruyama, Y., Makino, M., Hirata, A., Tanaka, H., Koya, T., Yoshizawa, H., & Kikuchi, T. (2018). A Phase II Study of Irinotecan for Patients with Previously Treated Small-Cell Lung Cancer. *Oncology*, 94(4), 223-232. <https://doi.org/10.1159/000486622>
- Kruger, R. P., Lee, J., Li, W., & Guan, K.-L. (2004). Mapping Netrin Receptor Binding Reveals Domains of Unc5 Regulating Its Tyrosine Phosphorylation. *The Journal of Neuroscience*, 24(48), 10826-10834. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3715-04.2004>
- Kryza, D., Wischhusen, J., Richaud, M., Hervieu, M., Sidi Boumedine, J., Delcros, J., Besse, S., Baudier, T., Laval, P., Breusa, S., Boutault, E., Clermidy, H., Rama, N., Ducarouge, B., Devouassoux-Shisheboran, M., Chezal, J., Giraudet, A., Walter, T., Mehlen, P., ... Gibert, B. (2023). From netrin-1-targeted SPECT/CT to internal radiotherapy for management of advanced solid tumors. *EMBO Molecular Medicine*, 15(4), e16732. <https://doi.org/10.15252/emmm.202216732>
- Kuo, C. S., & Krasnow, M. A. (2015). Formation of a Neurosensory Organ by Epithelial Cell Slithering. *Cell*, 163(2), 394-405. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.021>

- Lad, T., Piantadosi, S., Thomas, P., Payne, D., Ruckdeschel, J., & Giaccone, G. (1994). A prospective randomized trial to determine the benefit of surgical resection of residual disease following response of small cell lung cancer to combination chemotherapy. *Chest*, *106*(6 Suppl), 320S-323S. https://doi.org/10.1378/chest.106.6_supplement.320s
- Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R., & Weinberg, R. A. (2017). EMERGING BIOLOGICAL PRINCIPLES OF METASTASIS. *Cell*, *168*(4), 670-691. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.037>
- Larrieu-Lahargue, F., Welm, A. L., Thomas, K. R., & Li, D. Y. (2010). Netrin-4 induces lymphangiogenesis in vivo. *Blood*, *115*(26), 5418-5426. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-11-252338>
- Lee, K. H., Lim, K. Y., Suh, Y. J., Hur, J., Han, D. H., Kang, M. J., Choo, J. Y., Kim, C., Kim, J. I., Yoon, S. H., Lee, W., & Park, C. M. (2019). Diagnostic Accuracy of Percutaneous Transthoracic Needle Lung Biopsies: A Multicenter Study. *Korean Journal of Radiology*, *20*(8), 1300-1310. <https://doi.org/10.3348/kjr.2019.0189>
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K. K., & Hempstead, B. L. (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science (New York, N.Y.)*, *294*(5548), 1945-1948. <https://doi.org/10.1126/science.1065057>
- Lejmi, E., Leconte, L., Pédrón-Mazoyer, S., Ropert, S., Raoul, W., Lavalette, S., Bouras, I., Feron, J.-G., Maitre-Boube, M., Assayag, F., Feumi, C., Alemany, M., Jie, T. X., Merkulova, T., Poupon, M.-F., Ruchoux, M.-M., Tobelem, G., Sennlaub, F., & Plouët, J. (2008). Netrin-4 inhibits angiogenesis via binding to neogenin and recruitment of Unc5B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(34), 12491-12496. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804008105>
- Lengyel, E., Burdette, J. E., Kenny, H. A., Matei, D., Pilrose, J., Haluska, P., Nephew, K. P., Hales, D. B., & Stack, M. S. (2014). Epithelial ovarian cancer experimental models. *Oncogene*, *33*(28), 3619-3633. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.321>
- Lennon, V. A., Kryzer, T. J., Griesmann, G. E., O'Suilleabhain, P. E., Windebank, A. J., Woppmann, A., Miljanich, G. P., & Lambert, E. H. (1995). Calcium-channel antibodies in the Lambert-Eaton syndrome and other paraneoplastic syndromes. *The New England Journal of Medicine*, *332*(22), 1467-1474. <https://doi.org/10.1056/NEJM199506013322203>
- Leonardo, E. D., Hinck, L., Masu, M., Keino-Masu, K., Ackerman, S. L., & Tessier-Lavigne, M. (1997). Vertebrate homologues of *C. elegans* UNC-5 are candidate netrin receptors. *Nature*, *386*(6627), 833-838. <https://doi.org/10.1038/386833a0>
- Li, J., Zhang, X., Hou, Z., Cai, S., Guo, Y., Sun, L., Li, A., Li, Q., Wang, E., & Miao, Y. (2022). P130cas-FAK interaction is essential for YAP-mediated radioresistance of non-small cell lung cancer. *Cell Death & Disease*, *13*(9), 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05224-7>
- Li, W., Lee, J., Vikis, H. G., Lee, S.-H., Liu, G., Aurandt, J., Shen, T.-L., Fearon, E. R., Guan, J.-L., Han, M., Rao, Y., Hong, K., & Guan, K.-L. (2004). Activation of FAK and Src are receptor-proximal events required for netrin signaling. *Nature Neuroscience*, *7*(11), 1213-1221. <https://doi.org/10.1038/nn1329>
- Lietha, D., Cai, X., Ceccarelli, D. F. J., Li, Y., Schaller, M. D., & Eck, M. J. (2007). Structural basis for the autoinhibition of focal adhesion kinase. *Cell*, *129*(6), 1177-1187. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.041>
- Lim, J. S., Ibaseta, A., Fischer, M. M., Cancilla, B., O'Young, G., Cristea, S., Luca, V. C., Yang, D., Jahchan, N. S., Hamard, C., Antoine, M., Wislez, M., Kong, C., Cain, J., Liu, Y.-W., Kapoun, A. M.,

- Garcia, K. C., Hoey, T., Murriel, C. L., & Sage, J. (2017). Intratumoral heterogeneity generated by Notch signaling promotes small cell lung cancer. *Nature*, *545*(7654), 360-364. <https://doi.org/10.1038/nature22323>
- Lim, S.-T., Chen, X. L., Lim, Y., Hanson, D. A., Vo, T.-T., Howerton, K., Larocque, N., Fisher, S. J., Schlaepfer, D. D., & Ilic, D. (2008). Nuclear FAK promotes cell proliferation and survival through FERM-enhanced p53 degradation. *Molecular Cell*, *29*(1), 9-22. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.031>
- Lim, S.-T., Miller, N. L. G., Nam, J.-O., Chen, X. L., Lim, Y., & Schlaepfer, D. D. (2010). Pyk2 Inhibition of p53 as an Adaptive and Intrinsic Mechanism Facilitating Cell Proliferation and Survival *. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(3), 1743-1753. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.064212>
- Lin, J. C., Ho, W.-H., Gurney, A., & Rosenthal, A. (2003). The netrin-G1 ligand NGL-1 promotes the outgrowth of thalamocortical axons. *Nature Neuroscience*, *6*(12), 1270-1276. <https://doi.org/10.1038/nn1148>
- Liu, G., Li, W., Wang, L., Kar, A., Guan, K.-L., Rao, Y., & Wu, J. Y. (2009). DSCAM functions as a netrin receptor in commissural axon pathfinding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(8), 2951-2956. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811083106>
- Liu, S., Shi-wen, X., Kennedy, L., Pala, D., Chen, Y., Eastwood, M., Carter, D. E., Black, C. M., Abraham, D. J., & Leask, A. (2007). FAK Is Required for TGF β -induced JNK Phosphorylation in Fibroblasts : Implications for Acquisition of a Matrix-remodeling Phenotype. *Molecular Biology of the Cell*, *18*(6), 2169-2178. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-12-1121>
- Liu, X., Jiang, T., Li, W., Li, X., Zhao, C., Shi, J., Zhao, S., Jia, Y., Qiao, M., Zhang, L., Luo, J., Gao, G., Zhou, F., Wu, F., Chen, X., He, Y., Ren, S., Su, C., & Zhou, C. (2018). Characterization of never-smoking and its association with clinical outcomes in Chinese patients with small-cell lung cancer. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, *115*, 109-115. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2017.11.022>
- Liu, Y., Stein, E., Oliver, T., Li, Y., Brunken, W. J., Koch, M., Tessier-Lavigne, M., & Hogan, B. L. M. (2004). Novel Role for Netrins in Regulating Epithelial Behavior during Lung Branching Morphogenesis. *Current Biology*, *14*(10), 897-905. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.05.020>
- Llambi, F., Causeret, F., Bloch-Gallego, E., & Mehlen, P. (2001). Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. *The EMBO Journal*, *20*(11), 2715-2722. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.11.2715>
- Lochmann, T. L., Floros, K. V., Naseri, M., Powell, K. M., Cook, W., March, R. J., Stein, G. T., Greninger, P., Maves, Y. K., Saunders, L. R., Dylla, S. J., Costa, C., Boikos, S. A., Levenson, J. D., Souers, A. J., Krystal, G. W., Harada, H., Benes, C. H., & Faber, A. C. (2018). Venetoclax Is Effective in Small-Cell Lung Cancers with High BCL-2 Expression. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *24*(2), 360-369. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-1606>
- Lock, J. G., Wehrle-Haller, B., & Strömlblad, S. (2008). Cell-matrix adhesion complexes : Master control machinery of cell migration. *Seminars in Cancer Biology*, *18*(1), 65-76. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2007.10.001>
- Lohinai, Z., Megyesfalvi, Z., Suda, K., Harko, T., Ren, S., Moldvay, J., Laszlo, V., Rivard, C., Dome, B., & Hirsch, F. R. (2019). Comparative expression analysis in small cell lung carcinoma reveals neuroendocrine pattern change in primary tumor versus lymph node metastases. *Translational Lung Cancer Research*, *8*(6), 938-950. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2019.11.30>

- Lourenço, F. C., Galvan, V., Fombonne, J., Corset, V., Llambi, F., Müller, U., Bredesen, D. E., & Mehlen, P. (2009). Netrin-1 interacts with amyloid precursor protein and regulates amyloid- β production. *Cell Death & Differentiation*, *16*(5), 655-663. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.191>
- Lu, X., Le Noble, F., Yuan, L., Jiang, Q., De Lafarge, B., Sugiyama, D., Bréant, C., Claes, F., De Smet, F., Thomas, J.-L., Autiero, M., Carmeliet, P., Tessier-Lavigne, M., & Eichmann, A. (2004). The netrin receptor UNC5B mediates guidance events controlling morphogenesis of the vascular system. *Nature*, *432*(7014), 179-186. <https://doi.org/10.1038/nature03080>
- Lu, Z., Jiang, G., Blume-Jensen, P., & Hunter, T. (2001). Epidermal growth factor-induced tumor cell invasion and metastasis initiated by dephosphorylation and downregulation of focal adhesion kinase. *Molecular and Cellular Biology*, *21*(12), 4016-4031. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.12.4016-4031.2001>
- Luchino, J., Hocine, M., Amoureux, M.-C., Gibert, B., Bernet, A., Royet, A., Treilleux, I., Lécine, P., Borg, J.-P., Mehlen, P., Chauvet, S., & Mann, F. (2013). Semaphorin 3E suppresses tumor cell death triggered by the plexin D1 dependence receptor in metastatic breast cancers. *Cancer Cell*, *24*(5), 673-685. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.09.010>
- Lv, B., Song, C., Wu, L., Zhang, Q., Hou, D., Chen, P., Yu, S., Wang, Z., Chu, Y., Zhang, J., Yang, D., & Liu, J. (2015). Netrin-4 as a biomarker promotes cell proliferation and invasion in gastric cancer. *Oncotarget*, *6*(12), 9794-9806.
- Ly, A., Nikolaev, A., Suresh, G., Zheng, Y., Tessier-Lavigne, M., & Stein, E. (2008). DSCAM is a netrin receptor that collaborates with DCC in mediating turning responses to netrin-1. *Cell*, *133*(7), 1241-1254. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.030>
- Madsen, C. D. (2021). Pancreatic cancer is suppressed by fibroblast-derived collagen I. *Cancer Cell*, *39*(4), 451-453. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.02.017>
- Maitra, A. (2019). Molecular envoys pave the way for pancreatic cancer to invade the liver. *Nature*, *567*(7747), 181-182. <https://doi.org/10.1038/d41586-019-00710-z>
- Malik, G., Knowles, L. M., Dhir, R., Xu, S., Yang, S., Ruoslahti, E., & Pilch, J. (2010). Plasma fibronectin promotes lung metastasis by contributions to fibrin clots and tumor cell invasion. *Cancer Research*, *70*(11), 4327-4334. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3312>
- Manitt, C., Colicos, M. A., Thompson, K. M., Rousselle, E., Peterson, A. C., & Kennedy, T. E. (2001). Widespread Expression of Netrin-1 by Neurons and Oligodendrocytes in the Adult Mammalian Spinal Cord. *Journal of Neuroscience*, *21*(11), 3911-3922. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-11-03911.2001>
- Manitt, C., Thompson, K. M., & Kennedy, T. E. (2004). Developmental shift in expression of netrin receptors in the rat spinal cord: Predominance of UNC-5 homologues in adulthood. *Journal of Neuroscience Research*, *77*(5), 690-700. <https://doi.org/10.1002/jnr.20199>
- Marinkovich, M. P. (2007). Laminin 332 in squamous-cell carcinoma. *Nature Reviews Cancer*, *7*(5), 370-380. <https://doi.org/10.1038/nrc2089>
- Martucci, F., Pascale, M., Valli, M. C., Pesce, G. A., Froesch, P., Giovanella, L., Richetti, A., & Treglia, G. (2019). Impact of 18F-FDG PET/CT in Staging Patients With Small Cell Lung Cancer : A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Medicine*, *6*, 336. <https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00336>
- Maruyama, K., Kawasaki, T., Hamaguchi, M., Hashimoto, M., Furu, M., Ito, H., Fujii, T., Takemura, N., Karuppuchamy, T., Kondo, T., Kawasaki, T., Fukasaka, M., Misawa, T., Saitoh, T., Suzuki, Y.,

- Martino, M. M., Kumagai, Y., & Akira, S. (2016). Bone-protective Functions of Netrin 1 Protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(46), 23854-23868. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.738518>
- Mascaux, C., Paesmans, M., Berghmans, T., Branle, F., Lafitte, J. J., Lemaitre, F., Meert, A. P., Vermynen, P., Sculier, J. P., & European Lung Cancer Working Party (ELCWP). (2000). A systematic review of the role of etoposide and cisplatin in the chemotherapy of small cell lung cancer with methodology assessment and meta-analysis. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 30(1), 23-36. [https://doi.org/10.1016/s0169-5002\(00\)00127-6](https://doi.org/10.1016/s0169-5002(00)00127-6)
- Massagué, J., & Ganesh, K. (2021). Metastasis-Initiating Cells and Ecosystems. *Cancer Discovery*, 11(4), 971-994. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-0010>
- Massagué, J., & Obenauf, A. C. (2016). Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature*, 529(7586), 298-306. <https://doi.org/10.1038/nature17038>
- Masuda, T., Watanabe, K., Sakuma, C., Ikenaka, K., Ono, K., & Yaginuma, H. (2008). Netrin-1 Acts as a Repulsive Guidance Cue for Sensory Axonal Projections toward the Spinal Cord. *Journal of Neuroscience*, 28(41), 10380-10385. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1926-08.2008>
- Mathieu, L., Shah, S., Pai-Scherf, L., Larkins, E., Vallejo, J., Li, X., Rodriguez, L., Mishra-Kalyani, P., Goldberg, K. B., Kluetz, P. G., Theoret, M. R., Beaver, J. A., Pazdur, R., & Singh, H. (2021). FDA Approval Summary: Atezolizumab and Durvalumab in Combination with Platinum-Based Chemotherapy in Extensive Stage Small Cell Lung Cancer. *The Oncologist*, 26(5), 433-438. <https://doi.org/10.1002/onco.13752>
- Matsunaga, E., Tauszig-Delamasure, S., Monnier, P. P., Mueller, B. K., Strittmatter, S. M., Mehlen, P., & Chédotal, A. (2004). RGM and its receptor neogenin regulate neuronal survival. *Nature Cell Biology*, 6(8), 749-755. <https://doi.org/10.1038/ncb1157>
- Matthay, K. K., Maris, J. M., Schleiermacher, G., Nakagawara, A., Mackall, C. L., Diller, L., & Weiss, W. A. (2016). Neuroblastoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 2(1), 1-21. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.78>
- Matus, D. Q., Pang, K., Marlow, H., Dunn, C. W., Thomsen, G. H., & Martindale, M. Q. (2006). Molecular evidence for deep evolutionary roots of bilaterality in animal development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(30), 11195-11200. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601257103>
- McLean, G. W., Carragher, N. O., Avizienyte, E., Evans, J., Brunton, V. G., & Frame, M. C. (2005). The role of focal-adhesion kinase in cancer—A new therapeutic opportunity. *Nature Reviews. Cancer*, 5(7), 505-515. <https://doi.org/10.1038/nrc1647>
- Mediero, A., Ramkhelawon, B., Perez-Aso, M., Moore, K. J., & Cronstein, B. N. (2015). Netrin-1 is a critical autocrine/paracrine factor for osteoclast differentiation. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 30(5), 837-854. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2421>
- Meert, A. P., Paesmans, M., Berghmans, T., Martin, B., Mascaux, C., Vallot, F., Verdebout, J. M., Lafitte, J. J., & Sculier, J. P. (2001). Prophylactic cranial irradiation in small cell lung cancer: A systematic review of the literature with meta-analysis. *BMC Cancer*, 1, 5. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-1-5>
- Megyesfalvi, Z., Barany, N., Lantos, A., Valko, Z., Pipek, O., Lang, C., Schwendenwein, A., Oberndorfer, F., Paku, S., Ferencz, B., Dezso, K., Fillinger, J., Lohinai, Z., Moldvay, J., Galffy, G., Szeitz, B., Rezeli, M., Rivard, C., Hirsch, F. R., ... Dome, B. (2022). Expression patterns and prognostic

relevance of subtype-specific transcription factors in surgically resected small-cell lung cancer : An international multicenter study. *The Journal of Pathology*, 257(5), 674-686. <https://doi.org/10.1002/path.5922>

Megyesfalvi, Z., Gay, C. M., Popper, H., Pirker, R., Ostoros, G., Heeke, S., Lang, C., Hoetzenecker, K., Schwendenwein, A., Boettiger, K., Bunn, P. A., Renyi-Vamos, F., Schelch, K., Prosch, H., Byers, L. A., Hirsch, F. R., & Dome, B. (2023). Clinical insights into small cell lung cancer : Tumor heterogeneity, diagnosis, therapy, and future directions. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 73(6), 620-652. <https://doi.org/10.3322/caac.21785>

Megyesfalvi, Z., Tallosy, B., Pipek, O., Fillinger, J., Lang, C., Klikovits, T., Schwendenwein, A., Hoda, M. A., Renyi-Vamos, F., Laszlo, V., Rezeli, M., Moldvay, J., & Dome, B. (2021). The landscape of small cell lung cancer metastases : Organ specificity and timing. *Thoracic Cancer*, 12(6), 914-923. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.13854>

Mehlen, P., & Fattet, L. (2021). Netrin-4 regulates stiffness and metastasis. *Nature Materials*, 20(6), 722-723. <https://doi.org/10.1038/s41563-021-01012-4>

Mehlen, P., Rabizadeh, S., Snipas, S. J., Assa-Munt, N., Salvesen, G. S., & Bredesen, D. E. (1998). The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature*, 395(6704), 801-804. <https://doi.org/10.1038/27441>

Meuwissen, R., Linn, S. C., Linnoila, R. I., Zevenhoven, J., Mooi, W. J., & Berns, A. (2003). Induction of small cell lung cancer by somatic inactivation of both Trp53 and Rb1 in a conditional mouse model. *Cancer Cell*, 4(3), 181-189. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(03\)00220-4](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(03)00220-4)

Meyerhardt, J. A., Look, A. T., Bigner, S. H., & Fearon, E. R. (1997). Identification and characterization of neogenin, a DCC-related gene. *Oncogene*, 14(10), 1129-1136. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1200935>

Mirakaj, V., & Rosenberger, P. (2017). Immunomodulatory Functions of Neuronal Guidance Proteins. *Trends in Immunology*, 38(6), 444-456. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.03.007>

Miroshnikova, Y. A., Rozenberg, G. I., Cassereau, L., Pickup, M., Mouw, J. K., Ou, G., Templeman, K. L., Hannachi, E.-I., Gooch, K. J., Sarang-Sieminski, A. L., Garcia, A. J., & Weaver, V. M. (2017). A5β1-Integrin promotes tension-dependent mammary epithelial cell invasion by engaging the fibronectin synergy site. *Molecular Biology of the Cell*, 28(22), 2958-2977. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-02-0126>

Mitra, A., Sawada, K., Tiwari, P., Mui, K., Gwin, K., & Lengyel, E. (2011). Ligand independent activation of c-Met by fibronectin and α5β1-integrin regulates ovarian cancer invasion and metastasis. *Oncogene*, 30(13), 1566-1576. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.532>

Mohammadi, H., & Sahai, E. (2018). Mechanisms and impact of altered tumour mechanics. *Nature Cell Biology*, 20(7), 766-774. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0131-2>

Mollaoglu, G., Guthrie, M. R., Böhm, S., Brägelmann, J., Can, I., Ballieu, P. M., Marx, A., George, J., Heinen, C., Chalishazar, M. D., Cheng, H., Ireland, A. S., Denning, K. E., Mukhopadhyay, A., Vahrenkamp, J. M., Berrett, K. C., Mosbrugger, T. L., Wang, J., Kohan, J. L., ... Oliver, T. G. (2017). MYC Drives Progression of Small Cell Lung Cancer to a Variant Neuroendocrine Subtype with Vulnerability to Aurora Kinase Inhibition. *Cancer Cell*, 31(2), 270-285. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.12.005>

- Morgan, M. R., Humphries, M. J., & Bass, M. D. (2007). Synergistic control of cell adhesion by integrins and syndecans. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(12), 957-969. <https://doi.org/10.1038/nrm2289>
- Morgensztern, D., Besse, B., Greillier, L., Santana-Davila, R., Ready, N., Hann, C. L., Glisson, B. S., Farago, A. F., Dowlati, A., Rudin, C. M., Le Moulec, S., Lally, S., Yalamanchili, S., Wolf, J., Govindan, R., & Carbone, D. P. (2019). Efficacy and Safety of Rovalpituzumab Tesirine in Third-Line and Beyond Patients with DLL3-Expressing, Relapsed/Refractory Small-Cell Lung Cancer : Results From the Phase II TRINITY Study. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 25(23), 6958-6966. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-1133>
- Morimoto, M., Nishinakamura, R., Saga, Y., & Kopan, R. (2012). Different assemblies of Notch receptors coordinate the distribution of the major bronchial Clara, ciliated and neuroendocrine cells. *Development (Cambridge, England)*, 139(23), 4365-4373. <https://doi.org/10.1242/dev.083840>
- Mui, K. L., Chen, C. S., & Assoian, R. K. (2016). The mechanical regulation of integrin-cadherin crosstalk organizes cells, signaling and forces. *Journal of Cell Science*, 129(6), 1093-1100. <https://doi.org/10.1242/jcs.183699>
- Murphy, J. M., Jeong, K., Cioffi, D. L., Campbell, P. M., Jo, H., Ahn, E.-Y. E., & Lim, S.-T. S. (2021). Focal Adhesion Kinase Activity and Localization is Critical for TNF- α -Induced Nuclear Factor- κ B Activation. *Inflammation*, 44(3), 1130-1144. <https://doi.org/10.1007/s10753-020-01408-5>
- Murphy, J. M., Rodriguez, Y. A. R., Jeong, K., Ahn, E.-Y. E., & Lim, S.-T. S. (2020). Targeting focal adhesion kinase in cancer cells and the tumor microenvironment. *Experimental & Molecular Medicine*, 52(6), 877-886. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0447-4>
- Murray, N., Coy, P., Pater, J. L., Hodson, I., Arnold, A., Zee, B. C., Payne, D., Kostashuk, E. C., Evans, W. K., & Dixon, P. (1993). Importance of timing for thoracic irradiation in the combined modality treatment of limited-stage small-cell lung cancer. The National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 11(2), 336-344. <https://doi.org/10.1200/JCO.1993.11.2.336>
- Naba, A., Clauser, K. R., Ding, H., Whittaker, C. A., Carr, S. A., & Hynes, R. O. (2016). The extracellular matrix : Tools and insights for the « omics » era. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 49, 10-24. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.06.003>
- Nacht, M., St Martin, T. B., Byrne, A., Klinger, K. W., Teicher, B. A., Madden, S. L., & Jiang, Y. (2009). Netrin-4 regulates angiogenic responses and tumor cell growth. *Experimental Cell Research*, 315(5), 784-794. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.11.018>
- Nader, G. P. F., Ezratty, E. J., & Gundersen, G. G. (2016). FAK, talin and PIPKI γ regulate endocytosed integrin activation to polarize focal adhesion assembly. *Nature Cell Biology*, 18(5), 491-503. <https://doi.org/10.1038/ncb3333>
- Nakashiba, T., Ikeda, T., Nishimura, S., Tashiro, K., Honjo, T., Culotti, J. G., & Itoharu, S. (2000). Netrin-G1 : A novel glycosyl phosphatidylinositol-linked mammalian netrin that is functionally divergent from classical netrins. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(17), 6540-6550. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-17-06540.2000>
- Nicholson, A. G., Tsao, M. S., Beasley, M. B., Borczuk, A. C., Brambilla, E., Cooper, W. A., Dacic, S., Jain, D., Kerr, K. M., Lantuejoul, S., Noguchi, M., Papotti, M., Rekhtman, N., Scagliotti, G., van Schil, P., Sholl, L., Yatabe, Y., Yoshida, A., & Travis, W. D. (2022). The 2021 WHO Classification of Lung Tumors : Impact of Advances Since 2015. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the*

International Association for the Study of Lung Cancer, 17(3), 362-387.
<https://doi.org/10.1016/j.jtho.2021.11.003>

Niho, S., Fujii, H., Murakami, K., Nagase, S., Yoh, K., Goto, K., Ohmatsu, H., Kubota, K., Sekiguchi, R., Nawano, S., Saijo, N., & Nishiwaki, Y. (2007). Detection of unsuspected distant metastases and/or regional nodes by FDG-PET [corrected] scan in apparent limited-disease small-cell lung cancer. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 57(3), 328-333. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2007.04.001>

Nikitovic, D., Berdiaki, A., Spyridaki, I., Krasanakis, T., Tsatsakis, A., & Tzanakakis, G. N. (2018). Proteoglycans-Biomarkers and Targets in Cancer Therapy. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 69. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00069>

Nishimura-Akiyoshi, S., Niimi, K., Nakashiba, T., & Itohara, S. (2007). Axonal netrin-Gs transneuronally determine lamina-specific subdendritic segments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(37), 14801-14806. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706919104>

Noguchi, M., Furukawa, K. T., & Morimoto, M. (2020). Pulmonary neuroendocrine cells : Physiology, tissue homeostasis and disease. *Disease Models & Mechanisms*, 13(12), dmm046920. <https://doi.org/10.1242/dmm.046920>

Ohtsuki, T., Horiuchi, Y., Koga, M., Ishiguro, H., Inada, T., Iwata, N., Ozaki, N., Ujike, H., Watanabe, Y., Someya, T., & Arinami, T. (2008). Association of polymorphisms in the haplotype block spanning the alternatively spliced exons of the NTNG1 gene at 1p13.3 with schizophrenia in Japanese populations. *Neuroscience Letters*, 435(3), 194-197. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.02.053>

Osborne, P. B., Halliday, G. M., Cooper, H. M., & Keast, J. R. (2005). Localization of immunoreactivity for Deleted in Colorectal Cancer (DCC), the receptor for the guidance factor netrin-1, in ventral tier dopamine projection pathways in adult rodents. *Neuroscience*, 131(3), 671-681. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.11.043>

Oser, M. G., Niederst, M. J., Sequist, L. V., & Engelman, J. A. (2015). Transformation from non-small-cell lung cancer to small-cell lung cancer : Molecular drivers and cells of origin. *The Lancet. Oncology*, 16(4), e165-172. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)71180-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71180-5)

Oshita, F., Kameda, Y., Hamanaka, N., Saito, H., Yamada, K., Noda, K., & Mitsuda, A. (2004). High expression of integrin beta1 and p53 is a greater poor prognostic factor than clinical stage in small-cell lung cancer. *American Journal of Clinical Oncology*, 27(3), 215-219. <https://doi.org/10.1097/01.coc.0000054894.64867.80>

Oskarsson, T. (2013). Extracellular matrix components in breast cancer progression and metastasis. *The Breast*, 22, S66-S72. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2013.07.012>

Owen, D. H., Giffin, M. J., Bailis, J. M., Smit, M.-A. D., Carbone, D. P., & He, K. (2019). DLL3 : An emerging target in small cell lung cancer. *Journal of Hematology & Oncology*, 12(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0745-2>

Owonikoko, T. K., Behera, M., Chen, Z., Bhimani, C., Curran, W. J., Khuri, F. R., & Ramalingam, S. S. (2012). A systematic analysis of efficacy of second-line chemotherapy in sensitive and refractory small-cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 7(5), 866-872. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e31824c7f4b>

Owonikoko, T. K., Niu, H., Nackaerts, K., Csozsi, T., Ostoros, G., Mark, Z., Baik, C., Joy, A. A., Chouaid, C., Jaime, J. C., Kolek, V., Majem, M., Roubec, J., Santos, E. S., Chiang, A. C., Speranza, G.,

- Belani, C. P., Chiappori, A., Patel, M. R., ... C14018 study investigators. (2020). Randomized Phase II Study of Paclitaxel plus Alisertib versus Paclitaxel plus Placebo as Second-Line Therapy for SCLC: Primary and Correlative Biomarker Analyses. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 15(2), Article 2. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2019.10.013>
- Ozmadenci, D., Féraud, O., Markossian, S., Kress, E., Ducarouge, B., Gibert, B., Ge, J., Durand, I., Gadot, N., Plateroti, M., Bennaceur-Griscelli, A., Scoazec, J.-Y., Gil, J., Deng, H., Bernet, A., Mehlen, P., & Laval, F. (2015). Netrin-1 regulates somatic cell reprogramming and pluripotency maintenance. *Nature Communications*, 6, 7398. <https://doi.org/10.1038/ncomms8398>
- Pan, W., Huang, X., Yu, Z., Ding, Q., Xia, L., Hua, J., Gu, B., Xiong, Q., Yu, H., Wang, J., Xu, Z., Zeng, L., Bai, G., & Liu, H. (2023). Netrin-3 Suppresses Diabetic Neuropathic Pain by Gating the Intra-epidermal Sprouting of Sensory Axons. *Neuroscience Bulletin*, 39(5), 745-758. <https://doi.org/10.1007/s12264-022-01011-8>
- Pan, Y., Liu, G., Fang, M., Shen, L., Wang, L., Han, Y., Shen, D., & Wang, X. (2010). Abnormal expression of netrin-G2 in temporal lobe epilepsy neurons in humans and a rat model. *Experimental Neurology*, 224(2), 340-346. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.04.001>
- Pankova, D., Chen, Y., Terajima, M., Schliekelman, M. J., Baird, B. N., Fahrenholtz, M., Sun, L., Gill, B. J., Vadakkan, T. J., Kim, M. P., Ahn, Y.-H., Roybal, J. D., Liu, X., Parra Cuentas, E. R., Rodriguez, J., Wistuba, I. I., Creighton, C. J., Gibbons, D. L., Hicks, J. M., ... Kurie, J. M. (2016). Cancer-associated Fibroblasts Induce a Collagen Cross-link Switch in Tumor Stroma. *Molecular cancer research : MCR*, 14(3), 287-295. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-15-0307>
- Panunzio, A., & Sartori, P. (2020). Lung Cancer and Radiological Imaging. *Current Radiopharmaceuticals*, 13(3), 238-242. <https://doi.org/10.2174/1874471013666200523161849>
- Paradisi, A., Maise, C., Bernet, A., Coissieux, M.-M., Maccarrone, M., Scoazec, J.-Y., & Mehlen, P. (2008). NF-κB Regulates Netrin-1 Expression and Affects the Conditional Tumor Suppressive Activity of the Netrin-1 Receptors. *Gastroenterology*, 135(4), 1248-1257. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.06.080>
- Park, K.W., Urness, L.D., Senchuk, M.M., Colvin, C.J., Wythe, J.D., Chien, C.B., Li, D.Y. (2005). Identification of new netrin family members in zebrafish: developmental expression of netrin 2 and netrin 4. *Dev Dyn*, 234(3):726-31, <https://doi.org/10.1002/dvdy.20474>.
- Paul, N. R., Jacquemet, G., & Caswell, P. T. (2015). Endocytic Trafficking of Integrins in Cell Migration. *Current Biology: CB*, 25(22), R1092-1105. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.09.049>
- Paul, R., Luo, M., Mo, X., Lu, J., Yeo, S. K., & Guan, J.-L. (2020). FAK activates AKT-mTOR signaling to promote the growth and progression of MMTV-Wnt1-driven basal-like mammary tumors. *Breast Cancer Research : BCR*, 22, 59. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01298-3>
- Paz-Ares, L., Chen, Y., Reinmuth, N., Hotta, K., Trukhin, D., Statsenko, G., Hochmair, M. J., Özgüroğlu, M., Ji, J. H., Garassino, M. C., Voitko, O., Poltoratskiy, A., Musso, E., Havel, L., Bondarenko, I., Losonczy, G., Conev, N., Mann, H., Dalvi, T. B., ... Goldman, J. W. (2022). Durvalumab, with or without tremelimumab, plus platinum-etoposide in first-line treatment of extensive-stage small-cell lung cancer: 3-year overall survival update from CASPIAN. *ESMO Open*, 7(2), 100408. <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2022.100408>
- Paz-Ares, L., Dvorkin, M., Chen, Y., Reinmuth, N., Hotta, K., Trukhin, D., Statsenko, G., Hochmair, M. J., Özgüroğlu, M., Ji, J. H., Voitko, O., Poltoratskiy, A., Ponce, S., Verderame, F., Havel, L., Bondarenko, I., Kazarnowicz, A., Losonczy, G., Conev, N. V., ... CASPIAN investigators. (2019).

Durvalumab plus platinum-etoposide versus platinum-etoposide in first-line treatment of extensive-stage small-cell lung cancer (CASPIAN) : A randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet (London, England)*, 394(10212), 1929-1939. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32222-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32222-6)

Peifer, M., Fernández-Cuesta, L., Sos, M. L., George, J., Seidel, D., Kasper, L. H., Plenker, D., Leenders, F., Sun, R., Zander, T., Menon, R., Koker, M., Dahmen, I., Müller, C., Di Cerbo, V., Schildhaus, H.-U., Altmüller, J., Baessmann, I., Becker, C., ... Thomas, R. K. (2012). Integrative genome analyses identify key somatic driver mutations of small-cell lung cancer. *Nature Genetics*, 44(10), 1104-1110. <https://doi.org/10.1038/ng.2396>

Peinado, H., Zhang, H., Matei, I. R., Costa-Silva, B., Hoshino, A., Rodrigues, G., Psaila, B., Kaplan, R. N., Bromberg, J. F., Kang, Y., Bissell, M. J., Cox, T. R., Giaccia, A. J., Ertler, J. T., Hiratsuka, S., Ghajar, C. M., & Lyden, D. (2017). Pre-metastatic niches : Organ-specific homes for metastases. *Nature Reviews Cancer*, 17(5), 302-317. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.6>

Peng, X., Wu, X., Druso, J. E., Wei, H., Park, A. Y.-J., Kraus, M. S., Alcaraz, A., Chen, J., Chien, S., Cerione, R. A., & Guan, J.-L. (2008). Cardiac developmental defects and eccentric right ventricular hypertrophy in cardiomyocyte focal adhesion kinase (FAK) conditional knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(18), 6638-6643. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802319105>

Perampalam, P., MacDonald, J. I., Zakirova, K., Passos, D. T., Wasif, S., Ramos-Valdes, Y., Hervieu, M., Mehlen, P., Rottapel, R., Gibert, B., Correa, R. J., Shepherd, T. G., & Dick, F. A. (2024). Netrin signaling mediates survival of dormant epithelial ovarian cancer cells. *eLife*, 12, RP91766. <https://doi.org/10.7554/eLife.91766>

Phan, T. G., & Croucher, P. I. (2020). The dormant cancer cell life cycle. *Nature Reviews Cancer*, 20(7), 398-411. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0263-0>

Pickup, M. W., Mouw, J. K., & Weaver, V. M. (2014). The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Reports*, 15(12), 1243-1253. <https://doi.org/10.15252/embr.201439246>

Pignon, J.-P., Tribodet, H., Scagliotti, G. V., Douillard, J.-Y., Shepherd, F. A., Stephens, R. J., Dunant, A., Torri, V., Rosell, R., Seymour, L., Spiro, S. G., Rolland, E., Fossati, R., Aubert, D., Ding, K., Waller, D., Le Chevalier, T., & LACE Collaborative Group. (2008). Lung adjuvant cisplatin evaluation : A pooled analysis by the LACE Collaborative Group. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(21), 3552-3559. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.13.9030>

Pinho, S. S., & Reis, C. A. (2015). Glycosylation in cancer : Mechanisms and clinical implications. *Nature Reviews. Cancer*, 15(9), 540-555. <https://doi.org/10.1038/nrc3982>

Pitulescu, M. E., & Adams, R. H. (2010). Eph/ephrin molecules—A hub for signaling and endocytosis. *Genes & Development*, 24(22), 2480-2492. <https://doi.org/10.1101/gad.1973910>

Plotnikov, S. V., Pasapera, A. M., Sabass, B., & Waterman, C. M. (2012). Force fluctuations within focal adhesions mediate ECM-rigidity sensing to guide directed cell migration. *Cell*, 151(7), 1513-1527. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.034>

Poirier, J. T., Dobromilskaya, I., Moriarty, W. F., Peacock, C. D., Hann, C. L., & Rudin, C. M. (2013). Selective tropism of Seneca Valley virus for variant subtype small cell lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 105(14), 1059-1065. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt130>

Poirier, J. T., George, J., Owonikoko, T. K., Berns, A., Brambilla, E., Byers, L. A., Carbone, D., Chen, H. J., Christensen, C. L., Dive, C., Farago, A. F., Govindan, R., Hann, C., Hellmann, M. D., Horn, L.,

- Johnson, J. E., Ju, Y. S., Kang, S., Krasnow, M., ... Oliver, T. G. (2020). New Approaches to SCLC Therapy : From the Laboratory to the Clinic. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 15(4), 520-540. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2020.01.016>
- Pöschl, E., Schlötzer-Schrehardt, U., Brachvogel, B., Saito, K., Ninomiya, Y., & Mayer, U. (2004). Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development (Cambridge, England)*, 131(7), 1619-1628. <https://doi.org/10.1242/dev.01037>
- Post, L. C., Ternet, M., & Hogan, B. L. M. (2000). Notch/Delta expression in the developing mouse lung. *Mechanisms of Development*, 98(1), 95-98. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(00\)00432-9](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(00)00432-9)
- Provenzano, P. P., Inman, D. R., Eliceiri, K. W., Knittel, J. G., Yan, L., Rueden, C. T., White, J. G., & Keely, P. J. (2008). Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. *BMC Medicine*, 6, 11. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-6-11>
- Przyborski, S. A., Knowles, B. B., & Ackerman, S. L. (1998). Embryonic phenotype of Unc5h3 mutant mice suggests chemorepulsion during the formation of the rostral cerebellar boundary. *Development*, 125(1), 41-50. <https://doi.org/10.1242/dev.125.1.41>
- Puca, L., Vlachostergios, P. J., & Beltran, H. (2019). Neuroendocrine Differentiation in Prostate Cancer : Emerging Biology, Models, and Therapies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 9(2), a030593. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a030593>
- Pujol, J. L., Carestia, L., & Daurès, J. P. (2000). Is there a case for cisplatin in the treatment of small-cell lung cancer? A meta-analysis of randomized trials of a cisplatin-containing regimen versus a regimen without this alkylating agent. *British Journal of Cancer*, 83(1), 8-15. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2000.1164>
- PuschelPüschel, A. W. (1999). Divergent properties of mouse netrins. *Mechanisms of Development*, 83(1-2), 65-75. [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(99\)00035-0](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(99)00035-0)
- Qi, J., Zhang, J., Liu, N., Zhao, L., & Xu, B. (2022). Prognostic Implications of Molecular Subtypes in Primary Small Cell Lung Cancer and Their Correlation With Cancer Immunity. *Frontiers in Oncology*, 12, 779276. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.779276>
- Quintanal-Villalonga, Á., Chan, J. M., Yu, H. A., Pe'er, D., Sawyers, C. L., Sen, T., & Rudin, C. M. (2020). Lineage plasticity in cancer : A shared pathway of therapeutic resistance. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 17(6), 360-371. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0340-z>
- Rabizadeh, S., Oh, J., Zhong, L. T., Yang, J., Bitler, C. M., Butcher, L. L., & Bredesen, D. E. (1993). Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 261(5119), 345-348. <https://doi.org/10.1126/science.8332899>
- Ragavan, M., & Patel, M. I. (2022). The evolving landscape of sex-based differences in lung cancer : A distinct disease in women. *European Respiratory Review: An Official Journal of the European Respiratory Society*, 31(163), 210100. <https://doi.org/10.1183/16000617.0100-2021>
- Rajasekharan, S., & Kennedy, T. E. (2009). The netrin protein family. *Genome Biology*, 10(9), 239. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-9-239>
- Rama, N., Goldschneider, D., Corset, V., Lambert, J., Pays, L., & Mehlen, P. (2012). Amyloid Precursor Protein Regulates Netrin-1-mediated Commissural Axon Outgrowth *. *Journal of Biological Chemistry*, 287(35), 30014-30023. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.324780>

- Rami-Porta, R., Nishimura, K. K., Giroux, D. J., Detterbeck, F., Cardillo, G., Edwards, J. G., Fong, K. M., Giuliani, M., Huang, J., Kernstine, K. H., Marom, E. M., Nicholson, A. G., Schil, P. E. V., Travis, W. D., Tsao, M. S., Watanabe, S.-I., Rusch, V. W., & Asamura, H. (2024). The International Association for the Study of Lung Cancer Lung Cancer Staging Project : Proposals for Revision of the TNM Stage Groups in the Forthcoming (Ninth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 0(0). <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2024.02.011>
- Rami-Porta, R., Wittekind, C., & Goldstraw, P. (2020). Complete Resection in Lung Cancer Surgery : From Definition to Validation and Beyond. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 15(12), 1815-1818. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2020.09.006>
- Rami-Porta, R., Wittekind, C., Goldstraw, P., & International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) Staging Committee. (2005). Complete resection in lung cancer surgery : Proposed definition. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 49(1), 25-33. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2005.01.001>
- Raso, M. G., Bota-Rabasedas, N., & Wistuba, I. I. (2021). Pathology and Classification of SCLC. *Cancers*, 13(4), 820. <https://doi.org/10.3390/cancers13040820>
- Rawlins, E. L., Clark, C. P., Xue, Y., & Hogan, B. L. M. (2009). The Id2+ distal tip lung epithelium contains individual multipotent embryonic progenitor cells. *Development (Cambridge, England)*, 136(22), 3741-3745. <https://doi.org/10.1242/dev.037317>
- Ready, N. E., Ott, P. A., Hellmann, M. D., Zugazagoitia, J., Hann, C. L., de Braud, F., Antonia, S. J., Ascierto, P. A., Moreno, V., Atmaca, A., Salvagni, S., Taylor, M., Amin, A., Camidge, D. R., Horn, L., Calvo, E., Li, A., Lin, W. H., Callahan, M. K., & Spigel, D. R. (2020). Nivolumab Monotherapy and Nivolumab Plus Ipilimumab in Recurrent Small Cell Lung Cancer : Results From the CheckMate 032 Randomized Cohort. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 15(3), 426-435. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2019.10.004>
- Reck, M., Heigener, D., & Reinmuth, N. (2016). Immunotherapy for small-cell lung cancer : Emerging evidence. *Future Oncology (London, England)*, 12(7), 931-943. <https://doi.org/10.2217/fon-2015-0012>
- Reif, S., Lang, A., Lindquist, J. N., Yata, Y., Gabele, E., Scanga, A., Brenner, D. A., & Rippe, R. A. (2003). The role of focal adhesion kinase-phosphatidylinositol 3-kinase-akt signaling in hepatic stellate cell proliferation and type I collagen expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(10), 8083-8090. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212927200>
- Reinhold, W. C., Varma, S., Sunshine, M., Elloumi, F., Ofori-Atta, K., Lee, S., Trepel, J. B., Meltzer, P. S., Doroshow, J. H., & Pommier, Y. (2019). RNA Sequencing of the NCI-60 : Integration into CellMiner and CellMiner CDB. *Cancer Research*, 79(13), 3514-3524. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-2047>
- Rejniak, K. A. (2016). Circulating Tumor Cells : When a Solid Tumor Meets a Fluid Microenvironment. *Advances in experimental medicine and biology*, 936, 93-106. https://doi.org/10.1007/978-3-319-42023-3_5
- Ren, X. D., Kiosses, W. B., Sieg, D. J., Otey, C. A., Schlaepfer, D. D., & Schwartz, M. A. (2000). Focal adhesion kinase suppresses Rho activity to promote focal adhesion turnover. *Journal of Cell Science*, 113 (Pt 20), 3673-3678. <https://doi.org/10.1242/jcs.113.20.3673>
- Ren, X., Ming, G., Xie, Y., Hong, Y., Sun, D., Zhao, Z., Feng, Z., Wang, Q., Shim, S., Chen, Z., Song, H., Mei, L., & Xiong, W. (2004). Focal adhesion kinase in netrin-1 signaling. *Nature Neuroscience*, 7(11), 1204-1212. <https://doi.org/10.1038/nn1330>

- Renders, S., Svendsen, A. F., Panten, J., Rama, N., Maryanovich, M., Sommerkamp, P., Ladel, L., Redavid, A. R., Gibert, B., Lazare, S., Ducarouge, B., Schönberger, K., Narr, A., Tourbez, M., Dethmers-Ausema, B., Zwart, E., Hotz-Wagenblatt, A., Zhang, D., Korn, C., ... Trumpp, A. (2021). Niche derived netrin-1 regulates hematopoietic stem cell dormancy via its receptor neogenin-1. *Nature Communications*, 12(1), 608. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20801-0>
- Reuten, R., Patel, T. R., McDougall, M., Rama, N., Nikodemus, D., Gibert, B., Delcros, J.-G., Prein, C., Meier, M., Metzger, S., Zhou, Z., Kaltenberg, J., McKee, K. K., Bald, T., Tüting, T., Zigrino, P., Djonov, V., Bloch, W., Clausen-Schaumann, H., ... Koch, M. (2016). Structural decoding of netrin-4 reveals a regulatory function towards mature basement membranes. *Nature Communications*, 7(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/ncomms13515>
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414(6859), 105-111. <https://doi.org/10.1038/35102167>
- Reymond, N., d'Água, B. B., & Ridley, A. J. (2013). Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nature Reviews. Cancer*, 13(12), 858-870. <https://doi.org/10.1038/nrc3628>
- Ricard-Blum, S. (2011). The Collagen Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(1), a004978. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>
- Ricciardelli, C., Brooks, J. H., Suwihat, S., Sakko, A. J., Mayne, K., Raymond, W. A., Seshadri, R., LeBaron, R. G., & Horsfall, D. J. (2002). Regulation of stromal versican expression by breast cancer cells and importance to relapse-free survival in patients with node-negative primary breast cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 8(4), 1054-1060.
- Rivera, M. P., Mehta, A. C., & American College of Chest Physicians. (2007). Initial diagnosis of lung cancer : ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*, 132(3 Suppl), 131S-148S. <https://doi.org/10.1378/chest.07-1357>
- Rivera, M. P., Mehta, A. C., & Wahidi, M. M. (2013). Establishing the diagnosis of lung cancer : Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*, 143(5 Suppl), e142S-e165S. <https://doi.org/10.1378/chest.12-2353>
- Rizvi, N. A., Hellmann, M. D., Snyder, A., Kvistborg, P., Makarov, V., Havel, J. J., Lee, W., Yuan, J., Wong, P., Ho, T. S., Miller, M. L., Rekhtman, N., Moreira, A. L., Ibrahim, F., Bruggeman, C., Gasmir, B., Zappasodi, R., Maeda, Y., Sander, C., ... Chan, T. A. (2015). Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science (New York, N.Y.)*, 348(6230), 124-128. <https://doi.org/10.1126/science.aaa1348>
- Robinson, J. T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G., & Mesirov, J. P. (2011). Integrative Genomics Viewer. *Nature biotechnology*, 29(1), 24-26. <https://doi.org/10.1038/nbt.1754>
- Rodríguez-Martínez, Á., Torres-Durán, M., Barros-Dios, J. M., & Ruano-Ravina, A. (2018). Residential radon and small cell lung cancer. A systematic review. *Cancer Letters*, 426, 57-62. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.04.003>
- Romagnoli, M., Cagnet, S., Chiche, A., Bresson, L., Baulande, S., Grange, P. de la, Arcangelis, A. D., Kreft, M., Georges-Labouesse, E., Sonnenberg, A., Deugnier, M.-A., Raymond, K., Glukhova, M. A., & Faraldo, M. M. (2019). Deciphering the Mammary Stem Cell Niche : A Role for Laminin-Binding Integrins. *Stem Cell Reports*, 12(4), 831-844. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.02.008>

- Romani, P., Nirchio, N., Arboit, M., Barbieri, V., Tosi, A., Michielin, F., Shibuya, S., Benoist, T., Wu, D., Hindmarch, C. C. T., Giomo, M., Urciuolo, A., Giamogante, F., Roveri, A., Chakravarty, P., Montagner, M., Cali, T., Elvassore, N., Archer, S. L., ... Dupont, S. (2022). Mitochondrial fission links ECM mechanotransduction to metabolic redox homeostasis and metastatic chemotherapy resistance. *Nature cell biology*, 24(2), 168-180. <https://doi.org/10.1038/s41556-022-00843-w>
- Rudin, C. M., Brambilla, E., Faivre-Finn, C., & Sage, J. (2021). Small-cell lung cancer. *Nature Reviews. Disease Primers*, 7(1), 3. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00235-0>
- Rudin, C. M., Durinck, S., Stawiski, E. W., Poirier, J. T., Modrusan, Z., Shames, D. S., Bergbower, E. A., Guan, Y., Shin, J., Guillory, J., Rivers, C. S., Foo, C. K., Bhatt, D., Stinson, J., Gnad, F., Haverty, P. M., Gentleman, R., Chaudhuri, S., Janakiraman, V., ... Seshagiri, S. (2012). Comprehensive genomic analysis identifies SOX2 as a frequently amplified gene in small-cell lung cancer. *Nature Genetics*, 44(10), 1111-1116. <https://doi.org/10.1038/ng.2405>
- Rudin, C. M., Liu, S. V., Lu, S., Soo, R. A., Hong, M. H., Lee, J.-S., Bryl, M., Dumoulin, D. W., Rittmeyer, A., Chiu, C.-H., Ozyilkan, O., Navarro, A., Novello, S., Ozawa, Y., Meng, R., Hoang, T., Lee, A., Wen, X., Huang, M., & Reck, M. (2022). SKYSCRAPER-02 : Primary results of a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled study of atezolizumab (atezo) + carboplatin + etoposide (CE) with or without tiragolumab (tira) in patients (pts) with untreated extensive-stage small cell lung cancer (ES-SCLC). *Journal of Clinical Oncology*, 40(17_suppl), LBA8507-LBA8507. https://doi.org/10.1200/JCO.2022.40.17_suppl.LBA8507
- Rudin, C. M., & Poirier, J. T. (2017). Small-cell lung cancer in 2016 : Shining light on novel targets and therapies. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 14(2), 75-76. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.203>
- Rudin, C. M., Poirier, J. T., Byers, L. A., Dive, C., Dowlati, A., George, J., Heymach, J. V., Johnson, J. E., Lehman, J. M., MacPherson, D., Massion, P. P., Minna, J. D., Oliver, T. G., Quaranta, V., Sage, J., Thomas, R. K., Vakoc, C. R., & Gazdar, A. F. (2019). Molecular subtypes of small cell lung cancer : A synthesis of human and mouse model data. *Nature Reviews Cancer*, 19(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0133-9>
- Rusthoven, C. G., & Kavanagh, B. D. (2017). Prophylactic Cranial Irradiation (PCI) versus Active MRI Surveillance for Small Cell Lung Cancer : The Case for Equipoise. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 12(12), 1746-1754. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2017.08.016>
- Sanvoranart, T., Supokawej, A., Kheolamai, P., U-Pratya, Y., Pongvarin, N., Sathornsumtee, S., & Issaragrisil, S. (2016). Targeting Netrin-1 in glioblastoma stem-like cells inhibits growth, invasion, and angiogenesis. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(11), 14949-14960. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5314-5>
- Schaller, M. D. (2001). Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1540(1), 1-21. [https://doi.org/10.1016/s0167-4889\(01\)00123-9](https://doi.org/10.1016/s0167-4889(01)00123-9)
- Schijven, D., Soheili-Nezhad, S., Fisher, S. E., & Francks, C. (2024). Exome-wide analysis implicates rare protein-altering variants in human handedness. *Nature Communications*, 15(1), 2632. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-46277-w>
- Schneiders, F. I., Maertens, B., Böse, K., Li, Y., Brunken, W. J., Paulsson, M., Smyth, N., & Koch, M. (2007). Binding of netrin-4 to laminin short arms regulates basement membrane assembly. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(33), 23750-23758. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703137200>

Schreiber, D., Rineer, J., Weedon, J., Vongtama, D., Wortham, A., Kim, A., Han, P., Choi, K., & Rotman, M. (2010). Survival outcomes with the use of surgery in limited-stage small cell lung cancer : Should its role be re-evaluated? *Cancer*, *116*(5), 1350-1357. <https://doi.org/10.1002/cncr.24853>

Schuller, H. M., Plummer, H. K., & Jull, B. A. (2003). Receptor-mediated effects of nicotine and its nitrosated derivative NNK on pulmonary neuroendocrine cells. *The Anatomical Record. Part A, Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, *270*(1), 51-58. <https://doi.org/10.1002/ar.a.10019>

Schwendenwein, A., Megyesfalvi, Z., Barany, N., Valko, Z., Bugyik, E., Lang, C., Ferencz, B., Paku, S., Lantos, A., Fillinger, J., Rezeli, M., Marko-Varga, G., Bogos, K., Galffy, G., Renyi-Vamos, F., Hoda, M. A., Klepetko, W., Hoetzenecker, K., Laszlo, V., & Dome, B. (2021). Molecular profiles of small cell lung cancer subtypes : Therapeutic implications. *Molecular Therapy Oncolytics*, *20*, 470-483. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2021.02.004>

Scott, G., & Liang, H. (1995). pp125FAK in human melanocytes and melanoma : Expression and phosphorylation. *Experimental Cell Research*, *219*(1), 197-203. <https://doi.org/10.1006/excr.1995.1219>

Seaman, C., & Cooper, H. M. (2001). Netrin-3 protein is localized to the axons of motor, sensory, and sympathetic neurons. *Mechanisms of Development*, *101*(1), 245-248. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(00\)00563-3](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(00)00563-3)

Semenova, E. A., Kwon, M.-C., Monkhorst, K., Song, J.-Y., Bhaskaran, R., Krijgsman, O., Kuilman, T., Peters, D., Buikhuisen, W. A., Smit, E. F., Pritchard, C., Cozijnsen, M., van der Vliet, J., Zevenhoven, J., Lambooi, J.-P., Proost, N., van Montfort, E., Velds, A., Huijbers, I. J., & Berns, A. (2016). Transcription Factor NFIB Is a Driver of Small Cell Lung Cancer Progression in Mice and Marks Metastatic Disease in Patients. *Cell Reports*, *16*(3), 631-643. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.020>

Serafini, T., Kennedy, T. E., Gaiko, M. J., Mirzayan, C., Jessell, T. M., & Tessier-Lavigne, M. (1994). The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell*, *78*(3), 409-424. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90420-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90420-0)

Sers, C., Kirsch, K., Rothbacher, U., Riethmüller, G., & Johnson, J. P. (1993). Genomic organization of the melanoma-associated glycoprotein MUC18 : Implications for the evolution of the immunoglobulin domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(18), 8514-8518.

Shen, T.-L., Park, A. Y.-J., Alcaraz, A., Peng, X., Jang, I., Koni, P., Flavell, R. A., Gu, H., & Guan, J.-L. (2005). Conditional knockout of focal adhesion kinase in endothelial cells reveals its role in angiogenesis and vascular development in late embryogenesis. *The Journal of Cell Biology*, *169*(6), 941-952. <https://doi.org/10.1083/jcb.200411155>

Shepherd, F. A., Crowley, J., Van Houtte, P., Postmus, P. E., Carney, D., Chansky, K., Shaikh, Z., Goldstraw, P., & International Association for the Study of Lung Cancer International Staging Committee and Participating Institutions. (2007). The International Association for the Study of Lung Cancer lung cancer staging project : Proposals regarding the clinical staging of small cell lung cancer in the forthcoming (seventh) edition of the tumor, node, metastasis classification for lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, *2*(12), 1067-1077. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e31815bdc0d>

Shepherd, F. A., Ginsberg, R. J., Feld, R., Evans, W. K., & Johansen, E. (1991). Surgical treatment for limited small-cell lung cancer. The University of Toronto Lung Oncology Group experience. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, *101*(3), 385-393.

- Shillo, P., Sloan, G., Greig, M., Hunt, L., Selvarajah, D., Elliott, J., Gandhi, R., Wilkinson, I. D., & Tesfaye, S. (2019). Painful and Painless Diabetic Neuropathies : What Is the Difference? *Current Diabetes Reports*, 19(6), 32. <https://doi.org/10.1007/s11892-019-1150-5>
- Shin, S. K., Nagasaka, T., Jung, B. H., Matsubara, N., Kim, W. H., Carethers, J. M., Boland, C. R., & Goel, A. (2007). Epigenetic and Genetic Alterations in Netrin-1 Receptors UNC5C and DCC in Human Colon Cancer. *Gastroenterology*, 133(6), 1849-1857. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.08.074>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2021). Cancer Statistics, 2021. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(1), 7-33. <https://doi.org/10.3322/caac.21654>
- Sihoe, A. D. L., Hiranandani, R., Wong, H., & Yeung, E. S. L. (2013). Operating on a suspicious lung mass without a preoperative tissue diagnosis : Pros and cons. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery: Official Journal of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery*, 44(2), 231-237; discussion 237. <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezs671>
- Simpson, K. L., Stoney, R., Frese, K. K., Simms, N., Rowe, W., Pearce, S. P., Humphrey, S., Booth, L., Morgan, D., Dynowski, M., Trapani, F., Catozzi, A., Revill, M., Helps, T., Galvin, M., Girard, L., Nonaka, D., Carter, L., Krebs, M. G., ... Dive, C. (2020). A biobank of small cell lung cancer CDX models elucidates inter- and intratumoral phenotypic heterogeneity. *Nature Cancer*, 1(4), 437-451. <https://doi.org/10.1038/s43018-020-0046-2>
- Slattery, M. L., John, E., Torres-Mejia, G., Stern, M., Lundgreen, A., Hines, L., Giuliano, A., Baumgartner, K., Herrick, J., & Wolff, R. K. (2013). Matrix metalloproteinase genes are associated with breast cancer risk and survival : The Breast Cancer Health Disparities Study. *PLoS One*, 8(5), e63165. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063165>
- Sloan, G., Shillo, P., Selvarajah, D., Wu, J., Wilkinson, I. D., Tracey, I., Anand, P., & Tesfaye, S. (2018). A new look at painful diabetic neuropathy. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 144, 177-191. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.08.020>
- Slotman, B., Faivre-Finn, C., Kramer, G., Rankin, E., Snee, M., Hatton, M., Postmus, P., Collette, L., Musat, E., Senan, S., & EORTC Radiation Oncology Group and Lung Cancer Group. (2007). Prophylactic cranial irradiation in extensive small-cell lung cancer. *The New England Journal of Medicine*, 357(7), 664-672. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa071780>
- Slotman, B. J., van Tinteren, H., Praag, J. O., Knegjens, J. L., El Sharouni, S. Y., Hatton, M., Keijsers, A., Faivre-Finn, C., & Senan, S. (2015). Use of thoracic radiotherapy for extensive stage small-cell lung cancer : A phase 3 randomised controlled trial. *Lancet (London, England)*, 385(9962), 36-42. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61085-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61085-0)
- Socovich, A. M., & Naba, A. (2019). The cancer matrisome : From comprehensive characterization to biomarker discovery. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 89, 157-166. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.06.005>
- Solta, A., Ernhofer, B., Boettiger, K., Megyesfalvi, Z., Heeke, S., Hoda, M. A., Lang, C., Aigner, C., Hirsch, F. R., Schelch, K., & Döme, B. (2024). Small cells – big issues : Biological implications and preclinical advancements in small cell lung cancer. *Molecular Cancer*, 23, 41. <https://doi.org/10.1186/s12943-024-01953-9>
- Song, Y., Sun, Y., Lei, Y., Yang, K., & Tang, R. (2020). YAP1 promotes multidrug resistance of small cell lung cancer by CD74-related signaling pathways. *Cancer Medicine*, 9(1), 259-268. <https://doi.org/10.1002/cam4.2668>

- Soria, J. C., Gan, H. K., Blagden, S. P., Plummer, R., Arkenau, H. T., Ranson, M., Evans, T. R. J., Zalcman, G., Bahleda, R., Hollebecque, A., Lemech, C., Dean, E., Brown, J., Gibson, D., Peddareddigari, V., Murray, S., Nebot, N., Mazumdar, J., Swartz, L., ... Millward, M. (2016). A phase I, pharmacokinetic and pharmacodynamic study of GSK2256098, a focal adhesion kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 27(12), 2268-2274. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw427>
- Sosa, M. S., Bragado, P., & Aguirre-Ghiso, J. A. (2014). Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: An awakening field. *Nature Reviews Cancer*, 14(9), 611-622. <https://doi.org/10.1038/nrc3793>
- Spiro, S. G., James, L. E., Rudd, R. M., Trask, C. W., Tobias, J. S., Snee, M., Gilligan, D., Murray, P. A., Ruiz de Elvira, M. C., O'Donnell, K. M., Gower, N. H., Harper, P. G., Hackshaw, A. K., & London Lung Cancer Group. (2006). Early compared with late radiotherapy in combined modality treatment for limited disease small-cell lung cancer: A London Lung Cancer Group multicenter randomized clinical trial and meta-analysis. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24(24), 3823-3830. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.05.3181>
- Srinivasan, K., Strickland, P., Valdes, A., Shin, G. C., & Hinck, L. (2003). Netrin-1/neogenin interaction stabilizes multipotent progenitor cap cells during mammary gland morphogenesis. *Developmental Cell*, 4(3), 371-382. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(03\)00054-6](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(03)00054-6)
- Stanco, A., Szekeres, C., Patel, N., Rao, S., Campbell, K., Kreidberg, J. A., Polleux, F., & Anton, E. S. (2009). Netrin-1- $\alpha 3\beta 1$ integrin interactions regulate the migration of interneurons through the cortical marginal zone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(18), 7595-7600. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811343106>
- Stewart, C. A., Gay, C. M., Xi, Y., Sivajothi, S., Sivakamasundari, V., Fujimoto, J., Bolisetty, M., Hartsfield, P. M., Balasubramaniyan, V., Chalishazar, M. D., Moran, C., Kalhor, N., Stewart, J., Tran, H., Swisher, S. G., Roth, J. A., Zhang, J., de Groot, J., Glisson, B., ... Byers, L. A. (2020). Single-cell analyses reveal increased intratumoral heterogeneity after the onset of therapy resistance in small-cell lung cancer. *Nature Cancer*, 1, 423-436. <https://doi.org/10.1038/s43018-019-0020-z>
- Stovold, R., Blackhall, F., Meredith, S., Hou, J., Dive, C., & White, A. (2012). Biomarkers for small cell lung cancer: Neuroendocrine, epithelial and circulating tumour cells. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 76(3), 263-268. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2011.11.015>
- Strilic, B., & Offermanns, S. (2017). Intravascular Survival and Extravasation of Tumor Cells. *Cancer Cell*, 32(3), 282-293. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.07.001>
- Strilic, B., Yang, L., Albarrán-Juárez, J., Wachsmuth, L., Han, K., Müller, U. C., Pasparakis, M., & Offermanns, S. (2016). Tumour-cell-induced endothelial cell necroptosis via death receptor 6 promotes metastasis. *Nature*, 536(7615), 215-218. <https://doi.org/10.1038/nature19076>
- Strizzi, L., Mancino, M., Bianco, C., Raafat, A., Gonzales, M., Booth, B. W., Watanabe, K., Nagaoka, T., Mack, D. L., Howard, B., Callahan, R., Smith, G. H., & Salomon, D. S. (2008). Netrin-1 can affect morphogenesis and differentiation of the mouse mammary gland. *Journal of Cellular Physiology*, 216(3), 824-834. <https://doi.org/10.1002/jcp.21462>
- Stupack, D. G. (2005). Integrins as a distinct subtype of dependence receptors. *Cell Death & Differentiation*, 12(8), 1021-1030. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401658>
- Stupack, D. G., Teitz, T., Potter, M. D., Mikolon, D., Houghton, P. J., Kidd, V. J., Lahti, J. M., & Cheresch, D. A. (2006). Potentiation of neuroblastoma metastasis by loss of caspase-8. *Nature*, 439(7072), 95-99. <https://doi.org/10.1038/nature04323>

- Sturgis, C. D., Nassar, D. L., D'Antonio, J. A., & Raab, S. S. (2000). Cytologic features useful for distinguishing small cell from non-small cell carcinoma in bronchial brush and wash specimens. *American Journal of Clinical Pathology*, *114*(2), 197-202. <https://doi.org/10.1309/8MQG-6XEK-3X9L-A9XU>
- Sui, Y., Liu, J., Zhang, J., Zheng, Z., Wang, Z., Jia, Z., & Meng, Z. (2021). Expression and Gene Regulation Network of Adenosine Receptor A2B in Lung Adenocarcinoma : A Potential Diagnostic and Prognostic Biomarker. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *8*, 663011. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.663011>
- Sulzmaier, F. J., Jean, C., & Schlaepfer, D. D. (2014). FAK in cancer : Mechanistic findings and clinical applications. *Nature Reviews Cancer*, *14*(9), 598-610. <https://doi.org/10.1038/nrc3792>
- Sundstrøm, S., Bremnes, R. M., Kaasa, S., Aasebø, U., Hatlevoll, R., Dahle, R., Boye, N., Wang, M., Vigander, T., Vilsvik, J., Skovlund, E., Hannisdal, E., Aamdal, S., & Norwegian Lung Cancer Study Group. (2002). Cisplatin and etoposide regimen is superior to cyclophosphamide, epirubicin, and vincristine regimen in small-cell lung cancer : Results from a randomized phase III trial with 5 years' follow-up. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *20*(24), 4665-4672. <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.12.111>
- Sung, P.-J., Rama, N., Imbach, J., Fiore, S., Ducarouge, B., Neves, D., Chen, H.-W., Bernard, D., Yang, P.-C., Bernet, A., Depil, S., & Mehlen, P. (2019). Cancer-Associated Fibroblasts Produce Netrin-1 to Control Cancer Cell Plasticity. *Cancer Research*, *79*(14), 3651-3661. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-2952>
- Sutherland, K. D., Proost, N., Brouns, I., Adriaensen, D., Song, J.-Y., & Berns, A. (2011). Cell of origin of small cell lung cancer : Inactivation of Trp53 and Rb1 in distinct cell types of adult mouse lung. *Cancer Cell*, *19*(6), 754-764. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.04.019>
- Tai-Nagara, I., Yoshikawa, Y., Numata, N., Ando, T., Okabe, K., Sugiura, Y., Ieda, M., Takakura, N., Nakagawa, O., Zhou, B., Okabayashi, K., Suematsu, M., Kitagawa, Y., Bastmeyer, M., Sato, K., Klein, R., Navankasattusas, S., Li, D. Y., Yamagishi, S., & Kubota, Y. (2017). Placental labyrinth formation in mice requires endothelial FLRT2/UNC5B signaling. *Development (Cambridge, England)*, *144*(13), 2392-2401. <https://doi.org/10.1242/dev.149757>
- Takagi, J., Petre, B. M., Walz, T., & Springer, T. A. (2002). Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell*, *110*(5), 599-511. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00935-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00935-2)
- Takahashi, T., Nau, M. M., Chiba, I., Birrer, M. J., Rosenberg, R. K., Vinocour, M., Levitt, M., Pass, H., Gazdar, A. F., & Minna, J. D. (1989). p53 : A frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science (New York, N.Y.)*, *246*(4929), 491-494. <https://doi.org/10.1126/science.2554494>
- Takahashi, T., Yamanaka, T., Seto, T., Harada, H., Nokihara, H., Saka, H., Nishio, M., Kaneda, H., Takayama, K., Ishimoto, O., Takeda, K., Yoshioka, H., Tachihara, M., Sakai, H., Goto, K., & Yamamoto, N. (2017). Prophylactic cranial irradiation versus observation in patients with extensive-disease small-cell lung cancer : A multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*, *18*(5), 663-671. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30230-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30230-9)
- Taniguchi, H., Sen, T., & Rudin, C. M. (2020). Targeted Therapies and Biomarkers in Small Cell Lung Cancer. *Frontiers in Oncology*, *10*, 741. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00741>
- Tay, R. Y., Fernández-Gutiérrez, F., Foy, V., Burns, K., Pierce, J., Morris, K., Priest, L., Tugwood, J., Ashcroft, L., Lindsay, C. R., Faivre-Finn, C., Dive, C., & Blackhall, F. (2019). Prognostic value of

- circulating tumour cells in limited-stage small-cell lung cancer : Analysis of the concurrent once-daily versus twice-daily radiotherapy (CONVERT) randomised controlled trial. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 30(7), 1114-1120. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz122>
- Theocharis, A. D., Manou, D., & Karamanos, N. K. (2019). The extracellular matrix as a multitasking player in disease. *The FEBS Journal*, 286(15), 2830-2869. <https://doi.org/10.1111/febs.14818>
- Thiebault, K., Mazelin, L., Pays, L., Llambi, F., Joly, M.-O., Scoazec, J.-Y., Saurin, J.-C., Romeo, G., & Mehlen, P. (2003). The netrin-1 receptors UNC5H are putative tumor suppressors controlling cell death commitment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), 4173-4178. <https://doi.org/10.1073/pnas.0738063100>
- Thorlacius-Ussing, J., Kristensen, S. R., Karsdal, M. A., Willumsen, N., & Pedersen, S. (2023). Preliminary investigation of elevated collagen and blood-clotting markers as potential noninvasive biomarkers for small cell lung cancer. *Thoracic Cancer*, 14(28), 2830-2838. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.15066>
- Tian, Y., Ma, J., Jing, X., Zhai, X., Li, Y., Guo, Z., Yu, J., & Zhu, H. (2022). Radiation therapy for extensive-stage small-cell lung cancer in the era of immunotherapy. *Cancer Letters*, 541, 215719. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2022.215719>
- Tiwari, S., Askari, J. A., Humphries, M. J., & Bulleid, N. J. (2011). Divalent cations regulate the folding and activation status of integrins during their intracellular trafficking. *Journal of Cell Science*, 124(Pt 10), 1672-1680. <https://doi.org/10.1242/jcs.084483>
- Tlemsani, C., Pongor, L., Elloumi, F., Girard, L., Huffman, K. E., Roper, N., Varma, S., Luna, A., Rajapakse, V. N., Sebastian, R., Kohn, K. W., Krushkal, J., Aladjem, M. I., Teicher, B. A., Meltzer, P. S., Reinhold, W. C., Minna, J. D., Thomas, A., & Pommier, Y. (2020). SCLC-CellMiner : A Resource for Small Cell Lung Cancer Cell Line Genomics and Pharmacology Based on Genomic Signatures. *Cell Reports*, 33(3), 108296. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108296>
- Tomar, A., & Schlaepfer, D. D. (2009). Focal adhesion kinase : Switching between GAPs and GEFs in the regulation of cell motility. *Current opinion in cell biology*, 21(5), 676-683. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.05.006>
- Tong, E., McCullagh, K. L., & Iv, M. (2020). Advanced Imaging of Brain Metastases : From Augmenting Visualization and Improving Diagnosis to Evaluating Treatment Response. *Frontiers in Neurology*, 11, 270. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00270>
- Torres-Durán, M., Curiel-García, M. T., Ruano-Ravina, A., Provencio, M., Parente-Lamelas, I., Hernández-Hernández, J., Fernández-Villar, A., Barros-Dios, J. M., & Pérez-Ríos, M. (2021). Small-cell lung cancer in never-smokers. *ESMO Open*, 6(2), 100059. <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2021.100059>
- Traversari, C., Meazza, R., Coppolecchia, M., Basso, S., Verrecchia, A., van der Bruggen, P., Ardizzoni, A., Gaggero, A., & Ferrini, S. (1997). IFN-gamma gene transfer restores HLA-class I expression and MAGE-3 antigen presentation to CTL in HLA-deficient small cell lung cancer. *Gene Therapy*, 4(10), 1029-1035. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3300489>
- Tsai, H.-F., Chang, Y.-C., Li, C.-H., Chan, M.-H., Chen, C.-L., Tsai, W.-C., & Hsiao, M. (2021). Type V collagen alpha 1 chain promotes the malignancy of glioblastoma through PPRC1-ESM1 axis activation and extracellular matrix remodeling. *Cell Death Discovery*, 7(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00661-3>

- Tsuchiya, R., Suzuki, K., Ichinose, Y., Watanabe, Y., Yasumitsu, T., Ishizuka, N., & Kato, H. (2005). Phase II trial of postoperative adjuvant cisplatin and etoposide in patients with completely resected stage I-IIIa small cell lung cancer: The Japan Clinical Oncology Lung Cancer Study Group Trial (JCOG9101). *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, *129*(5), 977-983. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2004.05.030>
- Tu, T., Zhang, C., Yan, H., Luo, Y., Kong, R., Wen, P., Ye, Z., Chen, J., Feng, J., Liu, F., Wu, J. Y., & Yan, X. (2015). CD146 acts as a novel receptor for netrin-1 in promoting angiogenesis and vascular development. *Cell Research*, *25*(3), 275-287. <https://doi.org/10.1038/cr.2015.15>
- Um, S.-W., Kim, H. K., Jung, S.-H., Han, J., Lee, K. J., Park, H. Y., Choi, Y. S., Shim, Y. M., Ahn, M.-J., Park, K., Ahn, Y. C., Choi, J. Y., Lee, K. S., Suh, G. Y., Chung, M. P., Kwon, O. J., Kim, J., & Kim, H. (2015). Endobronchial ultrasound versus mediastinoscopy for mediastinal nodal staging of non-small-cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, *10*(2), 331-337. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000388>
- Upton, K., Modi, A., Patel, K., Kendsersky, N. M., Conkrite, K. L., Sussman, R. T., Way, G. P., Adams, R. N., Sacks, G. I., Fortina, P., Diskin, S. J., Maris, J. M., & Rokita, J. L. (2020). Epigenomic profiling of neuroblastoma cell lines. *Scientific Data*, *7*(1), 116. <https://doi.org/10.1038/s41597-020-0458-y>
- Vallières, E., Shepherd, F. A., Crowley, J., Van Houtte, P., Postmus, P. E., Carney, D., Chansky, K., Shaikh, Z., Goldstraw, P., & International Association for the Study of Lung Cancer International Staging Committee and Participating Institutions. (2009). The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals regarding the relevance of TNM in the pathologic staging of small cell lung cancer in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification for lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, *4*(9), 1049-1059. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181b27799>
- Van Raay, T. J., Foskett, S. M., Connors, T. D., Klinger, K. W., Landes, G. M., & Burn, T. C. (1997). The NTN2L gene encoding a novel human netrin maps to the autosomal dominant polycystic kidney disease region on chromosome 16p13.3. *Genomics*, *41*(2), 279-282. <https://doi.org/10.1006/geno.1997.4659>
- van Overhagen, H., Brakel, K., Heijenbrok, M. W., van Kasteren, J. H. L. M., van de Moosdijk, C. N. F., Roldaan, A. C., van Gils, A. P., & Hansen, B. E. (2004). Metastases in supraclavicular lymph nodes in lung cancer: Assessment with palpation, US, and CT. *Radiology*, *232*(1), 75-80. <https://doi.org/10.1148/radiol.2321030663>
- Varlotto, J. M., Recht, A., Flickinger, J. C., Medford-Davis, L. N., Dyer, A.-M., & DeCamp, M. M. (2011). Lobectomy leads to optimal survival in early-stage small cell lung cancer: A retrospective analysis. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, *142*(3), 538-546. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2010.11.062>
- Vecchio, E. A., Tan, C. Y. R., Gregory, K. J., Christopoulos, A., White, P. J., & May, L. T. (2016). Ligand-Independent Adenosine A2B Receptor Constitutive Activity as a Promoter of Prostate Cancer Cell Proliferation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *357*(1), 36-44. <https://doi.org/10.1124/jpet.115.230003>
- Vielmetter, J., Chen, X.-N., Miskevich, F., Lane, R. P., Yamakawa, K., Korenberg, J. R., & Dreyer, W. J. (1997). Molecular Characterization of Human Neogenin, a DCC-Related Protein, and the Mapping of Its Gene (NEO1) to Chromosomal Position 15q22.3-q23. *Genomics*, *41*(3), 414-421. <https://doi.org/10.1006/geno.1997.4688>

- Villanueva, A. A., Sanchez-Gomez, P., Muñoz-Palma, E., Puvogel, S., Casas, B. S., Arriagada, C., Peña-Villalobos, I., Lois, P., Ramírez Orellana, M., Lubieniecki, F., Casco Claro, F., Gallegos, I., García-Castro, J., Torres, V. A., & Palma, V. (2021). The Netrin-1-Neogenin-1 signaling axis controls neuroblastoma cell migration via integrin- β 1 and focal adhesion kinase activation. *Cell Adhesion & Migration*, *15*(1), 58-73. <https://doi.org/10.1080/19336918.2021.1892397>
- Vitillo, L., Baxter, M., Iskender, B., Whiting, P., & Kimber, S. J. (2016). Integrin-Associated Focal Adhesion Kinase Protects Human Embryonic Stem Cells from Apoptosis, Detachment, and Differentiation. *Stem Cell Reports*, *7*(2), 167-176. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.07.006>
- Wang, E. T., Sandberg, R., Luo, S., Khrebtkova, I., Zhang, L., Mayr, C., Kingsmore, S. F., Schroth, G. P., & Burge, C. B. (2008). Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature*, *456*(7221), 470-476. <https://doi.org/10.1038/nature07509>
- Wang, H., Boussouar, A., Mazelin, L., Tauszig-Delamasure, S., Sun, Y., Goldschneider, D., Paradisi, A., & Mehlen, P. (2018). The Proto-oncogene c-Kit Inhibits Tumor Growth by Behaving as a Dependence Receptor. *Molecular Cell*, *72*(3), 413-425.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.08.040>
- Wang, H., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., & Tessier-Lavigne, M. (1999). Netrin-3, a mouse homolog of human NTN2L, is highly expressed in sensory ganglia and shows differential binding to netrin receptors. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *19*(12), 4938-4947. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-12-04938.1999>
- Wang, S., Tang, J., Sun, T., Zheng, X., Li, J., Sun, H., Zhou, X., Zhou, C., Zhang, H., Cheng, Z., Ma, H., & Sun, H. (2017). Survival changes in patients with small cell lung cancer and disparities between different sexes, socioeconomic statuses and ages. *Scientific Reports*, *7*(1), 1339. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01571-0>
- Wang, W., Hodkinson, P., McLaren, F., MacKinnon, A., Wallace, W., Howie, S., & Sethi, T. (2012). Small cell lung cancer tumour cells induce regulatory T lymphocytes, and patient survival correlates negatively with FOXP3+ cells in tumour infiltrate. *International Journal of Cancer*, *131*(6), E928-937. <https://doi.org/10.1002/ijc.27613>
- Wang, Z., Xu, Q., Zhang, N., Du, X., Xu, G., & Yan, X. (2020). CD146, from a melanoma cell adhesion molecule to a signaling receptor. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *5*(1), 148. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00259-8>
- Wang, Z., & Yan, X. (2013). CD146, a multi-functional molecule beyond adhesion. *Cancer Letters*, *330*(2), 150-162. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.11.049>
- Weiskopf, K., Jahchan, N. S., Schnorr, P. J., Cristea, S., Ring, A. M., Maute, R. L., Volkmer, A. K., Volkmer, J.-P., Liu, J., Lim, J. S., Yang, D., Seitz, G., Nguyen, T., Wu, D., Jude, K., Guerston, H., Barkal, A., Trapani, F., George, J., ... Sage, J. (2016). CD47-blocking immunotherapies stimulate macrophage-mediated destruction of small-cell lung cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, *126*(7), 2610-2620. <https://doi.org/10.1172/JCI81603>
- Williams, M. E., Lu, X., McKenna, W. L., Washington, R., Boyette, A., Strickland, P., Dillon, A., Kaprielian, Z., Tessier-Lavigne, M., & Hinck, L. (2006). UNC5A promotes neuronal apoptosis during spinal cord development independent of netrin-1. *Nature Neuroscience*, *9*(8), 996-998. <https://doi.org/10.1038/nn1736>
- Wilson, N. H., & Key, B. (2007). Neogenin : One receptor, many functions. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *39*(5), 874-878. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.10.023>

- Wistuba, I. I., Bryant, D., Behrens, C., Milchgrub, S., Virmani, A. K., Ashfaq, R., Minna, J. D., & Gazdar, A. F. (1999). Comparison of features of human lung cancer cell lines and their corresponding tumors. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 5(5), 991-1000.
- Woo, J., Kwon, S.-K., & Kim, E. (2009). The NGL family of leucine-rich repeat-containing synaptic adhesion molecules. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 42(1), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2009.05.008>
- Wooten, D. J., Groves, S. M., Tyson, D. R., Liu, Q., Lim, J. S., Albert, R., Lopez, C. F., Sage, J., & Quaranta, V. (2019). Systems-level network modeling of Small Cell Lung Cancer subtypes identifies master regulators and destabilizers. *PLoS Computational Biology*, 15(10), e1007343. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007343>
- Wu, N., Jia, D., Ibrahim, A. H., Bachurski, C. J., Gronostajski, R. M., & MacPherson, D. (2016). NFIB overexpression cooperates with Rb/p53 deletion to promote small cell lung cancer. *Oncotarget*, 7(36), 57514-57524. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11583>
- Wu, Q., Guo, J., Liu, Y., Zheng, Q., Li, X., Wu, C., Fang, D., Chen, X., Ma, L., Xu, P., Xu, X., Liao, C., Wu, M., Shen, L., & Song, H. (2021). YAP drives fate conversion and chemoresistance of small cell lung cancer. *Science Advances*, 7(40), eabg1850. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abg1850>
- Xing, W., Li, Q., Cao, R., & Xu, Z. (2014). Neogenin expression is inversely associated with breast cancer grade in ex vivo. *World Journal of Surgical Oncology*, 12(1), 352. <https://doi.org/10.1186/1477-7819-12-352>
- Xu, C., Zhang, W., & Liu, C. (2023). FAK downregulation suppresses stem-like properties and migration of human colorectal cancer cells. *PloS One*, 18(4), e0284871. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0284871>
- Xu, J., Yang, H., Fu, X., Jin, B., Lou, Y., Zhang, Y., Zhang, X., Zhong, H., Wang, H., Wu, D., & Han, B. (2017). Prophylactic Cranial Irradiation for Patients with Surgically Resected Small Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 12(2), 347-353. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.09.133>
- Yaar, M., Zhai, S., Pilch, P. F., Doyle, S. M., Eisenhauer, P. B., Fine, R. E., & Gilchrist, B. A. (1997). Binding of beta-amyloid to the p75 neurotrophin receptor induces apoptosis. A possible mechanism for Alzheimer's disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 100(9), 2333-2340. <https://doi.org/10.1172/JCI119772>
- Yamagishi, S., Hampel, F., Hata, K., del Toro, D., Schwark, M., Kvachnina, E., Bastmeyer, M., Yamashita, T., Tarabykin, V., Klein, R., & Egea, J. (2011). FLRT2 and FLRT3 act as repulsive guidance cues for Unc5-positive neurons. *The EMBO Journal*, 30(14), 2920-2933. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.189>
- Yamagishi, S., Yamada, K., Sawada, M., Nakano, S., Mori, N., Sawamoto, K., & Sato, K. (2015). Netrin-5 is highly expressed in neurogenic regions of the adult brain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 146. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00146>
- Yamakawa, K., Huot, Y. K., Haendelt, M. A., Hubert, R., Chen, X. N., Lyons, G. E., & Korenberg, J. R. (1998). DSCAM: A novel member of the immunoglobulin superfamily maps in a Down syndrome region and is involved in the development of the nervous system. *Human Molecular Genetics*, 7(2), 227-237. <https://doi.org/10.1093/hmg/7.2.227>

- Yang, C.-F. J., Chan, D. Y., Speicher, P. J., Gulack, B. C., Wang, X., Hartwig, M. G., Onaitis, M. W., Tong, B. C., D'Amico, T. A., Berry, M. F., & Harpole, D. H. (2016). Role of Adjuvant Therapy in a Population-Based Cohort of Patients With Early-Stage Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *34*(10), 1057-1064. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.63.8171>
- Yang, D., Denny, S. K., Greenside, P. G., Chaikovsky, A. C., Brady, J. J., Ouadah, Y., Granja, J. M., Jahchan, N. S., Lim, J. S., Kwok, S., Kong, C. S., Berghoff, A. S., Schmitt, A., Reinhardt, H. C., Park, K.-S., Preusser, M., Kundaje, A., Greenleaf, W. J., Sage, J., & Winslow, M. M. (2018a). Intertumoral Heterogeneity in SCLC Is Influenced by the Cell Type of Origin. *Cancer Discovery*, *8*(10), 1316-1331. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0987>
- Yang, D., Qu, F., Cai, H., Chuang, C.-H., Lim, J. S., Jahchan, N., Grüner, B. M., S Kuo, C., Kong, C., Oudin, M. J., Winslow, M. M., & Sage, J. (2019). Axon-like protrusions promote small cell lung cancer migration and metastasis. *eLife*, *8*, e50616. <https://doi.org/10.7554/eLife.50616>
- Yang, Y., Zhang, D., Zhou, X., Bao, W., Ji, Y., Sheng, L., Cheng, L., Chen, Y., Du, X., & Qiu, G. (2018b). Prophylactic cranial irradiation in resected small cell lung cancer : A systematic review with meta-analysis. *Journal of Cancer*, *9*(2), 433-439. <https://doi.org/10.7150/jca.21465>
- Yap, L., Tay, H. G., Nguyen, M. T. X., Tjin, M. S., & Tryggvason, K. (2019). Laminins in Cellular Differentiation. *Trends in Cell Biology*, *29*(12), 987-1000. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.10.001>
- Yebra, M., Montgomery, A. M. P., Diaferia, G. R., Kaido, T., Silletti, S., Perez, B., Just, M. L., Hildbrand, S., Hurford, R., Florkiewicz, E., Tessier-Lavigne, M., & Cirulli, V. (2003). Recognition of the neural chemoattractant Netrin-1 by integrins alpha6beta4 and alpha3beta1 regulates epithelial cell adhesion and migration. *Developmental Cell*, *5*(5), 695-707. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(03\)00330-7](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(03)00330-7)
- Yeh, A. C., & Ramaswamy, S. (2015). Mechanisms of Cancer Cell Dormancy—Another Hallmark of Cancer? *Cancer Research*, *75*(23), 5014-5022. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1370>
- Yi, L., Lei, Y., Yuan, F., Tian, C., Chai, J., & Gu, M. (2022). NTN4 as a prognostic marker and a hallmark for immune infiltration in breast cancer. *Scientific Reports*, *12*(1), 10567. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14575-2>
- Yin, Y., Miner, J. H., & Sanes, J. R. (2002). Laminets : Laminin- and Netrin-Related Genes Expressed in Distinct Neuronal Subsets. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *19*(3), 344-358. <https://doi.org/10.1006/mcne.2001.1089>
- Yoshida, Y. (2012). Semaphorin signaling in vertebrate neural circuit assembly. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *5*, 71. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2012.00071>
- Yu, M., Ting, D. T., Stott, S. L., Wittner, B. S., Oszolak, F., Paul, S., Ciciliano, J. C., Smas, M. E., Winokur, D., Gilman, A. J., Ulman, M. J., Xega, K., Contino, G., Alagesan, B., Brannigan, B. W., Milos, P. M., Ryan, D. P., Sequist, L. V., Bardeesy, N., ... Haber, D. A. (2012). RNA sequencing of pancreatic circulating tumour cells implicates WNT signaling in metastasis. *Nature*, *487*(7408), 510-513. <https://doi.org/10.1038/nature11217>
- Yuan, M., Xie, F., Xia, X., Zhong, K., Lian, L., Zhang, S., Yuan, L., & Ye, J. (2020). UNC5C-knockdown enhances the growth and metastasis of breast cancer cells by potentiating the integrin $\alpha 6/\beta 4$ signaling pathway. *International Journal of Oncology*, *56*(1), 139-150. <https://doi.org/10.3892/ijo.2019.4931>

- Yung, A. R., Nishitani, A. M., & Goodrich, L. V. (2015). Phenotypic analysis of mice completely lacking netrin 1. *Development (Cambridge, England)*, *142*(21), 3686-3691. <https://doi.org/10.1242/dev.128942>
- Yung, R. C. W. (2003). Tissue diagnosis of suspected lung cancer : Selecting between bronchoscopy, transthoracic needle aspiration, and resectional biopsy. *Respiratory Care Clinics of North America*, *9*(1), 51-76. [https://doi.org/10.1016/s1078-5337\(02\)00083-7](https://doi.org/10.1016/s1078-5337(02)00083-7)
- Yuzhalin, A. E., Lim, S. Y., Kutikhin, A. G., & Gordon-Weeks, A. N. (2018). Dynamic matrisome : ECM remodeling factors licensing cancer progression and metastasis. *Biochimica Et Biophysica Acta. Reviews on Cancer*, *1870*(2), 207-228. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2018.09.002>
- Zer, A., Domachevsky, L., Rapson, Y., Nidam, M., Flex, D., Allen, A. M., Stemmer, S. M., Groshar, D., & Bernstine, H. (2016). The Role of 18F-FDG PET/CT on Staging and Prognosis in Patients with Small Cell Lung Cancer. *European Radiology*, *26*(9), 3155-3161. <https://doi.org/10.1007/s00330-015-4132-2>
- Zhang, H., Liu, T., Zhang, Z., Payne, S. H., Zhang, B., McDermott, J. E., Zhou, J.-Y., Petyuk, V. A., Chen, L., Ray, D., Sun, S., Yang, F., Chen, L., Wang, J., Shah, P., Cha, S. W., Aiyetan, P., Woo, S., Tian, Y., ... CPTAC Investigators. (2016). Integrated Proteogenomic Characterization of Human High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Cell*, *166*(3), 755-765. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.069>
- Zhang, H., Pan, Y., Cheung, M., Cao, M., Yu, C., Chen, L., Zhan, L., He, Z., & Sun, C. (2019a). LAMB3 mediates apoptotic, proliferative, invasive, and metastatic behaviors in pancreatic cancer by regulating the PI3K/Akt signaling pathway. *Cell Death & Disease*, *10*(3), 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1320-z>
- Zhang, M., Ergin, V., Lin, L., Stork, C., Chen, L., & Zheng, S. (2019b). Axonogenesis Is Coordinated by Neuron-Specific Alternative Splicing Programming and Splicing Regulator PTBP2. *Neuron*, *101*(4), 690-706.e10. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.01.022>
- Zhang, S., Sun, X., Sun, L., Xiong, Z., Ma, J., & Han, C. (2017). Benefits of postoperative thoracic radiotherapy for small cell lung cancer subdivided by lymph node stage : A systematic review and meta-analysis. *Journal of Thoracic Disease*, *9*(5), 1257-1264. <https://doi.org/10.21037/jtd.2017.03.174>
- Zhang, W., Girard, L., Zhang, Y.-A., Haruki, T., Papari-Zareei, M., Stastny, V., Ghayee, H. K., Pacak, K., Oliver, T. G., Minna, J. D., & Gazdar, A. F. (2018a). Small cell lung cancer tumors and preclinical models display heterogeneity of neuroendocrine phenotypes. *Translational Lung Cancer Research*, *7*(1), 32-49. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2018.02.02>
- Zhang, W., Rajan, I., Savelieva, K. V., Wang, C.-Y., Vogel, P., Kelly, M., Xu, N., Hasson, B., Jarman, W., & Lanthorn, T. H. (2008). Netrin-G2 and netrin-G2 ligand are both required for normal auditory responsiveness. *Genes, Brain, and Behavior*, *7*(4), 385-392. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2007.00361.x>
- Zhang, X., Cui, P., Ding, B., Guo, Y., Han, K., Li, J., Chen, H., & Zhang, W. (2018b). Netrin-1 elicits metastatic potential of non-small cell lung carcinoma cell by enhancing cell invasion, migration and vasculogenic mimicry via EMT induction. *Cancer Gene Therapy*, *25*(1-2), 18-26. <https://doi.org/10.1038/s41417-017-0008-8>
- Zhao, G., Gong, L., Su, D., Jin, Y., Guo, C., Yue, M., Yao, S., Qin, Z., Ye, Y., Tang, Y., Wu, Q., Zhang, J., Cui, B., Ding, Q., Huang, H., Hu, L., Chen, Y., Zhang, P., Hu, G., ... Ji, H. (2019). Cullin5 deficiency promotes small-cell lung cancer metastasis by stabilizing integrin β 1. *The Journal of Clinical Investigation*, *129*(3), 972-987. <https://doi.org/10.1172/JCI122779>

Zhao, J., Pestell, R., & Guan, J.-L. (2001). Transcriptional Activation of Cyclin D1 Promoter by FAK Contributes to Cell Cycle Progression. *Molecular Biology of the Cell*, 12(12), 4066-4077. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.12.4066>

Zhou, F., Zhou, C. (2018a). Lung cancer in never smokers-the East Asian experience. *Transl Lung Cancer Res.*, (4):450-463. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2018.05.14>.

Zhou, J., Nefedova, Y., Lei, A., & Gabrilovich, D. (2018b). Neutrophils and PMN-MDSC : Their biological role and interaction with stromal cells. *Seminars in Immunology*, 35, 19-28. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.12.004>

Zhu, Y., Li, Y., Haraguchi, S., Yu, M., Ohira, M., Ozaki, T., Nakagawa, A., Ushijima, T., Isogai, E., Koseki, H., Nakamura, Y., Kong, C., Mehlen, P., Arakawa, H., & Nakagawara, A. (2013). Dependence receptor UNC5D mediates nerve growth factor depletion-induced neuroblastoma regression. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(7), 2935-2947. <https://doi.org/10.1172/JCI65988>

Annexes

Annexe 1 : “Targeting netrin-3 in small cell lung cancer and neuroblastoma”

Shan Jiang*, Mathieu Richaud*, Pauline Vieugué, Nicolas Rama, Jean-Guy Delcros, Maha Siouda, Mitsuaki Sanada, Anna-Rita Redavid, Benjamin Ducarouge, Maëva Hervieu, Silvia Breusa, Ambroise Manceau, Charles-Henry Gattolliat, Nicolas Gadot, Valérie Combaret, David Neves, Sandra Ortiz-Cuaran, Pierre Saintigny, Olivier Meurette, Thomas Walter, Isabelle Janoueix-Lerosey, Paul Hofman, Peter Mulligan, David Goldschneider, Patrick Mehlen, Benjamin Gibert.

EMBO Molecular Medicine 13, e12878 (2021)

* : auteurs ayant contribué également à ce travail

Le résumé de cet article est présenté dans le chapitre II, partie III.2.

SOURCE
DATATRANSPARENT
PROCESSOPEN
ACCESS

Targeting netrin-3 in small cell lung cancer and neuroblastoma

Shan Jiang^{1,†}, Mathieu Richaud^{1,†}, Pauline Vieugué^{1,†}, Nicolas Rama¹ , Jean-Guy Delcros^{1,2} , Maha Siouda³, Mitsuaki Sanada⁴, Anna-Rita Redavid¹, Benjamin Ducarouge⁵, Maëva Hervieu¹, Silvia Breusa¹, Ambroise Manceau¹, Charles-Henry Gattolliat⁶, Nicolas Gadot⁷, Valérie Combaret⁷, David Neves⁵, Sandra Ortiz-Cuaran³, Pierre Saintigny³, Olivier Meurette¹ , Thomas Walter^{1,8}, Isabelle Janoueix-Lerosey⁹, Paul Hofman¹⁰, Peter Mulligan³ , David Goldshneider⁵, Patrick Mehlen^{1,3,*} & Benjamin Gibert^{1,3,*}

Abstract

The navigation cue netrin-1 is well-documented for its key role in cancer development and represents a promising therapeutic target currently under clinical investigation. Phase 1 and 2 clinical trials are ongoing with NP137, a humanized monoclonal antibody against netrin-1. Interestingly, the epitope recognized by NP137 in netrin-1 shares 90% homology with its counterpart in netrin-3, the closest member to netrin-1 in humans, for which little is known in the field of cancer. Here, we unveiled that netrin-3 appears to be expressed specifically in human neuroblastoma (NB) and small cell lung cancer (SCLC), two subtypes of neuroectodermal/neuroendocrine lineages. Netrin-3 and netrin-1 expression are mutually exclusive, and the former is driven by the MYCN oncogene in NB, and the ASCL-1 or NeuroD1 transcription factors in SCLC. Netrin-3 expression is correlated with disease stage, aggressiveness, and overall survival in NB. Mechanistically, we confirmed the high affinity of netrin-3 for netrin-1 receptors and we demonstrated that netrin-3 genetic silencing or interference using NP137, delayed tumor engraftment, and reduced tumor growth in animal models. Altogether, these data support the targeting of netrin-3 in NB and SCLC.

Keywords axon guidance; netrin-1; netrin-3; neuroblastoma; small cell lung cancer

Subject Categories Cancer; Signal Transduction

DOI 10.15252/emmm.202012878 | Received 4 June 2020 | Revised 1 February 2021 | Accepted 7 February 2021 | Published online 15 March 2021

EMBO Mol Med (2021) 13: e12878

Introduction

Navigation cues such as semaphorins, netrins, or ephrins have been shown to play various crucial roles in many cellular processes (Stoeckli, 2018). Members of the netrin family, strongly implicated in the nervous system development, have been associated with several pathologies (van Gils *et al*, 2012; Ramkhelawon *et al*, 2014; Renders *et al*, 2021). Interestingly, netrin-1, the most studied member of the netrin family, is upregulated in a large fraction of human cancers, where it is generally assumed to promote cancer cell survival *via* its interaction with its receptors, deleted in colorectal carcinoma (DCC) and members of the uncoordinated-5 family (UNC5-A, B, C, D; Mehlen *et al*, 2011; Paradisi *et al*, 2013). An effort to assay the clinical relevance of inhibiting netrin-1/receptor interactions is currently ongoing with an anti-netrin-1 monoclonal antibody NP137 (Grandin *et al*, 2016). Preliminary data from the phase 1 trial performed on patients with advanced solid cancer have recently been presented, underlining an encouraging anti-tumor activity (Cassier *et al*, 2019). A phase-1b/2 trial investigating NP137 in combination with chemotherapy or/and anti-PD1 in a specific

- 1 Apoptosis, Cancer and Development Laboratory- Equipe labellisée 'La Ligue', LabEx DEVweCAN, Institut PLASCAN, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM U1052-CNRS UMR5286, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, Lyon, France
- 2 Small Molecules for Biological Targets, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, UMR INSERM 1052 – CNRS 5286 ISPB Rockefeller, Lyon, France
- 3 Univ Lyon, Centre Léon Bérard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Lyon, France
- 4 Toray Industries, Inc., New Frontiers Research Labs, Kanagawa, Japan
- 5 Netris Pharma, Lyon, France
- 6 CNRS UMR 8126, University Paris-Sud 11, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France
- 7 Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Centre Léon Bérard, Lyon, France
- 8 Hospices Civils de Lyon, Hôpital Edouard Herriot, Service de Gastroentérologie et d'Oncologie Digestive, Lyon Cedex 03, France
- 9 INSERM, U830, Génétique et Biologie des Cancers, Institut Curie, Paris, France
- 10 Laboratory of Clinical and Experimental Pathology, Université Côte d'Azur, CHU Nice, FHU OncoAge, Pasteur Hospital, Nice, France

*Corresponding author. Tel: +33 4 78782870; E-mail: patrick.mehlen@lyon.unicancer.fr

**Corresponding author. Tel: +33 4 69856266; E-mail: benjamin.gibert@lyon.unicancer.fr

[†]These authors contributed equally to this work

[‡]These authors contributed equally to this work as senior authors

clinical indication, i.e., uterine cancer—is also ongoing (NCT02977195).

Interestingly, the epitope recognized by NP137, a 22 amino acid sequence of the netrin-1 V2 domain (Grandin *et al*, 2016), is highly conserved in chicken netrin-2, often considered to be the ortholog of human netrin-3. Hence, we sought to investigate netrin-3 expression in a tumor-related context. Netrin-3, originally described in 1999 for its putative role as a guidance molecule, is expressed in sensory ganglia during embryonic development and displays a high level of affinity for netrin-1 receptors in mice (Wang *et al*, 1999). However, little is known on its biological functions during embryonic development as knockout mice have to our knowledge not been generated, and its expression pattern in humans has to date not been described. In the present study, we show that netrin-3 is specifically upregulated in tumors associated with neuroectodermal/neuroendocrine lineages. More specifically, we demonstrate that netrin-3 expression is correlated with neuroblastoma (NB) aggressiveness and could constitute a promising prognostic marker and may be considered as a therapeutic target in small cell lung cancer (SCLC).

Results

Analysis of netrin-3 expression in cancer

We first attempted to identify the cancer-associated expression of netrin-3 by conducting a bioinformatics search in public cancer databases. We first focused on a dataset encompassing RNA-sequencing data from 675 cancer cell lines (Klijn *et al*, 2015) overlapping 16 cancer cell types. Compared to *netrin-1* gene expression, which is displayed by most cancers, *netrin-3* gene expression was largely represented by two specific clusters corresponding to neuroblastoma (NB) and small cell lung cancer (SCLC) (Fig 1A). Of note, the expression of netrin-3 and netrin-1 seemed to be mutually exclusive (Fig 1B). While netrin-1 was detectable (FPKM ≥ 1) in 43.3% of cell lines, netrin-3 was only detected in 4.8%, and their common expression occurred in only 0.015% of cell lines ($P = 0.037$ —Fisher's exact test) (Fig 1C), arguing in favor of a selective event driving high *netrin-3* gene expression specifically in these two neuroepithelial cancer indications (Rindi *et al*, 2018).

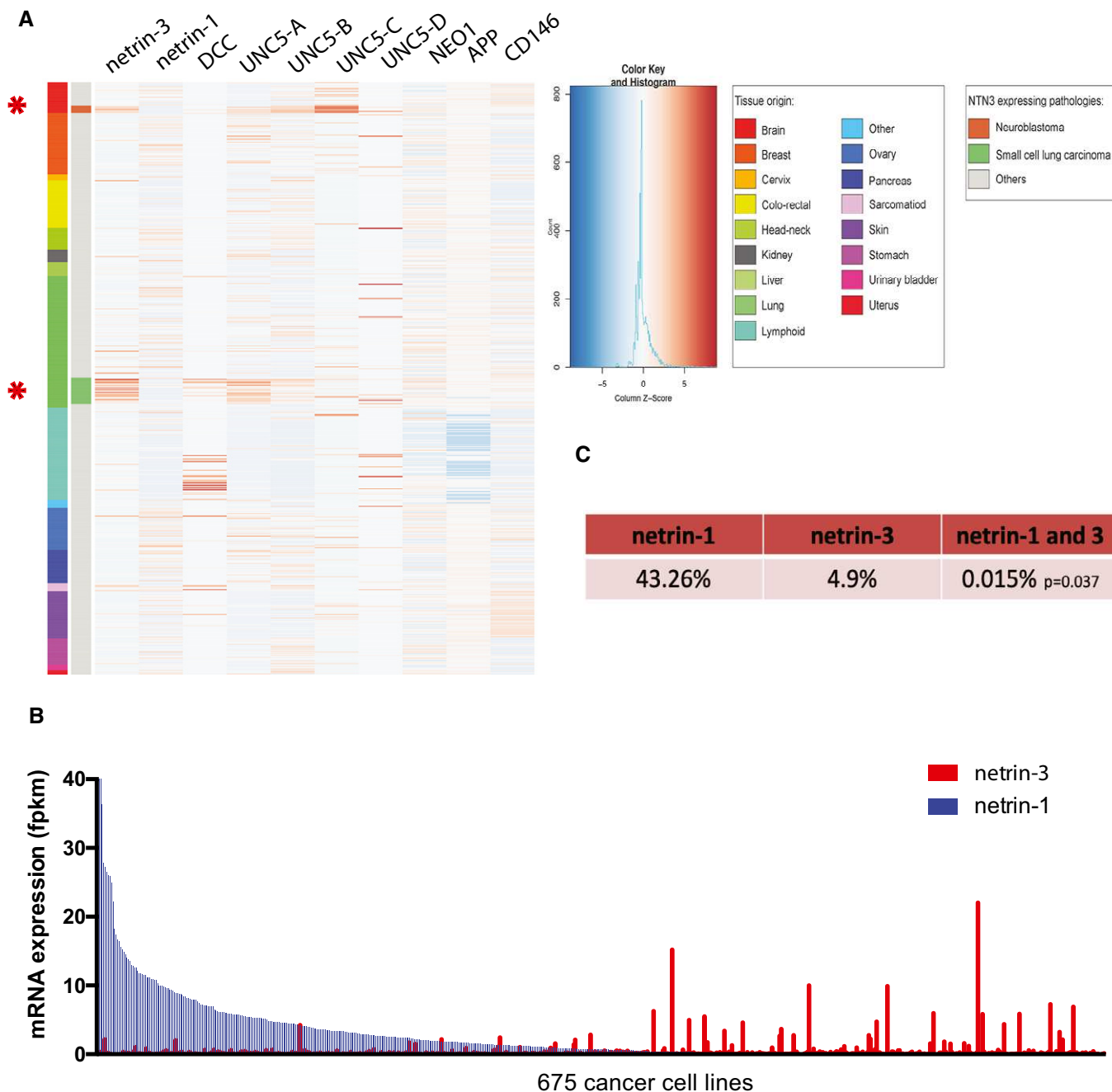
Netrin-3 as a prognostic marker for NB

We thus investigated more closely the expression of *netrin-3* gene in NB, which is the most common extracranial pediatric solid tumor, responsible for 15% of all childhood cancer-related deaths, and arises from the sympatho-adrenal lineage of neural crest cells (Pugh *et al*, 2013; Matthay *et al*, 2016; Mohlin *et al*, 2019; Chang *et al*, 2020). According to the INSS classification, NB patient outcome is strongly associated with tumor grade, which encompasses five stages in the case of NB, namely 1, 2, 3, 4, and 4S. We thus analyzed *netrin-3* gene expression by qRT-PCR in a panel of 181 human NB samples (Gibert *et al*, 2014). While netrin-3 mRNA was barely detectable in stages-1, -2, and -3, which are localized NB with good prognosis, its expression increased in more advanced, highly aggressive and metastatic tumors with poor outcome (Fig 2A). Indeed, stage-4 displayed higher levels of netrin-3 compared to stages-1 ($P = 0.0102$), -2 ($P = 0.1068$), or -3

($P = 0.0042$). Remarkably, stage 4S restricted to neonates and encompassing highly metastatic tumors that often spontaneously regress, displayed a low level of netrin-3 ($P = 0.0434$; stage-4 vs. 4S) (Fig 2A). NB patients were also stratified in two groups according to MYCN amplification, the lower risk group consisting of non-MYCN-amplified and localized tumors (stages-1, -2, and -3) and metastatic forms for children under 18 months (stages-4 and 4S) (Matthay *et al*, 2016). The high-risk group includes all MYCN-amplified NB and non-MYCN-amplified stage-4 tumors, for children above 18 months (Ambros *et al*, 2003). *Netrin-3* gene expression was once again correlated with poor outcome as it was significantly higher in the high-risk group ($P = 0.039$) (Fig 2B). Furthermore, elevated *netrin-3* gene expression levels were strongly correlated with poor overall survival (OS) in this cohort (median expression ranking), with an OS at 150 months of 72.5% for low netrin-3-expressing tumors and 46.6% for high netrin-3-expressing tumors ($P = 0.029$) (Fig 2C). A group of NB patients ($n = 19$) that displayed a twofold increase or more in netrin-3 expression was extrapolated (=netrin-3 very high) from this original cohort and exhibited an OS of 28.5% ($P = 0.002$) (Figs 2C and EV1A). Moreover, in the aggressive stage-4 sustained *netrin-3* gene expression was correlated with poor prognosis, potentially underlining a function for netrin-3 in NB tumor progression and aggressiveness (Fig 2D). Finally, we confirmed the data extracted from the 181 patients, using a published cohort of 498 cases of NB patients (Zhang *et al*, 2015), and further validated this gene expression with an RNAscope analysis on fixed frozen NB-tissue samples (Figs 2E and EV1B–D).

To refine the molecular characterization of netrin-3-expressing NB tumors, we performed Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) to identify associated pathways (Subramanian *et al*, 2005). We observed that MYCN-regulated pathways were also over-activated in the netrin-3 high group ($P = 0.039$; $\text{fdqr} = 0.025$) (Fig 3A). The E2F signature was also over-represented among netrin-3 high NB tumors ($P \leq 0.001$; $\text{fdqr} = 0.0014$), the G2/M cell hallmark correlated with genomic instability was also predominant in netrin-3 high stage four patients (Fig EV2A–B). These two signatures are correlated with high levels of mitosis and cancer aggressiveness.

As MYCN amplification is believed to be one of the most drastic events impacting patient survival (Rickman *et al*, 2018), we decided to further analyze the links between MYCN and netrin-3 in NB among the 498 patients. As such, those with an amplified MYCN presented a higher level of netrin-3 compared to non-amplified MYCN-bearing patients ($P \leq 0.001$), suggesting a putative direct regulation by this transcription factor (Figs 3B and EV2C). Interestingly, netrin-3 did not constitute a prognostic marker in non-MYCN-amplified patients (Fig EV2D). *Netrin-3* gene expression decreases when *mycn* was silenced using specific siRNA in two NB cell lines, whereas *netrin-1* remained unaltered (Figs 3C and EV2E). MYCN regulation of *netrin-3* gene expression was further supported, as we detected an enrichment in MYCN binding sites in the *netrin-3* promoter locus after CHIP-sequencing analysis of NB cell lines (Robinson *et al*, 2011; Zeid *et al*, 2018; Upton *et al*, 2020). This was correlated with Histone H3 acetyl-Lysine 27 (H3K27ac) and monomethylated H3K4 (H3K4me1), histone modifications that are associated with active enhancer regions (Rada-Iglesias *et al*, 2011), indicating that MYCN directly contributes to increasing the expression of netrin-3 in NB (Figs 3D and EV2F). A broad domain of the active promoter-associated epigenetic modification, trimethylated



Downloaded from https://www.embopress.org on August 22, 2024 from IP 2a01:cbl4:61e:a800:c4dc:93c8:7674:271.

Figure 1. Netrin-3 expression in cancer cell lines.

Exploring the expression by RNA sequencing of netrin-1 and netrin-3 among 675 cancer cell lines spanning 16 cancer types.

A Expression heat map of netrin-3 and netrin-1. Receptors of netrin-1 and putative receptors of netrin-3: DCC, UNC5-A, UNC5-B, UNC5-C, UNC5-D, Neogenin, APP, CD146 are presented. The color legend (right-hand side) describes all tumor types included in the heat map. Asterisks indicate the two main pathologies in which netrin-3 expression is detectable.

B Analysis of netrin-1 and netrin-3 expression in tumor cell lines and ranked according to netrin-1 expression.

C Percentage of cell lines positive for netrin-1 and/or netrin-3 expression. Co-occurrence of expression was calculated using Fisher's exact test. *P*-value is indicated in the table.

H3K4 (H3K4me3), was also enriched at *netrin-3* transcription start site (TSS) and across the gene body (Figs 3D and EV2F), consistent with this being an actively transcribed gene potentially involved in

cell identity (Benayoun *et al*, 2015) (Fig EV2F). This binding was undetectable for Netrin-1 explaining, at least in part, the specificity of these expressions (Fig EV2G).

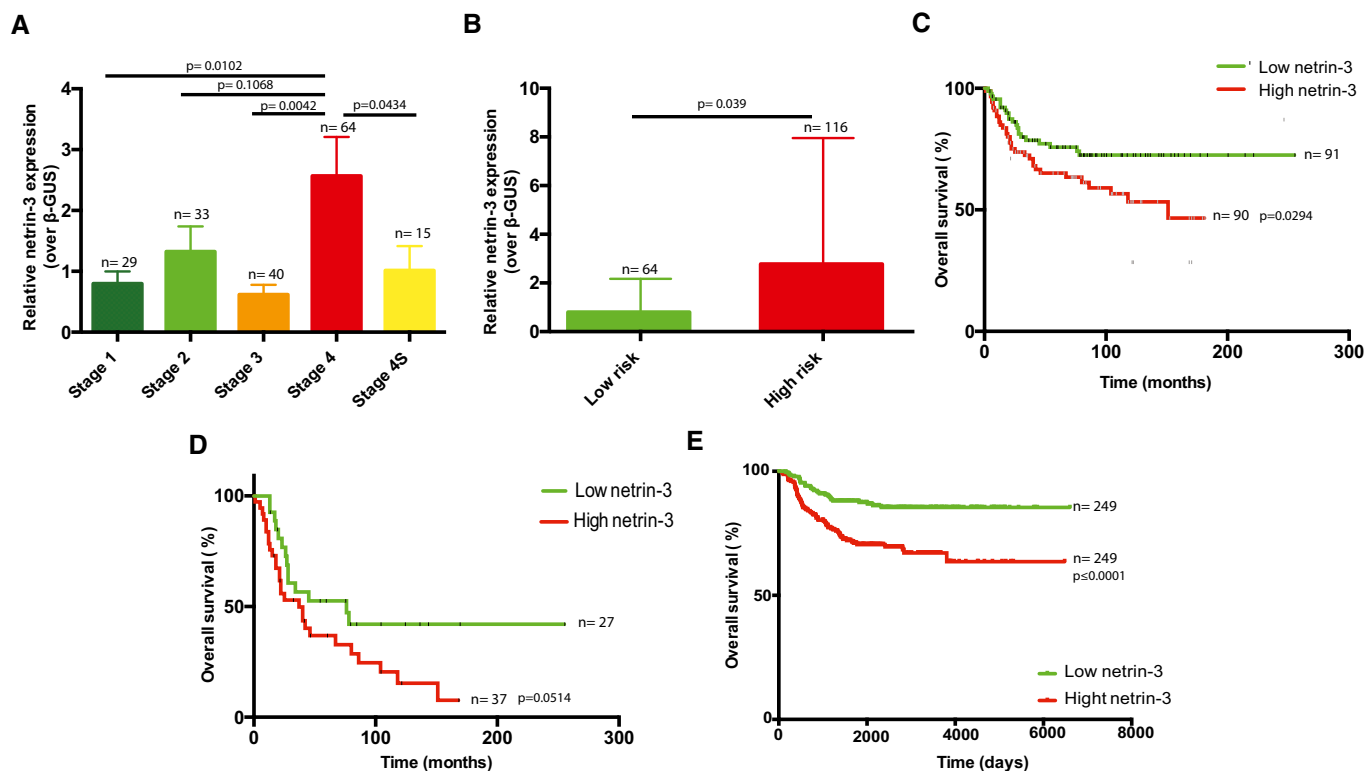


Figure 2. Analysis of *netrin-3* expression on neuroblastoma (NB) prognosis.

- A Quantification of *netrin-3* gene expression by qRT-PCR in a panel of 181 human NB stages 1, 2, 3, 4, and 4S. Number of cases is indicated on the graph. Error bars indicate s.e.m. Statistical treatment of the data was performed using a two-sided Student's *t*-test.
- B Quantification of *netrin-3* gene expression by qRT-PCR in a panel of 181 human neuroblastoma patients, defined as low- and high-risk NB. The number of cases is indicated on the graph. Error bars indicate s.e.m. Statistical treatment of the data was performed using a two-sided Student's *t*-test.
- C *Netrin-3* high expression is a marker of poor prognosis in NB. 280 months overall Kaplan–Meier survival curves in a panel of 181 patients of all NB stages. The cohort was dichotomized base on *netrin-3* median expression (in green and red). Statistical treatment of the data: Mantel–Cox; *P*-value is indicated below the graph.
- D *Netrin-3* high expression is a marker of poor prognosis in aggressive NB. 280 months overall Kaplan–Meier survival curves in a panel of 64 stage four patients. The cohort was dichotomized base on *netrin-3* expression, as presented in panel C. Statistical treatment of the data: Mantel–Cox; *P*-value is indicated below the graph.
- E Confirmation in 498 RNA-seq NB patients that *netrin-3* high expression is a marker of poor prognosis in NB. 6,000 days overall Kaplan–Meier survival curves. The cohort was dichotomized based on *netrin-3* median expression (in green and red). Statistical treatment of the data: Mantel–Cox; *P*-value is indicated below the graph.

To ascertain whether *netrin-3* impacts neuroblastoma tumor formation, we conducted *netrin-3* silencing *via* specific siRNA assays in the IGR-N91 cell line. The chorioallantoic membrane (CAM) of chicken embryos is a well-described model to study tumor progression (Stupack *et al.*, 2006; Berthenet *et al.*, 2020). NB cells were xenografted on the CAM of ten-day-old chick embryos (Fig EV2H). Seventeen-day-old chick embryos were then analyzed for primary tumor size. As shown in Fig 3E, tumors silenced for *netrin-3* were substantially smaller than controls (*U*-test; siScr vs. si*Netrin-3*, *P* = 0.0011). Staining of the engrafted tumors resulted in an increase in the number of apoptotic cells detected in *netrin-3*-silenced tumors (Cleaved PARP, *U*-test, *P* = 0.0162). It is interesting to note that proliferation appears as not modified in the same experiments (Fig EV2I). Similar results were obtained with IMR32 NB cell line (*U*-test, *P* = 0.0025) (Fig 3F).

Elevated *netrin-3* expression in small cell lung cancer

We next investigated the putative role of *netrin-3* in SCLC, which is the deadliest histological subtype of lung cancers, associated with

high rates of metastatic disease at diagnosis (Augert *et al.*, 2020; Ko *et al.*, 2021). Some drugs including immunotherapy have recently been tested in the clinic for this indication but have failed to provide benefits for a majority of patients. *Netrin-3* expression was detectable by RNA sequencing in lung cancer cell lines, particularly in SCLC (*P* ≤ 0.001) and more sporadically in carcinoid and mesothelioma cells which are also neuroendocrine lineages (Figs 4A and EV3A). We performed qRT-PCR analyses to select NCI-H82 and NCI-H69 cells model, as they expressed *netrin-3* but not *netrin-1* (Fig 4B).

To further analyze the expression of *netrin-3* in human SCLC, we performed an RNAscope analysis on FFPE sections (Fig 4C). *Netrin-3* was expressed at a high level in nine out of 10 human SCLC samples tested, whereas *netrin-1* was detected in only 10% of the samples, confirming our previous observation on their exclusive expression pattern (Fig 4D). Interestingly, RNAscope analysis further supported the view that *netrin-3* was specifically expressed by cancer cells and not by the tumor microenvironment (Fig EV3B and C).

In an effort to unravel the mechanisms underlying the expression of *netrin-3* in SCLC, we additionally carried out an *in silico*

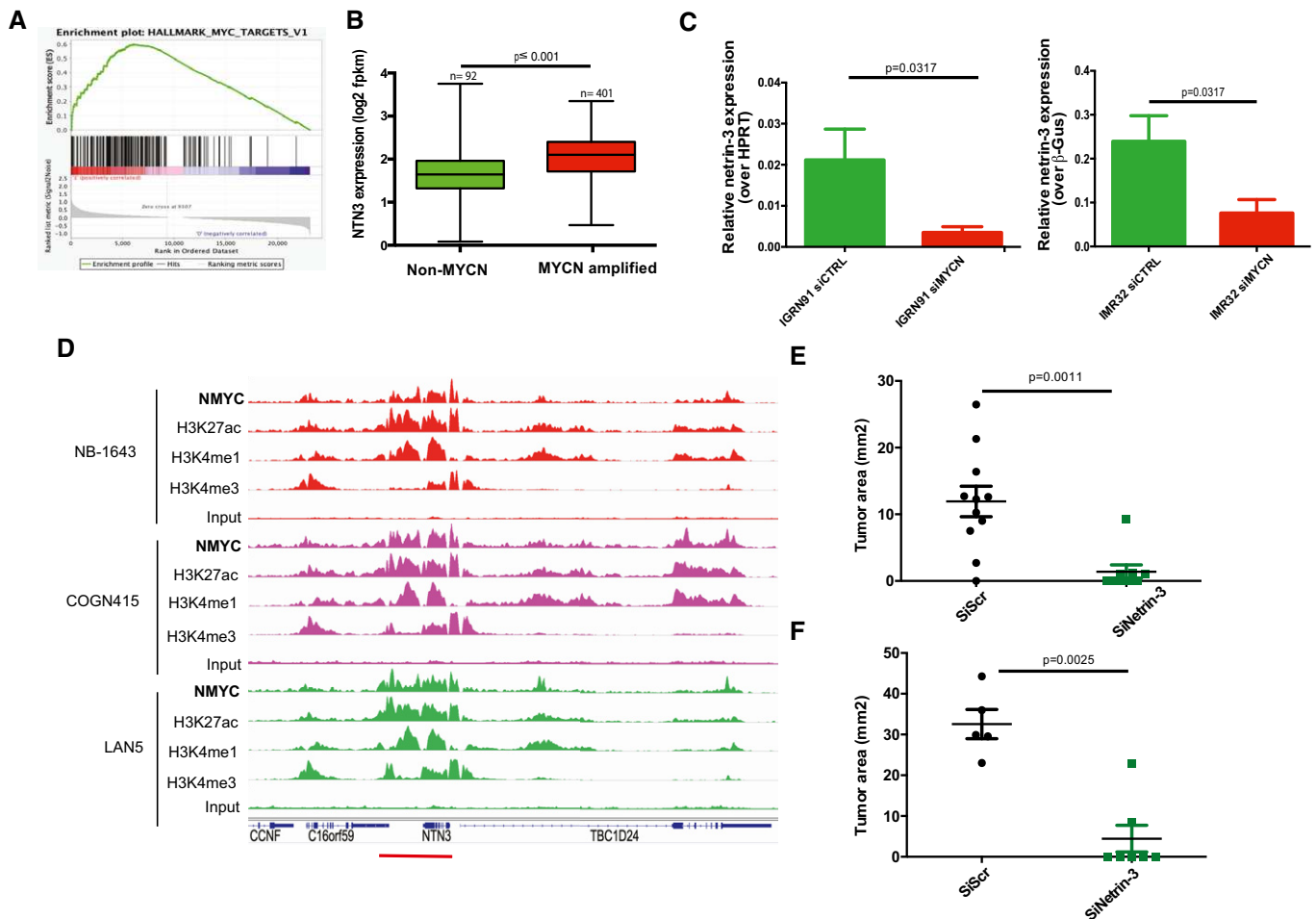


Figure 3. Netrin-3 is a target gene of MYCN in NB.

- A Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) in high netrin-3 NB patients. The cohort was dichotomized with the $n = 50$ lowest vs. 50 highest: amplification the MYCN pathway ($P = 0.039$; $fdqr = 0.025$).
- B Netrin-3 expression is higher in MYCN-amplified NB patients. The cohort was dichotomized based on *mycn* amplification and sorted for netrin-3 expression. Statistical treatment of the data: Welsh test; P -value is indicated on the graph. Error bars indicate s.e.m (boxes = 25th to 75th percentile; central band = mean; whiskers = min to max).
- C QRT-PCR analysis of *netrin-3* gene expression in IMR32 ($n = 5$) and IGRN91 ($n = 5$) NB cell lines after MYCN silencing by siRNA (U -test). Error bars indicate s.e.m.
- D ChIP-seq analysis of MYCN binding, active enhancer epigenetic marks H3K27ac, H3K4me1, and active promoter epigenetic mark H3K4me3, on *netrin-3* locus (red line). An enrichment of MYCN, associated with active enhancer marks, was detected in three different neuroblastoma cell lines NB-1643, COGN415, and LAN5.
- E Quantitative analysis showing the size of IGRN91 primary tumors implanted on CAM and silenced or not for netrin-3 ($n = 11$ siScr, $n = 9$ siNetrin-3; U -test). Error bars indicate s.e.m.
- F Quantitative analysis showing the size of IMR32 primary tumors silenced or not for netrin-3 ($n = 5$ siScr, $n = 7$ siNetrin-3; U -test). Error bars indicate s.e.m.

screen of transcription factors described as promoters of genes associated with SCLC aggressiveness. Indeed, netrin-3 expression is associated with the expression of two key transcription factors: the neuronal transcription factor neurogenic differentiation 1 (NeuroD1) and Achaete-Scute Family BHLH Transcription Factor-1 (ASCL-1) (Borromeo *et al*, 2016; Rudin *et al*, 2019). These factors are upregulated in a variety of aggressive neural/neuroendocrine carcinomas and important for the development and function of several neural/neuroendocrine tissues. After analysis of published ChIP-sequencing datasets, we identified that specific binding sites for both NeuroD1 and ASCL-1 are enriched upstream of the *netrin-3* gene promoter in SCLC cell lines (Robinson *et al*, 2011;

Borromeo *et al*, 2016; Huang *et al*, 2018; Upton *et al*, 2020) (Figs 5A and EV4A and B). These data show that the NeuroD1 and ASCL-1 peaks are centered around a broad domain of H3K27ac that encompasses the entire *netrin-3* upstream intergenic region, as well as most of the gene body. This suggests that NeuroD1 and ASCL-1 binding at this site is associated with transcriptional activation of netrin-3 (Fig 5B). By comparison, we did not observe a similar enrichment in H3K27ac in a wide range of other cell types, indicating selectivity to SCLC cell lines expressing NeuroD1/ASCL-1 (Fig EV4A and B). We detected no binding in the *netrin-1* gene promoter (Fig EV4C). Furthermore, *netrin-3* gene expression decreases when *neuroD1* and *ascl-1* were silenced using specific

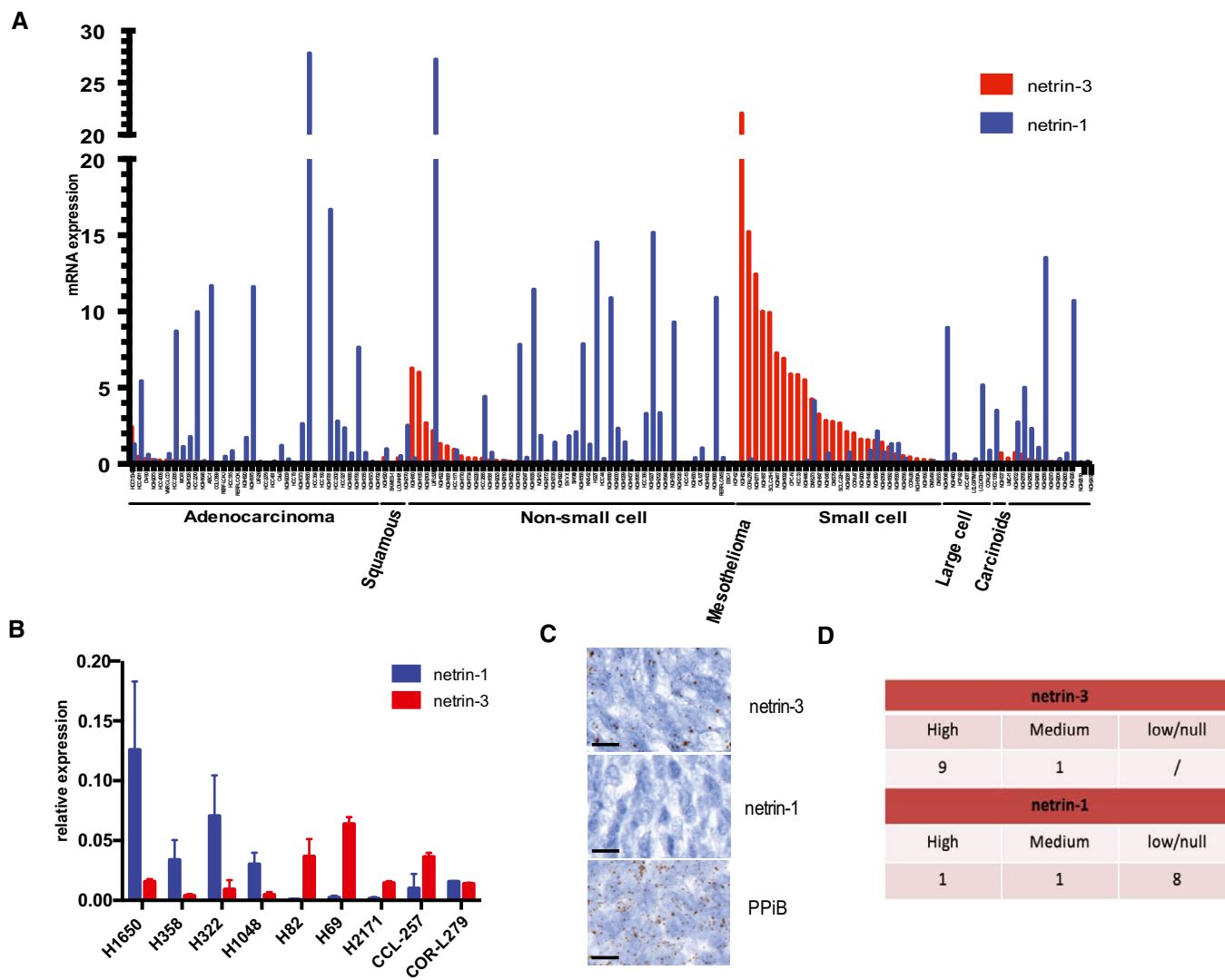


Figure 4. Characterization of Netrin-3 in SCLC.

- A Deep analysis of *netrin-3* gene expression in lung cancer cell lines ($n = 76$; RNA-Seq).
- B QRT-PCR analysis of *netrin-1* and *netrin-3* expression, in lung cancer cell Lines (Error bars indicate SD, $n = 3$).
- C Representative *netrin-3* and *netrin-1* mRNA detection, using RNAScope on SCLC paraffin-embedded tumor sections. Negative control DAPB, positive control PPIB. Each brown dot is a unique molecule of mRNA of each targeted gene ($n = 10$, scale bars 20 μm).
- D Quantification of *netrin-3* and *netrin-1* expression in human SCLC paraffin-embedded tumor sections (High $\geq 50\%$ marked cells; Low $\leq 5\%$).

siRNA in two SCLC cell lines, indicating that these transcription factors directly regulate the *netrin-3* transcript (Fig 5C).

Novel tumor growth-promoting activity by netrin-3

Since *netrin-1* has been shown to promote tumor progression in various cancer indications due to its ability to block DCC and UNC5B-induced cell death, and since our current data show that in NB and SCLC tumors, *netrin-3* is upregulated rather than *netrin-1*, we first investigated whether *netrin-3* could bind to *netrin-1* receptors. Data previously reported suggested that *netrin-3* could interact with *netrin-1* receptors (Wang *et al.*, 1999). To extend this analysis, we conducted bio-layer interferometry assays (Fig 6A). Attempts to

produce recombinant human *netrin-3* were unsuccessful due to a non-soluble production of h-*netrin-3* and prompted us to use chicken *netrin-2L*, which is phylogenetically considered as the ortholog of mammalian *netrin-3*. As shown in Fig 6A and B, *netrin-2L*-like (NTN2L) was able to bind to UNC5-B and UNC5-C with a Kd similar to *netrin-1*, whereas it interacted with lower affinity with DCC, UNC5A, and Neogenin.

In an effort to analyze the function of *netrin-3* in cancer cells, we first silenced *netrin-3* and CRISPR/Cas-9 in NCI-H82 SCLC cells, using three different guide RNAs and isolated three polyclonal cell lines devoid of *netrin-3* expression (Fig 6C). In this cell line and in the NCI-H82 KO polyclones, DCC was not detected. Interestingly, an increase in the level of UNC5B receptor was detected. This may

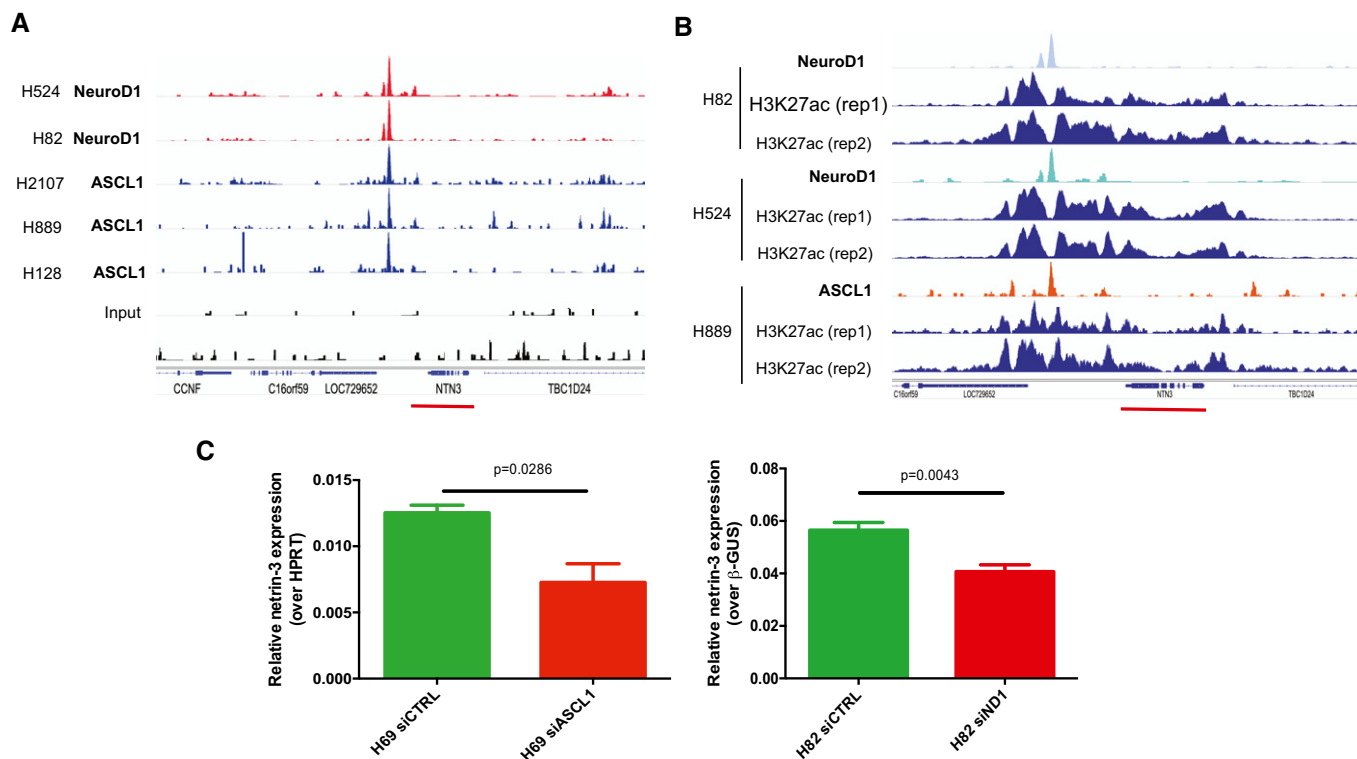


Figure 5. Netrin-3 is a target gene of NeuroD1 and ASCL1 in SCLC.

A ChIP-seq analysis of NeuroD1 and ASCL-1 binding on the *netrin-3* gene promoter. A major binding site was detected (red and blue peaks for NeuroD1 and ASCL1, respectively). Input controls are shown below (black).
 B ChIP-seq analysis of NeuroD1 and ASCL-1 chromatin enrichment, which was associated with broad H3K27ac-enriched regions at the *netrin-3* locus (red line), indicating a transcriptionally active region in SCLC cell lines (rep = experimental replicates).
 C QRT-PCR analysis of *netrin-3* gene expression in NCI-H82 ($n = 6$) and NCI-H69 ($n = 4$) SCLC cell lines after NeuroD-1 and ASCL-1 silencing by siRNAs (*U*-test). Error bars indicate s.e.m.

imply that UNC5B is internalized when bound to netrin-3 as formerly described for DCC when bound to netrin-1 (Bin *et al*, 2015). *In vitro*, these netrin-3 KO cells did not behave differently than control cells in terms of proliferation or cell death similarly to results obtained with siRNAs (Fig EV5A). To determine whether netrin-3 had a function in tumor formation, we engrafted these cell lines in immunodeficient mice. As shown in Fig 6D, cell populations silenced for netrin-3 expression showed a strong decrease in tumor onset, supporting a role for netrin-3 in tumor development. Similar data were observed with the NCI-H69 cell line (Fig 6E and F).

Netrin-3 as a therapeutic target in SCLC

Having demonstrated that netrin-3 was upregulated in two subtypes of neuroectodermal tumors, where it potentially promotes tumor development, we next sought to study its relevance as a therapeutic target. Of interest, a therapeutic anti-netrin-1 mAb, called NP137, was recently developed and is currently being tested in clinical phase 1 and 2 trials in patients harboring tumoral netrin-1 expression (Cassier *et al*, 2019). Netrin-1 and netrin-3 are 75% homologous in terms of protein conservation, and this homology reaches 90.1% for the epitope region recognized by the NP137 (Figs 7A and

EV5B). To investigate whether this similarity is sufficient to allow NP137 to bind to netrin-3, we tested the binding of NP137 on recombinant chicken netrin-2 (rchNTNT2) by bio-layer interferometry. As shown in Fig 7B, NP137 clearly bound netrin-2L within a similar range of affinity compared to netrin-1 (Kd rhNTN1: 0.96 ± 0.30 nM; Kd for rchNTN2: 1.53 ± 0.96 nM) (Figs 7B and EV5C). Moreover, using the netrin-1/UNC5B interaction as a positive control, we further showed that NP137 also inhibits the netrin-2L/UNC5B interaction in a dose-dependent manner (Fig 7C). Next, we assessed whether as observed for netrin-1-expressing cancer cells (Grandin *et al*, 2016), NP137 could affect netrin-3-expressing SCLC tumor cells. NCI-H82 cells were thus grafted in immunodeficient mice, which were then received systemic injections of NP137 once tumors had reached 100 mm^3 . As shown in Fig 7D, NP137 triggers a significant tumor growth inhibition and an enhanced mouse survival (Figs 7E and EV5D).

Similar data were observed with the NCI-H2286 cell line, highlighting netrin-3 as a potential therapeutic target (Fig EV5E). To decipher, the mechanism of action of the antibody targeting netrin-3 we conducted an immunohistological analysis of anti-netrin-treated NCI-H82 tumors, which revealed a significant increase of cleaved PARP staining (Figs 7F and EV5F). Interestingly, no significant modification of Ki67 is detected confirming chorioallantoic

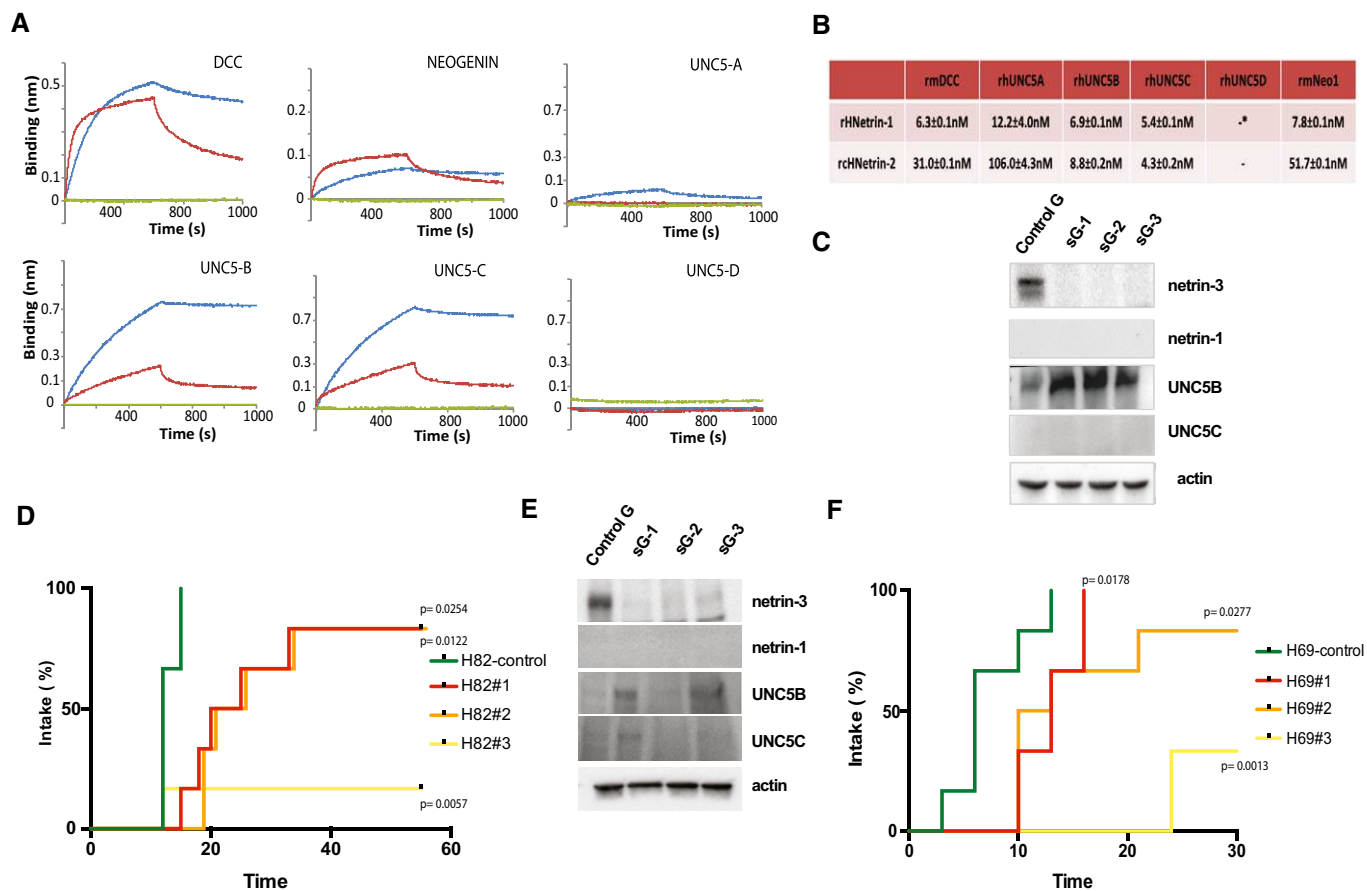


Figure 6. Tumor promoting role of netrin-3.

A Bio-layer interferometry analysis of netrin-2L/receptor interactions. Other members of the netrin family were also tested: netrin-1, netrin-4 and netrin-G2 (red: netrin-2L; blue: netrin-1; green netrin-4).

B Kd calculation after bio-layer interferometry analysis, * = no interaction detected.

C NCI-H82 CRISPR/Cas9 were subjected to immunoblots. sGx, designates the number of guide RNAs, control cells (sGc).

D Netrin-3 silencing delays or inhibits SCLC engraftment *in vivo*. NMRI *nude* mice were subcutaneously engrafted with either NCI-H82-CRISPR/cas9-NTN3 with three different guides RNAs (sG1 $P = 0.0022$; sG2 $P \leq 0.001$; and sG3 $P \leq 0.001$) or control cells (sGc) $n = 6$ /group. Positive tumor engraftment was reported when tumors reached 50 mm^3 (Mantel-Cox).

E NCI-H69-CRISPR/Cas9 were subjected to immunoblots. sGx designates the number of guide RNAs, control cells (sGc).

F NCI-H69-CRISPR/Cas9 cells presented in E. were subcutaneously engrafted with either NCI-H69- CRISPR/cas9-NTN3 with three different guide RNAs (sG1 $P = 0.017$; sG2 $P = 0.028$; and sG3 $P = 0.001$) or control cells (sGc) $n = 6$ /group. Positive tumor engraftment was reported when tumors reached 20 mm^3 (Mantel-Cox).

Source data are available online for this figure.

membrane experiments, further supporting the view that netrin-3 interference is *in vivo* associated with cancer cell death.

Discussion

In the present paper, we analyzed the expression and possible functions of netrin-3, an understudied protein in the field of oncology. We show that netrin-3 is selectively expressed in two neuroectodermal human cancer types, NB and SCLC. Its high level of expression and strong specificity to these two cancers, support a possible role for netrin-3 in these pathologies. Indeed, netrin-3 is highly expressed in high-grade compared to low-grade NBs, implying a strong correlation between netrin-3 expression and patient survival

at pathological stages and in all aggressive tumor types. Netrin-3 could thus emerge as a diagnostic marker, and owing to its secreted nature, this may provide promising opportunities for its routine detection in patient blood samples. Nevertheless, and in order to further assess netrin-3 levels in pre-clinical/clinical studies, a specific netrin-3 antibody is necessary for its immunohistochemical characterization, as we failed to validate the commercially available candidates we tested.

Importantly, we demonstrated that netrin-3 is also expressed in SCLC tumor cells, at least in part through the activities of ASCL1 and Neuro-D1 (Borromeo *et al*, 2016). Analyses of published ChIP-sequencing datasets of these transcription factors revealed that they are abundant on chromatin upstream of the *netrin-3* gene, which is correlated with high levels of epigenetic marks associated with

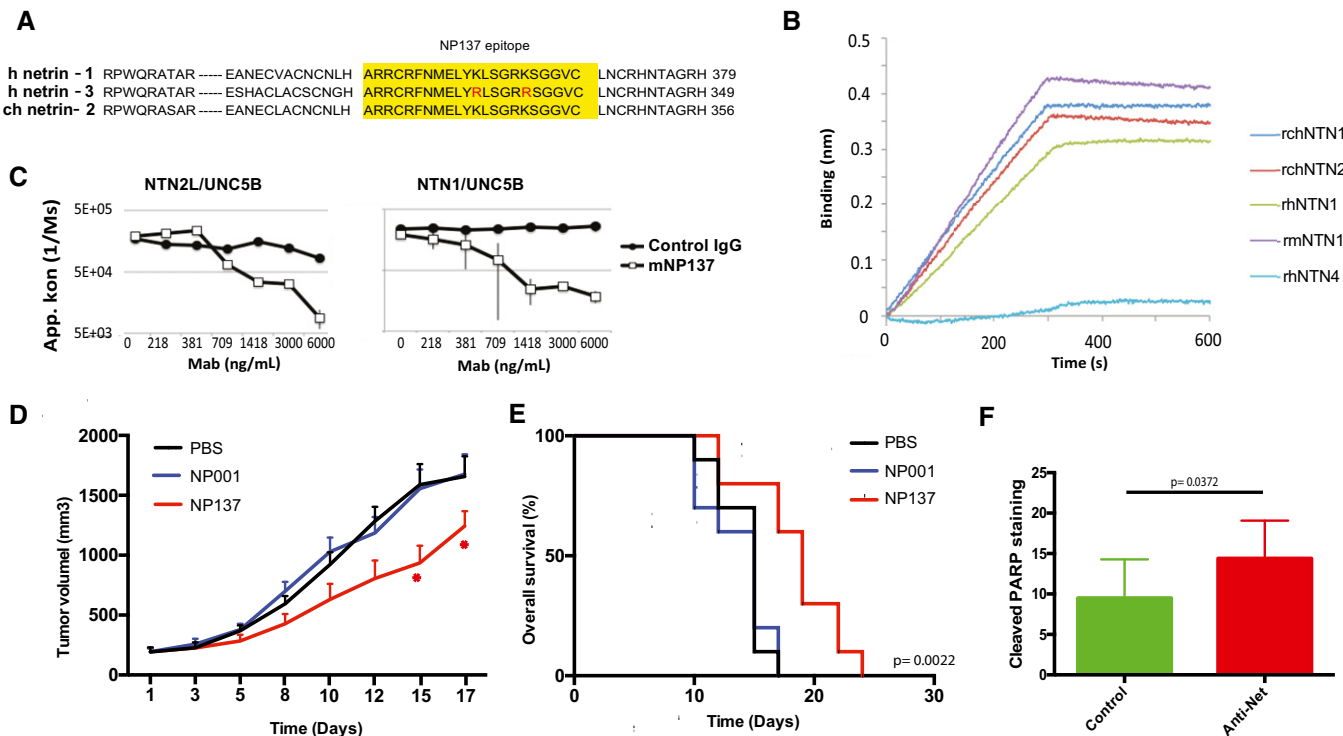


Figure 7. Netrin-3 is a therapeutic target in SCLC.

A Analysis of the NP137 antibody (anti-netrin-1) epitope across netrin family members.
 B Analysis of NP137 binding on netrin-2L, netrin-1; netrin-4 or netrin-G2 by bio-layer interferometry assays. Kd rhNTN1: 0.96 ± 0.30 nM; Kd for rchNTN2: 1.53 ± 0.96 nM.
 C NP137 inhibits NTN1/UNC5B or NTN-2L/UNC5B interaction, detected by Elisa assays. Here the recombinant proteins are the murine forms (Control IgG = mouse IgG2A, mNP137 = murine Fc, UNCB = rat UN5H2) bars indicate SD, $n = 3$.
 D NMRI *nude* mice were engrafted with NCI-H82 cells by subcutaneous injection of 2 million cells. When the mean tumor volume reached approximately 80 mm^3 , animals were treated $3 \times \text{time/week}$ by intra-abdominal injection of PBS; NP001 (Human IgG1, isotype); NP137 (anti-netrin1/3) during 20 days. $n = 10$ animals/group ($*P < 0.05$, two-way ANOVA, error bars indicate s.e.m.).
 E NP137 enhances survival of mice engrafted with NCI-H82 cell line (see D). Analysis of Kaplan–Meier survival curves of mice treated or not with NP137. Mantel–Cox test; $n = 10$ animals/group.
 F Quantification of cell death (cleaved PARP) in H82-treated tumors in D. Tumors were analyzed 7 days after the first treatment (i.e., 400 mm^3 ; $n = 3/\text{group}$. U-test, bars indicate SD).

active enhancers (H3K27ac and, when data available, H3K4me1). Netrin-3 was also expressed in NB, and we determined *in vitro* that the driver of NB, namely MYCN, was bound upstream of the netrin-3 gene. Similarly to ASCL1 and Neuro-D1 in ASCL, this was correlated with high levels of active enhancer epigenetic marks (H3K27ac, H3K4me1). H3K4me3 formed a peak at the *netrin-3* promoter in MYCN-positive NB cell lines, supporting the view that *netrin-3* is a constitutively transcribed gene in these cells, potentially associated with cell identity (Benayoun *et al*, 2015).

Small cell lung cancer is generally regarded as highly aggressive and treatment options remain limited (Polley *et al*, 2016; Antonia *et al*, 2016). Our present data using genetic silencing or protein titration support the view that targeting netrin-3 may offer promising perspectives for SCLC patients. Of interest, there is currently a candidate drug tested in clinics with excellent safety data (Cassier *et al*, 2019), that we show here to interact with netrin-3 with an affinity in the nanomolar range by inhibiting netrin-3/receptor interactions. We present evidence that inhibiting netrin-3/receptor

interactions with NP137 is associated with tumor growth inhibition in SCLC pre-clinical models. Future works should further explore whether NP137 could be an attractive treatment for SCLC as monotherapy or in combination with chemotherapies and immunotherapies.

Our study raised several puzzling issues, including the apparent mutually exclusive expression of netrin-1 and netrin-3, and the restricted expression of netrin-3 to NB and SCLC, while netrin-1 expression is displayed by most cancer indications. In terms of biological evolution, these proteins have conserved a strong structural homology, and our data together with previous findings suggest that netrin-3 binds to the same receptors as netrin-1, thus functionally mimicking netrin-1 in particular in NB (Delloye-Bourgeois *et al*, 2009). Preliminary data from our laboratory consistently show that netrin-3 can block cell death induced by the dependence receptor UNC5B. However, both expression in tumors and during embryonic development seems to be completely different. *Netrin-1* silencing in mice is associated with embryonic lethality and major

nervous system defects (Bin *et al*, 2015), whereas netrin-3 expression appears to be restricted to the peripheral nervous system (Wang *et al*, 1999). Yet, the specific expression of netrin-3 in neuroepithelial tumors, which may indicate lineage specificity, may also provide important tools in terms of diagnosis. Future work should investigate whether blood/urine detection of netrin-3 could represent an original predictor of SCLC, for which there is a clear clinical unmet need.

Materials and Methods

Human tumor samples

Patients or their legal guardians signed a written informed consent agreeing on the use of tumor samples for research, according to the French regulations on the protection of persons (French Ethics Committee). Human NB samples were collected from a cohort of 181 patients staged in accordance with the International Neuroblastoma Staging System (Gibert *et al*, 2014). Material was collected by the Institut Gustave Roussy (Villejuif, France). Human SCLC tumors were collected by the Biobank Tissue unit, Pasteur Hospital (Nice, France). Informed consent was obtained from all subjects, and the experiments conformed to the principles set out in the WMA Declaration of Helsinki and the Department of Health and Human Services Belmont Report. Following patient agreement, primary tumors were obtained, either by biopsy or after surgery, and were directly frozen before storage.

Mouse experiments and pathology

Animals were maintained in a specific pathogen-free animal facility (Anican, Lyon—France) and stored in sterilized filter-topped cages. Mice were handled in agreement with the institutional recommendations and procedures approved by the animal care committee (Comité d'Evaluation Commun au Centre Léon Bérard, à l'Animalerie de transit de l'ENS, au PBES et au laboratoire P4; CECCAP). Seven-week-old (20–22 g body weight) female NMRI mice were obtained from Janvier Labs (Saint Berthevin—France) (Delloye-Bourgeois *et al*, 2013). The animals were housed in standard cages (five animals/cage) with litter and food. Enrichment was achieved by adding cotton for nesting.

Generation of stable netrin-3 knocked out cell line

Different small guide RNAs (sgRNA) were designed using the sgRNA designer tool (CRISPRi), (<https://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgRNA-design-crisprai>). The sequences are as follows: sg1: 5'-CCGCCCTCGCTGCAGCCGGG-3'; sg2: 5'-CGCCCACGGCCCTTCCCGGG-3'; sg3: 5'-TCGCTGCAGCCGGGAGGAGG-3'.

The Esp3I linker was added to sgRNAs, and the oligonucleotides were 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 (Addgene #71236) (Thakore *et al*, 2015). Insertion of sgRNA was confirmed by sequencing. The use of pLV hU6-sgRNA hUbc-dCas9-KRAB-T2a-Puro, which is constructed around a 3rd generation lentiviral backbone, allows for the simultaneous expression of Cas9 and gRNA and for selection for puromycin resistance. Resulting

plasmids were used to produce lentiviruses to further infect cell lines of interest. Lentiviral vectors were a generous gift from Carine Maisse (INRA, UMR754, Lyon, France).

Lentiviral transduction

Production of VSV-g pseudotyped lentivirus was made by co-transfecting 70–80% confluent 293FT cells (gift from Dr Fabrice Laval, CRCL) with lentiviral vectors described in 1) and 2) plus pCMV-dR8.91 and pCMV-VSV-g plasmids using Lipofectamine 3000 in OptiMEM medium + GlutaMAX supplemented with 1 mM Sodium Pyruvate and 5% FBS. Transfection medium was replaced 6 h later by OptiMEM + Pyruvate + 5% FBS. Lentiviral supernatant was harvested 48 h later, filtered through a 0.45- μ m 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 the presence of 10 μ g/ml polybrene. 24 h later, viral supernatant was discarded and cells were cultured in their normal culture medium supplemented with puromycin for one week.

Cell culture

NCI-H82 and NCI-H69 were obtained from ATCC and cultured in RPMI 1640 Medium (ATCC 30-2001) adding fetal bovine serum (FBS, ATCC 30-2020) to a final concentration of 10% and 1% penicillin/streptomycin (P/S). NCI-H2286 was obtained from ATCC and cultured in DMEM: F12 Medium (Catalog No.30-2006) adding 0.005 mg/ml Insulin, 0.01 mg/ml Transferrin, 30 nM Sodium selenite (final concentration), 5% FBS and 1% P/S. HeLa cells were obtained from our lab and cultured in DMEM with 10% FBS and 1% P/S. All cells were tested for mycoplasma contamination.

Quantitative RT-PCR

Tumor cells, patient samples, or xenografts were disrupted with MagNALyser kit (Roche Applied Science). Total RNAs of either cell lines or tumors were extracted by using NucleoSpin[®] RNAII Kit (Macherey Nagel) according to the manufacturer's protocol. RT-PCR reactions were performed with iScript cDNA Synthesis Kit (BIO-RAD). One microgram total RNA was reverse transcribed by using the following program: 25°C for 5 min, 42°C for 30 min, and 85°C for 5 min. Real-time quantitative RT-PCR was performed with a LightCycler 96 apparatus (Roche) using LightCycler[®] TaqMan[®] Master kit (Roche, Basel, Switzerland). Expression of target genes was normalized to hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), and beta-glucuronidase (GUSB) using the comparative CT method.

Relative expression of each gene was calculated according to the comparative 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} quantification method in which Δ Ct = Ct (Sample) - Ct (Normalizer) and $\Delta\Delta$ Ct = Δ Ct (Sample) - Δ Ct (Calibrator).

hASCL1 F (probe 38) CGACTTCACCAACTGGTTCTG; hASCL1 R (probe 38) ATGCAGGTTGTGCGATCA; hMYCN F (probe 38) TAATATGCCCGGGGACT; hMYCN R (probe 38) GGGCTGGAACTGGCTTTT; hNeuroD1 F (probe 30) CTGCTCAAGGACTACTAA CAACAA; hNeuroD1 R (probe 30) GTCCAGCTTGAGGACTT; hNTN3 F (probe 56) GCCCTGTGTTAAGACCCCTA, hNTN3 RR (probe 56) TGCAGTGCAGTCACAGTC; hNTN1 F (probe 3) AAAA GTACTGCAAGAAGGACTATGC; hNTN1 R (probe 3) CCCTGCTTA

TACACGGAGATG; hHPRT F (probe 73) TGACCTTGATTTATTTTC CATAACC; hHPRT R (probe 73) CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT; hGUS F (probe 57) CGCCCTGCCTATCTGTATTC; hGUS R (probe 57) TCCCCACAGGGAGTGTGTAG.

Bio-layer interferometry

BLI experiments were performed using The OctetRED96 system. All interactions were analyzed at 30°C with constant shaking at 1,000 rpm in PBS, 0.02% Tween-20, 0.1% BSA (binding buffer: BB). To determine the affinity between hNetrin-1 or chNetrin-2 with the extra-cellular domain (ECD) of hUNC5H1, rUNC5H2, hUNC5H3, and hUNC5H4, netrin-1 or netrin-2-coated-HIS1K biosensors were incubated with an increasing concentration series of ECDs (3.12 nM, 6.25 nM, 12.5 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM) and binding was observed for 5 min at 30°C. Biosensors were then incubated in BB for a further 5 min to observe dissociation of the complex. To determine the affinity between h-netrin-1 or ch-netrin-2 with the extra-cellular domain (ECD) of mNeogenin and mDCC, ECDs-coated-AHC biosensors were incubated with a concentration series of hNetrin-1 or chNetrin-2 (3.12 nM, 6.25 nM, 12.5 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM). In this assay, 1 µg/ml Dextran 5,000 was added to BB to prevent non-specific binding of the netrins to the biosensors. Association and dissociation were monitored as described above. To determine the affinity of the human anti-netrin NP137 antibody for h-netrin-1 and ch-netrin2, Netrin-1 or Netrin-2-coated-HIS1K biosensors were incubated with an increasing concentration series of NP137 (1 nM, 2 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM, 50 nM, 100 nM) and association was observed for 5 min at 30°C. Biosensors were then incubated in BB for a further 5 min to observe dissociation of the complex. To determine the ability of the anti-netrin antibody to antagonize the binding of h-netrin-1 and ch-netrin-2 with UNC5H2, the ECD of UNC5H2 was captured on AHC biosensors, incubated with 25 nM of netrin-1 or netrin-2L in presence of various concentrations of either the murine anti-netrin antibody or an isotype control (64 pM, 320 pM, 1.6 nM, 8 nM, 40 nM). The association was observed for 5 min at 30°C to evaluate k_{on} . Binding kinetics were evaluated with ForteBio Octet RED Evaluation software 6.1 using a 1:1 binding model to derive k_{on} , k_{off} , and KD values.

Western blot

Cells were harvested and lysed in SDS buffer (5% SDS, 10% Glycerol, 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 1% Triton X-100, 0.1 M DTT) and then sonicated using a Branson Digital sonifier 450 for 20 pulses (50% amplitude, pulse on 0.2 s, pulse off 1.0 s). Protein concentration was measured with the 660 nm Protein assay kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) using bovine serum albumin (BSA) as a standard curve according to manufacturer's instructions. Protein extracts (20–50 mg per lane) were loaded onto 4%–15% SDS-polyacrylamide gels (Bio-Rad) and transferred onto nitrocellulose membranes using Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad). Membranes were blocked with 5% skimmed milk in PBS/0.1% Tween-20 (PBS-T) for 1 h and then incubated overnight with primary antibody: 1:1,000 dilution for anti-netrin-1 (Abcam, anti-NTN1 ab126729), 1:500 dilution for anti-netrin-3 Abcam (anti-NTN3 ab185200),

After three washes with PBS-T, membranes were incubated with the appropriate HRP-conjugated secondary (1:5000 dilution)

antibody for 1 h at room temperature. Detection was performed using West Dura Chemiluminescence System (Pierce). Membranes were imaged on the ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad).

Human histopathology

For histological examination, tissue samples were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin (FFPE) (see Supplementary Materials section). 4-µm-thick FFPE tissue sections were prepared according to conventional procedures. Sections were then stained with hematoxylin/eosin and examined under a light microscope. mRNA ISH was performed using the RNAscope 2.5 VS Reagent kit—BROWN with a custom designed netrin-3 probe (Advanced Cell Diagnostic, Hayward, CA) according to the manufacturer's guidelines. The RNAscope procedure was performed using the Discovery XT autostainer with mRNA amplification, pretreatment & DAB PTO kit (Roche, Meylan, France). Tissue control was assessed by performing RNAscope analysis of common housekeeping genes PPIB and DAPB, as a negative control. Finally, sections were scanned with panoramic scan II (3DHitech, Budapest, Hungary) at 40× and Z-stacked (3 sections at 0.6 µm intervals).

10-µm-thick cryosections were obtained from tissues and stored at –80°C. Frozen tissue slides were immersed in 4% formalin for 1 h and then rinsed in PBS. Tissues were dehydrated in increasing percentages of alcohol and air-dried.

The mRNA ISH was performed using the RNAscope 2.5 VS reagent kit brown with custom designed netrin-3 probes (Advanced Cell Diagnostic, Hayward, CA) according to the manufacturer's instructions. The RNAscope procedure was performed in the Discovery XT autostainer with mRNA amplification, pretreatment and DAB PTO kit (Roche, Meylan, France), without steps of deparaffinization and HIER. Tissue control was assessed by performing RNAscope analysis of a common housekeeping gene PPIB. Finally, sections were scanned with panoramic scan II (3DHitech, Budapest, Hungary) at 40× and Zstack (3 levels spaced of 0.6 µm).

ChIP-seq analysis

NeuroD1 ChIP-seq peaks in NCI-H524 and NCI-H82 cells, ASCL1 ChIP-seq peaks in H2107, NCI-H889, and NCI-H128 cells, and the corresponding input controls for NCI-H524 and NCI-H889 cells, were downloaded from NCBI GEO dataset GSE69398 (PMID: 27452466) and GSM1700637; GSM894066; GSM894072; GSM894100; GSM89409; GSM1700641; GSM1526706; GSM1526702 and analyzed using IGV software. NeuroD1 and ASCL1 ChIP-seq data were downloaded from NCBI GEO dataset GSE69398 (PMID: 27452466). All H3K27ac datasets were downloaded from GSE115123 (PMID: 29945888). Data were analyzed using IGV software.

All neuroblastoma ChIP-seq tracks were downloaded from NCBI GEO dataset GSE138315 (bioRxiv 829754; <https://doi.org/10.1101/829754>), GSM2113521, GSM2127461, GSM1680108. Data analyzed using IGV software.

Cell death and proliferation assays

Apoptosis was monitored by measuring caspase-3 activity as described previously [18] using Caspase 3/CPP32 Fluorometric

The paper explained**Problem**

Small cell lung cancer (SCLC) is the deadliest histological subtype of lung cancers, associated with high rates of metastatic disease at diagnosis. Some drugs including immunotherapy have recently been tested in the clinic for this indication but have failed to provide benefits for a majority of patients.

Results

The tumoral expression of netrin-3 is restricted to SCLC and neuroblastoma (NB). Surprisingly, netrin-1 and netrin-3 have mutually exclusive expressions. Netrin-3 is correlated with patient overall survival and poor prognosis in human NB, which is associated with the MYCN oncogene amplification. Expression of netrin-3 in SCLC is proposed to be at least in part controlled by the ASCL-1 and NeuroD1 transcription factors. In addition, systemic administration of the NP137 monoclonal antibody, originally designed against netrin-1, decreases tumor growth in animal models.

Impact

Netrin-3 was targeted by the anti-netrin-1 antibody, which is already used in the clinic, and could thus represent new therapeutic opportunities.

Assay Kit (Gentaur Biovision, Brussel, Belgium) 24 h after transfection with siRNAs.

For proliferation assays, 10^5 cells were seeded onto a 96-well plate. After 24 h, 20 μ l of CellTiter96[®]Aqueous One Solution Reagent was added to each well containing 100 μ l of culture medium. The plate was then incubated at 37°C for 2 h in a humidified, 5% CO₂ atmosphere. Absorbance at 490 nm was recorded using a TECAN-infinite m1000.

CAM, mouse experiments, and pathology

The chorioallantoic membrane (CAM) of chicken embryos is a well-described model to study tumor progression (Stupack *et al*, 2006; Berthenet *et al*, 2020). The fertilized eggs were obtained from a producer (EARL Les Bruyères, Dangers, France). They were kept in specific incubators. IGR-N91 and IMR32 cells (15 and 10 million) were xenografted on the CAM of ten-day-old chick embryos with Matrigel (100 μ l/tumor) at day 10. Seventeen-day-old chick embryos were then analyzed for primary tumor size as previously described (Gibert *et al*, 2014).

For the engraftment experiments, mice were implanted with either NCI-H82 or NCI-H69 SCLC cells; control or CRISPR-netrin-3 #1, #2, #3, by subcutaneous injection of 10^6 cells in 100 μ l of PBS (and 100 μ l of Matrigel) into the right flank of mice. Tumor volume was calculated with the formula $V = (\text{length} \times \text{width}^2)/2$. A positive tumor catch is declared when the tumor reaches 50 mm³ for NCI-H82 and 20 mm³ for NCI-H69.

Mice were implanted with either NCI-H82 or NCI-H69 SCLC cells and NCI-H2286 mix cell line, by subcutaneous injection of 10^6 cells in 100 μ l of PBS into the right flank. Mice were treated with either PBS, NP001 (isotype control human IgG1) or NP137 (anti-Netrin-1/3, human IgG1) by *i.v.* injection at 10 mg/kg twice a week during 3 weeks, once tumors were established at a volume close to 100 mm³ after external quantification using calipers. Tumor volume was calculated with the formula $V = (\text{length} \times \text{width}^2)/2$. At the end of

the treatment, tumors were harvested and embedded in paraffin, then sectioned into 10- μ m slices. Tumor histology was studied after hematoxylin-Phloxine B-saffron, Ki67, cleaved caspase-3, and cleaved PARP staining's of tumor slides at the Pathology-Research Platform (Lyon-France).

Statistical analyses

Quantitative reverse-transcriptase PCR (qRT-PCR) and RNA-sequencing data analyses were performed using the GraphPad Prism (San Diego, California) and R software (free software foundation, University of Auckland, New Zealand) to generate heat maps. Unpaired Student's *t*-test with Welch correction was used to compare the different groups. Cohorts were separated based on median netrin-3 expression. Survival curves were produced according to the Kaplan–Meier method on the GraphPad software. Data were analyzed with a Mantel–Cox test. *n* defines the total replicates. All statistical tests were two-sided.

Data availability

This study includes no data deposited in external repositories.

Expanded View for this article is available online.

Acknowledgements

We thank Brigitte Manship for proofreading the manuscript and Robert Dante and Arnaud Augert for helpful discussions. This work was supported by institutional grants from University of Lyon (PM), Centre Léon Bérard (PM), INSERM (PM), and CNRS (PM, BG). This work was also supported by grants from Fondation ARC for young investigators (BG), and from the Ligue Contre le Cancer (PM), INCA (PM). SJ was supported by a LabEx DEVweCAN fellowship, and MR was supported by la Ligue Contre le Cancer fellowship.

Author contributions

SJ, MR, SB, MH, BD, JGD, and ARR performed the cell experiments and *in vitro* data. SJ, MSA, MR, and DN performed mice experiments. MR, MH, and SB performed CAM experiments. AM and DG produced the lentiviruses and CRISPR cell lines; NG made anatomopathological analysis; PV, MSi, and PMu performed methylation data and promoter analysis. NR, PS, TW, BG, and SOC performed bioinformatical analysis; PH, IJL, VC, and CHG provided human samples and cell lines. PMe and BG designed the research and wrote the paper.

Conflict of interest

BD, DN, DG, and PM declare to have a conflict of interest as respectively employees (BD, DN, and DG) and shareholders (PM) of Netris Pharma.

References

- Ambros IM, Benard J, Boavida M, Bown N, Caron H, Combaret V, Couturier J, Darnfors C, Delattre O, Freeman-Edward J *et al* (2003) Quality assessment of genetic markers used for therapy stratification. *J Clin Oncol* 21: 2077–2084
- Antonia SJ, López-Martin JA, Bendell J, Ott PA, Taylor M, Eder JP, Jäger D, Pietanza MC, Le DT, de Braud F *et al* (2016) Nivolumab alone and nivolumab plus ipilimumab in recurrent small-cell lung cancer

- (CheckMate 032): a multicentre, open-label, phase 1/2 trial. *Lancet Oncol* 17: 883–895
- Augert A, Mathysaraja H, Ibrahim AH, Freie B, Geuenich MJ, Cheng P-F, Alibeckoff SP, Wu N, Hiatt JB, Basom R et al (2020) MAX functions as a tumor suppressor and rewires metabolism in small cell lung cancer. *Cancer Cell* 38: 97–114.e7
- Benayoun BA, Pollina EA, Ucar D, Mahmoudi S, Karra K, Wong ED, Devarajan K, Daugherty AC, Kundaje AB, Mancini E et al (2015) H3K4me3 breadth is linked to cell identity and transcriptional consistency. *Cell* 163: 1281–1286
- Berthet K, Castillo Ferrer C, Fanfone D, Popgeorgiev N, Neves D, Bertolino P, Gibert B, Hernandez-Vargas H, Ichim G (2020) Failed apoptosis enhances melanoma cancer cell aggressiveness. *Cell Rep* 31: 107731
- Bin JM, Han D, Lai Wing Sun K, Croteau L-P, Dumontier E, Cloutier J-F, Kania A, Kennedy TE (2015) Complete loss of netrin-1 results in embryonic lethality and severe axon guidance defects without increased neural cell death. *Cell Rep* 12: 1099–1106
- Borromeo MD, Savage TK, Kollipara RK, He M, Augustyn A, Osborne JK, Girard L, Minna JD, Gazdar AF, Cobb MH et al (2016) ASCL1 and NEUROD1 reveal heterogeneity in pulmonary neuroendocrine tumors and regulate distinct genetic programs. *Cell Rep* 16: 1259–1272
- Cassier P, Eberst L, Garin G, Courbebaisse Y, Terret C, Robert M, Frenel J-S, Depil S, Delord J-P, Perol D et al (2019) 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* 30: v159
- Chang X, Bakay M, Liu Y, Glessner J, Rathi KS, Hou C, Qu H, Vaksman Z, Nguyen K, Sleiman PMA et al (2020) Mitochondrial DNA haplogroups and susceptibility to neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst* 112: 1259–1266
- Delloye-Bourgeois C, Fitamant J, Paradisi A, Cappellen D, Douc-Rasy S, Raquin M-A, Stupack D, Nakagawara A, Rousseau R, Combaret V et al (2009) Netrin-1 acts as a survival factor for aggressive neuroblastoma. *J Exp Med* 206: 833–847
- Delloye-Bourgeois C, Gibert B, Rama N, Delcros J-G, Gadot N, Scoazec J-Y, Krauss R, Bernet A, Mehlen P (2013) Sonic Hedgehog promotes tumor cell survival by inhibiting CDON pro-apoptotic activity. *PLoS Biol* 11: e1001623
- Gibert B, Delloye-Bourgeois C, Gattoliat C-H, Meurette O, Le Guernevel S, Fombonne J, Ducarouge B, Laval F, Bouhallier F, Creveaux M et al (2014) Regulation by miR181 family of the dependence receptor CDON tumor suppressive activity in neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst* 106: dju318
- van Gils JM, Derby MC, Fernandes LR, Ramkhalawon B, Ray TD, Rayner KJ, Parathath S, Distel E, Feig JL, Alvarez-Leite JJ et al (2012) The neuroimmune guidance cue netrin-1 promotes atherosclerosis by inhibiting the emigration of macrophages from plaques. *Nat Immunol* 13: 136–143
- Grandin M, Meier M, Delcros JG, Nikodemus D, Reuten R, Patel TR, Goldschneider D, Orriss G, Krahn N, Boussouar A et al (2016) Structural decoding of the netrin-1/UNC5 interaction and its therapeutical implications in cancers. *Cancer Cell* 29: 173–185
- Huang Y-H, Klingbeil O, He X-Y, Wu XS, Arun G, Lu B, Somerville TDD, Milazzo JP, Wilkinson JE, Demerdash OE et al (2018) POU2F3 is a master regulator of a tuft cell-like variant of small cell lung cancer. *Genes Dev* 32: 915–928
- Klijn C, Durinck S, Stawiski EW, Haverty PM, Jiang Z, Liu H, Degenhardt J, Mayba O, Gnad F, Liu J et al (2015) A comprehensive transcriptional portrait of human cancer cell lines. *Nat Biotechnol* 33: 306–312
- Ko J, Winslow MM, Sage J (2021) Mechanisms of small cell lung cancer metastasis. *EMBO Mol Med* 13: e13122
- Matthay KK, Maris JM, Schliermacher G, Nakagawara A, Mackall CL, Diller L, Weiss WA (2016) Neuroblastoma. *Nat Rev Dis Primers* 2: 16078
- Mehlen P, Delloye-Bourgeois C, Chédotal A (2011) Novel roles for Slits and netrins: axon guidance cues as anticancer targets? *Nat Rev Cancer* 11: 188–197
- Mohlin S, Hansson K, Radke K, Martinez S, Blanco-Apiricio C, Garcia-Ruiz C, Welinder C, Esfandyari J, O'Neill M, Pastor J et al (2019) Anti-tumor effects of PIM / PI 3K/ mTOR triple kinase inhibitor IBL -302 in neuroblastoma. *EMBO Mol Med* 11: e11749
- Paradisi A, Creveaux M, Gibert B, Devailly G, Redoulez E, Neves D, Cleysac E, Treilleux I, Klein C, Niederfellner G et al (2013) Combining chemotherapeutic agents and netrin-1 interference potentiates cancer cell death. *EMBO Mol Med* 5: 1821–1834
- Polley E, Kunkel M, Evans D, Silvers T, Delosh R, Laudeman J, Ogle C, Reinhart R, Selby M, Connelly J et al (2016) Small cell lung cancer screen of oncology drugs, investigational agents, and gene and microRNA expression. *J Natl Cancer Inst* 108: djw122
- Pugh TJ, Morozova O, Attiyeh EF, Asgharzadeh S, Wei JS, Auclair D, Carter SL, Cibulskis K, Hanna M, Kiezun A et al (2013) The genetic landscape of high-risk neuroblastoma. *Nat Genet* 45: 279–284
- Rada-Iglesias A, Bajpai R, Swigut T, Brugmann SA, Flynn RA, Wysocka J (2011) A unique chromatin signature uncovers early developmental enhancers in humans. *Nature* 470: 279–283
- Ramkhalawon B, Hennessy EJ, Ménager M, Ray TD, Sheedy FJ, Hutchison S, Wanschel A, Oldebeken S, Geoffrion M, Spiro W et al (2014) Netrin-1 promotes adipose tissue macrophage retention and insulin resistance in obesity. *Nat Med* 20: 377–384
- Renders S, Svendsen AF, Panten J, Rama N, Maryanovich M, Sommerkamp P, Ladel L, Redavid AR, Gibert B, Lazare S et al (2021) Niche derived netrin-1 regulates hematopoietic stem cell dormancy via its receptor neogenin-1. *Nat Commun* 12: 608
- Rickman DS, Schulte JH, Eilers M (2018) The expanding world of N-MYC-driven tumors. *Cancer Discov* 8: 150–163
- Rindi G, Klimstra DS, Abedi-Ardekani B, Asa SL, Bosman FT, Brambilla E, Busam KJ, de Krijger RR, Dietel M, El-Naggar AK et al (2018) A common classification framework for neuroendocrine neoplasms: an International Agency for Research on Cancer (IARC) and World Health Organization (WHO) expert consensus proposal. *Mod Pathol* 31: 1770–1786
- Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, Mesirov JP (2011) Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* 29: 24–26
- Rudin CM, Poirier JT, Byers LA, Dive C, Dowlati A, George J, Heymach JV, Johnson JE, Lehman JM, MacPherson D et al (2019) Molecular subtypes of small cell lung cancer: a synthesis of human and mouse model data. *Nat Rev Cancer* 19: 289–297
- Stoeckli ET (2018) Understanding axon guidance: are we nearly there yet? *Development* 145: dev151415
- Stupack DG, Teitz T, Potter MD, Mikolon D, Houghton PJ, Kidd VJ, Lahti JM, Cheresch DA (2006) Potentiation of neuroblastoma metastasis by loss of caspase-8. *Nature* 439: 95–99
- Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES et al (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 15545–15550
- Thakore PI, D'ippolito AM, Song L, Safi A, Shivakumar NK, Kabadi AM, Reddy TE, Crawford GE, Gersbach CA (2015) Highly specific epigenome editing by CRISPR-Cas9 repressors for silencing of distal regulatory elements. *Nat Methods* 12: 1143–1149

Upton K, Modi A, Patel K, Kendsersky NM, Conkrite KL, Sussman RT, Way GP, Adams RN, Sacks GI, Fortina P *et al* (2020) Epigenomic profiling of neuroblastoma cell lines. *Sci Data* 7: 116

Wang H, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Tessier-Lavigne M (1999) Netrin-3, a mouse homolog of human NTN2L, is highly expressed in sensory ganglia and shows differential binding to netrin receptors. *J Neurosci* 19: 4938–4947

Zeid R, Lawlor MA, Poon E, Reyes JM, Fulciniti M, Lopez MA, Scott TG, Nabet B, Erb MA, Winter GE *et al* (2018) Enhancer invasion shapes MYCN-dependent transcriptional amplification in neuroblastoma. *Nat Genet* 50: 515–523

Zhang W, Yu Y, Hertwig F, Thierry-Mieg J, Zhang W, Thierry-Mieg D, Wang J, Furlanello C, Devanarayan V, Cheng J *et al* (2015) Comparison of RNA-seq and microarray-based models for clinical endpoint prediction. *Genome Biol* 16: 133



License: This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Annexe 2 : “Netrin signaling mediates survival of dormant epithelial ovarian cancer cells”

Pirunthan Perampalam, James I. MacDonald, Komila Zakirova, Daniel T. Passos, Sumaiyah Wasif, Yudith Ramos-Valdes, Maëva Hervieu, Patrick Mehlen, Rob Rottapel, Benjamin Gibert, Rohann Correa, Trevor G. Shepherd, Frederick A. Dick

***eLife* 12, RP91766 (2024)**

La dormance cellulaire constitue un défi majeur dans la recherche oncologique actuelle, nécessitant le développement de stratégies innovantes pour détecter et cibler les cellules cancéreuses en quiescence, souvent responsables des rechutes après un traitement anticancéreux initialement efficace. La détection clinique de la maladie dormante ou résiduelle reste particulièrement difficile, notamment dans les cas de métastases (Massagué & Ganesh, 2021). Cette difficulté a conduit à une intensification des recherches sur les cellules cancéreuses disséminées. La dormance cellulaire a été observée dans des cellules tumorales issues de divers sites primaires, tels que le sein, la prostate et le mélanome (Phan & Croucher, 2020; Sosa et al., 2014). Ces cellules disséminées se localisent fréquemment dans des niches spécifiques, comme les espaces périvasculaires ou la moelle osseuse. Elles adoptent un métabolisme catabolique et suspendent leur cycle cellulaire tout en conservant leur viabilité. Leur biologie est également caractérisée par des propriétés de cellules souches et des signes de transition épithélio-mésenchymateuse, ce qui leur permet de survivre lors de la dissémination et de demeurer inactives dans des tissus distants. Dans certains foyers tumoraux, cet état de dormance est associé à une diminution de la signalisation Ras-MAPK et une augmentation de l'activité de p38 (Sosa et al., 2014; Yeh & Ramaswamy, 2015). Pour concevoir des traitements ciblés contre les cellules dormantes, il est essentiel de mener une recherche approfondie sur les vulnérabilités spécifiques à cet état. À cet égard, le cancer ovarien séreux de haut grade, le sous-type le plus agressif de cancer de l'ovaire, se propage dans l'ascite – une accumulation anormale de liquide dans la cavité péritonéale – sous forme d'agrégats cellulaires en état de dormance (Correa et al., 2012). L'état non-prolifératif des cellules sphéroïdes confère une chimiorésistance et contribue à la récurrence de la maladie, soulignant ainsi l'importance de comprendre leur

biologie. Ce phénomène a été reproduit *in vitro* (Lengyel et al., 2014), avec des études montrant que l'activation des mécanismes de blocage du cycle cellulaire *via* DYRK1A, l'induction de l'autophagie, ainsi que l'augmentation de l'expression des protéines STAT3 et FAK jouent un rôle crucial. Ces résultats suggèrent que les sphéroïdes HGSOC constituent un modèle pertinent pour explorer les dépendances spécifiques à la survie des cellules dormantes.

Dans cette étude, nous avons utilisé un système de culture en suspension pour examiner les mécanismes de survie en dormance à l'aide de sphéroïdes HGSOC. Afin d'optimiser l'identification des pertes de gènes affectant la viabilité des cellules en état de dormance, nous avons développé une méthode innovante de criblage CRISPR à l'échelle du génome, appelée « GO-CRISPR ». Ce criblage a révélé que plusieurs récepteurs à la Nétrine-1, notamment DCC et les récepteurs de la famille UNC5, ainsi que des éléments de la voie de signalisation MAPK, jouent un rôle crucial dans la survie des cellules HGSOC en état de dormance. Une analyse transcriptionnelle des cellules sphéroïdes a également montré un enrichissement des composants de la signalisation des Nétrines par rapport aux cellules adhérentes. De plus, l'absence de la kinase de survie DYRK1A entraîne une perte des augmentations transcriptionnelles des Nétrines. Nous avons démontré que les Nétrines-1 et -3, les récepteurs UNC5, ainsi que la voie MEK-ERK sont essentiels à la survie des cellules en dormance. Il est important de souligner que l'activation de ERK par les Nétrines-1 et -3 est spécifique aux cultures sphéroïdes et n'induit pas la prolifération, ce qui concorde avec leur rôle dans le maintien de la survie en état de dormance. Nous avons inhibé la signalisation des Nétrines-1 et -3 en supprimant les récepteurs UNC5 et montré que la perte de cette voie compromet la survie des cellules HGSOC, particulièrement aux stades de dormance lors de la dissémination. Par ailleurs, la surexpression des Nétrines-1 et -3 dans des modèles murins de xéno greffes a conduit à une dissémination accrue de la maladie. Cette étude souligne l'importance cruciale de la signalisation Nétrine-ERK pour la survie des sphéroïdes et suggère qu'elle pourrait constituer une cible thérapeutique prometteuse pour éliminer les cellules HGSOC dormantes.

En conclusion, cette nouvelle étude montre que :

- L'expression des ligands Nétrine-1 et Nétrine-3, ainsi que celle de leurs récepteurs, est accrue dans les sphéroïdes de HGSOC.
- La signalisation des Nétrines-1 et -3 active la voie ERK, favorisant ainsi la survie des sphéroïdes de HGSOC.

-La surexpression des Nétrines-1 et -3 est associée à un pronostic défavorable et induit la dissémination métastatique du HGSOC.

Ma contribution à cet article comprend le développement et la préparation d'un nouvel anticorps anti-Nétrine-3, utilisé dans les expériences *in vitro* décrites dans ce manuscrit.

Netrin signaling mediates survival of dormant epithelial ovarian cancer cells


Reviewed Preprint

v2 • June 25, 2024

Revised by authors

Reviewed Preprint

v1 • November 30, 2023

Pirunthan Perampalam, James I. MacDonald, Komila Zakirova, Daniel T. Passos, Sumaiyah Wasif, Yudith Ramos-Valdes, Maëva Hervieu, Patrick Mehlen, Rob Rottapel, Benjamin Gibert, Rohann Correa, Trevor G. Shepherd, Frederick A. Dick 

London Regional Cancer Program, London Health Sciences Centre Research Institute, London, Ontario, Canada, N6A 4L6 • Department of Biochemistry, University of Western Ontario, London, ON, Canada, N6A 5C1 • Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Western Ontario, London, ON, Canada, N6A 5C1 • The Mary and John Knight Translational Ovarian Cancer Research Unit, London Regional Cancer Program, London, Ontario, Canada, N6A 4L6 • Apoptosis, Cancer and Development Laboratory - Equipe labellisée 'La Ligue', LabEx DEVweCAN, Institut Convergence PLAsCAN, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), INSERM U1052-CNRS UMR5286, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon1, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France • Netris Pharma, 69008 Lyon, France • Princess Margaret Cancer Centre, University Health Network, 101 College Street, Toronto, Ontario, Canada, M5G 1L7 • Department of Medical Biophysics, University of Toronto, 1 King's College Circle, Toronto, Ontario, Canada, M5S 1A8 • Department of Oncology, Western University, London, Ontario, Canada, N6A 4L6 • Department of Obstetrics and Gynecology, Western University, London, Ontario, Canada, N6A 5W9 • Department of Anatomy and Cell Biology, Western University, London, Ontario, Canada, N6A 5C1 • Children's Health Research Institute, London, Ontario, Canada, N6A 4V2

 https://en.wikipedia.org/wiki/Open_access

 Copyright information

Abstract

Dormancy in cancer is a clinical state in which residual disease remains undetectable for a prolonged duration. At a cellular level, rare cancer cells cease proliferation and survive chemotherapy and disseminate disease. We created a suspension culture model of high grade serous ovarian cancer (HGSOC) dormancy and devised a novel CRISPR screening approach to identify survival genes in this context. In combination with RNA-seq, we discovered the Netrin signaling pathway as critical to dormant HGSOC cell survival. We demonstrate that Netrin-1, -3, and its receptors are essential for low level ERK activation to promote survival, and that Netrin activation of ERK is unable to induce proliferation. Deletion of all UNC5 family receptors blocks Netrin signaling in HGSOC cells and compromises viability during the dormancy step of dissemination in xenograft assays. Furthermore, we demonstrate that Netrin-1 and -3 overexpression in HGSOC correlates with poor outcome. Specifically, our experiments reveal that Netrin overexpression elevates cell survival in dormant culture conditions and contributes to greater spread of disease in a xenograft model of abdominal dissemination. This study highlights Netrin signaling as a key mediator HGSOC cancer cell dormancy and metastasis.

eLife assessment

The authors further corroborated their model that Netrin signaling promotes survival and dissemination of non-proliferating ovarian cancer cells. These **valuable** results were found to be of significant potential interest to cancer biologists in as much as they address gaps in knowledge pertinent to the mechanisms underpinning ovarian cancer spread. In general, it was thought that **solid** experimental evidence was provided to support the role of Netrin signaling in fueling ovarian cancer progression.

<https://doi.org/10.7554/eLife.91766.2.sa1>

Introduction

Relapse from initially effective cancer treatment represents one of the greatest barriers to improving outcomes (1). Dormant or minimal residual disease that is not clinically detectable is a common source of relapse, particularly in a metastatic setting (2). This has motivated the search for, and study of, disseminated cancer cells. Cellular dormancy has been characterized in cancer cells derived from a variety of primary disease sites including breast, prostate, melanoma, and others (3, 4). Disseminated cells often occupy specific cellular niches in perivascular space or in bone marrow (5). They adopt catabolic metabolism (2), and withdraw from the cell cycle (4). Stem like phenotypes and epithelial to mesenchymal transition also characterize the biology of these cells as they survive dissemination and lay quiescent in distant tissues (1, 3, 5). Across a variety of disease sites this dormant state is characterized by diminished Ras-MAPK signaling and elevated p38 activity (3, 6). To develop treatments specifically tailored for dormant cells, a systematic search for vulnerabilities unique to dormancy is needed. To this end, high grade serous ovarian cancer (HGSOC) disseminates in ascites as growth arrested cellular aggregates (7). This has been modeled in culture (8), and studies confirm active induction of cell cycle arrest mechanisms (9, 10), induction of autophagy (11, 12), and other known characteristics of dormancy (13). This suggests that HGSOC spheroids are ideal to search for survival dependencies specific to dormant cells.

High grade serous ovarian cancer (HGSOC) is the deadliest gynecologic malignancy, accounting for more than 70% of cases (14). Its poor prognosis is largely attributed to late-stage diagnosis with metastases already present. Metastatic spread is facilitated by multicellular clusters of tumor cells, called spheroids, that are shed into the peritoneal cavity and disseminate to nearby organs (15). The non-proliferative state of spheroid cells renders them chemoresistant and contributes to disease recurrence, emphasizing the need to understand the biology of these cells (16). Dormant HGSOC cells are characterized by similar metabolic changes, EMT, and cytokine signaling as dormant cancer cells from other disease sites (3, 13). Mechanisms that mediate their dormant properties include AMPK-LKB1 signaling that induces autophagy (17, 18), STAT3 and FAK for survival and chemoresistance (19, 20), and DYRK1A signaling to arrest proliferation (10). Unfortunately, therapeutic approaches to target these pathways in ovarian cancer have yet to emerge, indicating that more candidates are needed.

Netrins are a family of secreted factors that reside in the extracellular matrix and were first identified in axon guidance in the developing nervous system (21, 22). Together with their receptors, Netrins have since been implicated in cancer progression (23). Netrin-1 is the most studied and its misregulation in cancer leads to pro-survival signals (24). Netrin interactions with DCC and UNC5 homologs (UNC5H, UNC5A-D) convert pro-death signals by these dependence

receptors to survival signals (25 [↗](#)). Netrin signals through PI3K-AKT and ERK-MAPK are known to participate in orientation decisions in development by providing guidance cues (26 [↗](#)–28 [↗](#)), while loss of ligand binding leads DCC or UNC5H to stimulate dephosphorylation of DAPK1 that sends pro-death signals (29 [↗](#), 30 [↗](#)). The gene encoding DCC is frequently deleted in cancer (24 [↗](#)), and Netrin-1 blocking antibodies are in Phase II clinical trials for endometrial and cervical carcinomas to inhibit metastatic growth (25 [↗](#)). Alternative receptors for Netrins such as NEO, DSCAM, and Integrins also mediate their signals (23 [↗](#)), creating a myriad of possible pathways for Netrins to regulate cancer cells. Lastly, functional roles for Netrin-3, -4, and -5 are still relatively unexplored compared to Netrin-1 (31 [↗](#)), although their expression patterns suggest roles in advanced forms of some cancers (32 [↗](#)). A functional role for Netrins and their receptors in dormancy, or other aspects of HGSOc spheroid biology have yet to be reported.

In this study we utilized a suspension culture system to interrogate survival mechanisms in dormancy using HGSOc spheroids. To maximize discovery of gene loss events that compromise viability in dormancy, we devised a novel genome-wide CRISPR screen approach that we term ‘GO-CRISPR’. In addition to the standard CRISPR workflow, GO-CRISPR utilizes a parallel screen in which ‘guide-only’ cells lacking Cas9 are used to control for stochastic changes in gRNA abundance in non-proliferative cells. This screen identified multiple Netrin ligands, DCC, UNC5Hs, and downstream MAPK signaling components as supporting survival of HGSOc cells in dormant culture conditions. A transcriptomic analysis of HGSOc spheroids also revealed Netrin signaling components were enriched in HGSOc spheroids compared to adherent cells, and that in the absence of the DYRK1A survival kinase Netrin transcriptional increases were lost. We show that multiple Netrins, UNC5 receptors, and the downstream MEK-ERK axis is crucial for survival signaling in dormant cell culture. Importantly, Netrin activation of ERK is restricted to spheroid cultures and is unable to stimulate proliferation, consistent with its role in dormant survival. We blocked Netrin signaling by deleting UNC5 receptors and using xenograft approaches demonstrated that loss of Netrin signaling compromises survival of HGSOc cells, specifically in the dormant stage of dissemination. Furthermore, we show that overexpression of Netrin-1 and -3 are associated with poor prognosis in HGSOc and their overexpression in culture increases survival in suspension culture. Netrin overexpression in xenografts contributes to increased disease dissemination in a model of metastasis. Our study highlights Netrin-ERK signaling as a requirement for spheroid survival and suggests it may be a potential therapeutic target for eradicating dormant HGSOc cells.

Results

Axon guidance genes are essential factors for HGSOc spheroid viability

To dissect genetic dependencies of dormant ovarian cancer cells, we utilized a suspension culture system that encourages cellular aggregation, leading to non-proliferative spheroids that resemble dormant aggregates found in ovarian cancer patient ascites (7 [↗](#), 10 [↗](#), 13 [↗](#), 33 [↗](#)). **Fig. 1A** [↗](#) illustrates withdrawal from cellular proliferation by HGSOc cells in suspension as evidenced by reduced expression of Ki67 and increased expression of the quiescence marker p130 (34 [↗](#)). Furthermore, phospho-western blots for ERK demonstrate reduced but not absent phosphorylation, and phospho-p38 either remains consistent or is increased. Reduced phospho-ERK and elevated phospho-p38 are indicative of the characteristic signaling switch reported to underlie most paradigms of cancer cell dormancy (5 [↗](#)). These findings are relatively consistent among the three HGSOc cell lines; iOvCa147, OVCAR8, TOV1946 selected for use in our screen. To discover genes required for survival in spheroids, we utilized a new approach called GO-CRISPR (Guide Only CRISPR) that we developed specifically for survival gene discovery in three-dimensional spheroid cell culture conditions (**Fig. 1B** [↗](#)). GO-CRISPR incorporates sgRNA abundances from non-Cas9-expressing cells to control for stochastic (non-Cas9 dependent) effects

that are a challenge in three-dimensional culture conditions with slow or arrested proliferation (35). We used sequencing to determine sgRNA identity and abundance in the library, initially infected cells, and in cells following 48 hours of suspension culture (Fig. 1B). Read count data was analyzed using a software package that we developed to analyze GO-CRISPR data (summarized in Fig. 1 - Fig. Sup. 1A&B). We selected genes that had a Spheroid/Adherent Enrichment Ratio (ER) less than 1 ($P < 0.05$) because some genes become depleted in adherent growth before being transferred to suspension culture conditions and this ratio selects for genes with a stronger effect in suspension when cells are not proliferating (Fig. 1B). To assess reliability of screen data, we investigated the classification of non-targeting control sgRNAs. We computed a receiver operator characteristic curve (ROC) and determined the area under the curve for each cell line (Fig. 1 - Fig. Sup. 1C). Greater than 95% of sgRNAs in iOVCA147 and OVCAR8 screens were classified as non-essential, while 83% of sgRNAs in TOV1946 cells were non-essential. In addition, we compared GO-CRISPR screen ER values with viability data from siRNA knock down for 35 individual genes we have previously studied in spheroid survival assays in OVCAR8 and iOVCA147 cells (Fig. 1 - Fig. Sup. 1D)(10). This revealed a statistically significant correlation between the two sets of data, suggesting that genes we previously knew supported spheroid viability (or were dispensable) were classified similarly by our screen. These controls suggested our screen data was reliable for identifying new survival dependencies.

We found 6,717 genes with an ER below 1 in iOvCa147 cells; and 7,637 genes in TOV1946; and 7,640 genes in OVCAR8 cells. Among these genes; 1,382 were common to all three cell lines (Fig. 1D). We performed pathway enrichment analysis on these common genes and identified several significantly enriched pathways. These include primary and secondary Reactome gene sets such as signal transduction, metabolism, and signaling by GPCR (Fig. 1E). In addition, we identified a tertiary category called ‘axon guidance,’ that includes numerous components of the Netrin signaling pathway that scored highly.

Expression of Netrin ligands and receptors are enriched in HGSOc spheroids

DYRK1A was previously discovered to support survival of ovarian cancer cells in suspension culture (10). Since DYRK1A phosphorylates RNA polymerase II in transcription initiation (36), we sought to determine if it regulates gene expression in spheroid survival. We created *DYRK1A*^{-/-} iOvCa147 cells and confirmed their deficiency for survival in suspension (Fig. 2 - Fig. Sup. 1A-E). Using iOvCa147 and *DYRK1A*^{-/-} derivatives, we performed RNA-seq on adherent and spheroid cells. We collected spheroids following a 6-hour incubation in suspension because overexpression of known cell cycle transcriptional targets due to DYRK1A loss were first evident at this time point, but loss of viability due to DYRK1A deficiency had not yet occurred (10). We compared iOvCa147 adherent cells to 6-hour suspension culture to identify transcriptional changes that occur as these cells transitioned from adherent conditions to suspension conditions (Fig. 2A). We identified 1,834 genes that were upregulated, and pathway enrichment analysis identified many of the same categories as our CRISPR screen including axon guidance (Fig. 2B). We then compared iOvCa147 spheroid cells to *DYRK1A*^{-/-} spheroid cells to identify mRNA expression changes that were lost through DYRK1A deficiency (Fig. 2C). We identified 744 genes that were downregulated and these also belonged to many of the same pathways, including axon guidance (Fig. 2D).

We compared enriched pathways from these two RNA-seq analyses with those that were identified in our GO-CRISPR screens to identify gene expression programs in spheroids whose products are essential for cell survival. 78 Reactome pathways were commonly enriched across the GO-CRISPR screens and transcriptomic analyses, including 78 of the 83 pathways identified in RNA-seq from *DYRK1A*^{-/-} spheroid cells (Fig. 2E). The axon guidance pathway was one of the most enriched among these common pathways (Fig. 2F). These data reveal that our GO-CRISPR screen and transcriptomic analyses converge on this highly specific tertiary Reactome category of axon

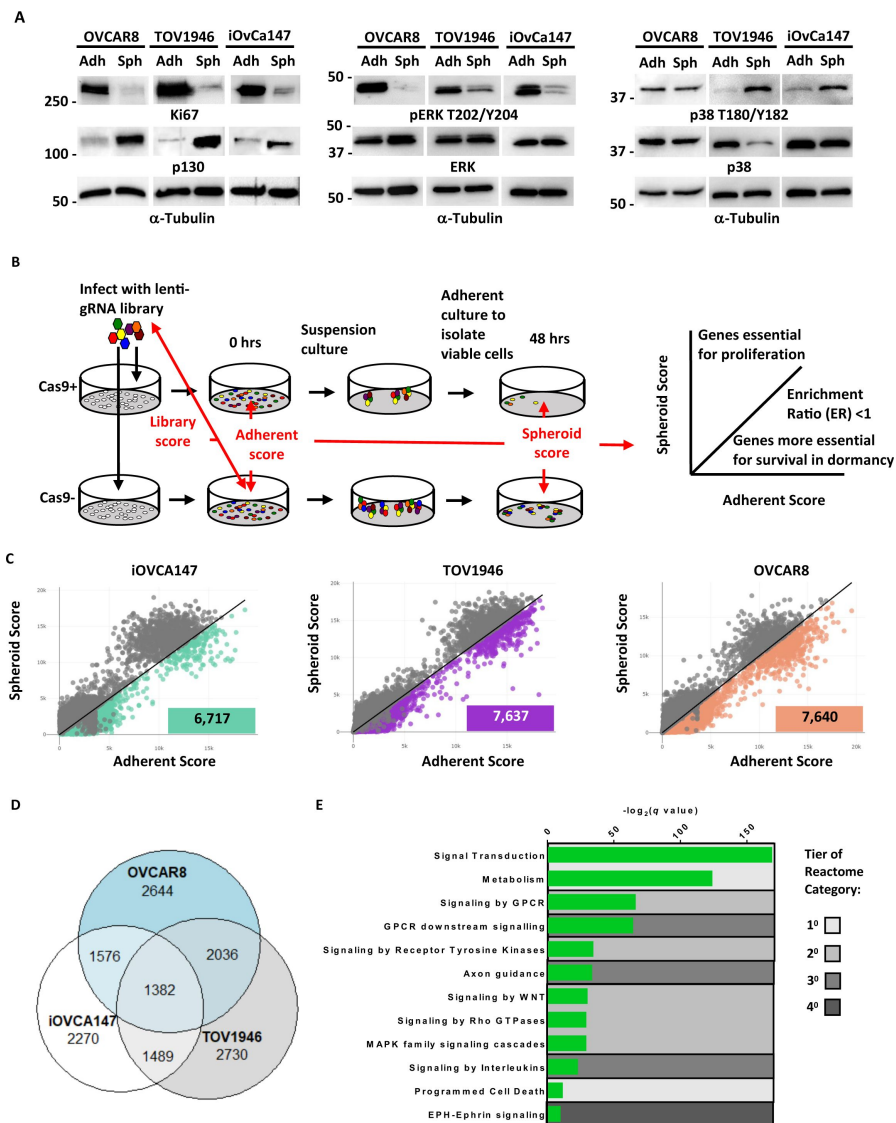


Figure 1.

GO-CRISPR screens implicate axon guidance pathways as supporting HGSOc spheroid cell viability.

A) iOvCa147, TOV1946, or OVCAR8 cells were cultured under adherent conditions (Adh) or in suspension to induce spheroid formation (Sph). Lysates were prepared and analyzed by western blotting for the proliferation marker Ki67 and the quiescence marker p130, and phosphorylated and total levels of ERK and p38. Tubulin was blotted as a loading control. **B)** Flow chart of GO-CRISPR screening used for each of iOvCa147, TOV1946, or OVCAR8 control cells and derivatives of each that express Cas9. Cas9-positive cells (top row) and Cas9-negative cells (bottom row) were transduced with the GeCKO v2 pooled sgRNA library. After antibiotic selection, cells were expanded under adherent culture conditions (0 hours) before being transferred to suspension culture conditions to induce spheroid formation and select for cell survival. After 48 hours spheroids were transferred to standard plasticware to isolate viable cells. Red arrows indicate the relevant comparisons of sgRNA sequence abundance that were made to analyze screen outcomes. Genes with relatively greater effect on viability in suspension were selected by comparing their scores between adherent and suspension conditions and considering genes with an enrichment ratio (ER) of <1. **C)** Scatter plots representing the spheroid score on y-axis and adherent score on the x-axis calculated by TRACS for each gene in each cell line (iOvCa147, TOV1946, OVCAR8). Colored data points represent genes with ER < 1 and $p_{adj} < 0.05$ (paired t-test). **D)** Venn diagram illustrating overlap of genes identified as supporting cell viability in suspension culture from iOvCa147, TOV1946, and OVCAR8 cells. **E)** Graph depicting enriched pathways from ConsensusPathDB using the 1382 commonly identified genes from D. Categories are ranked by q-value. Tiers of Reactome categories are indicated by shading.

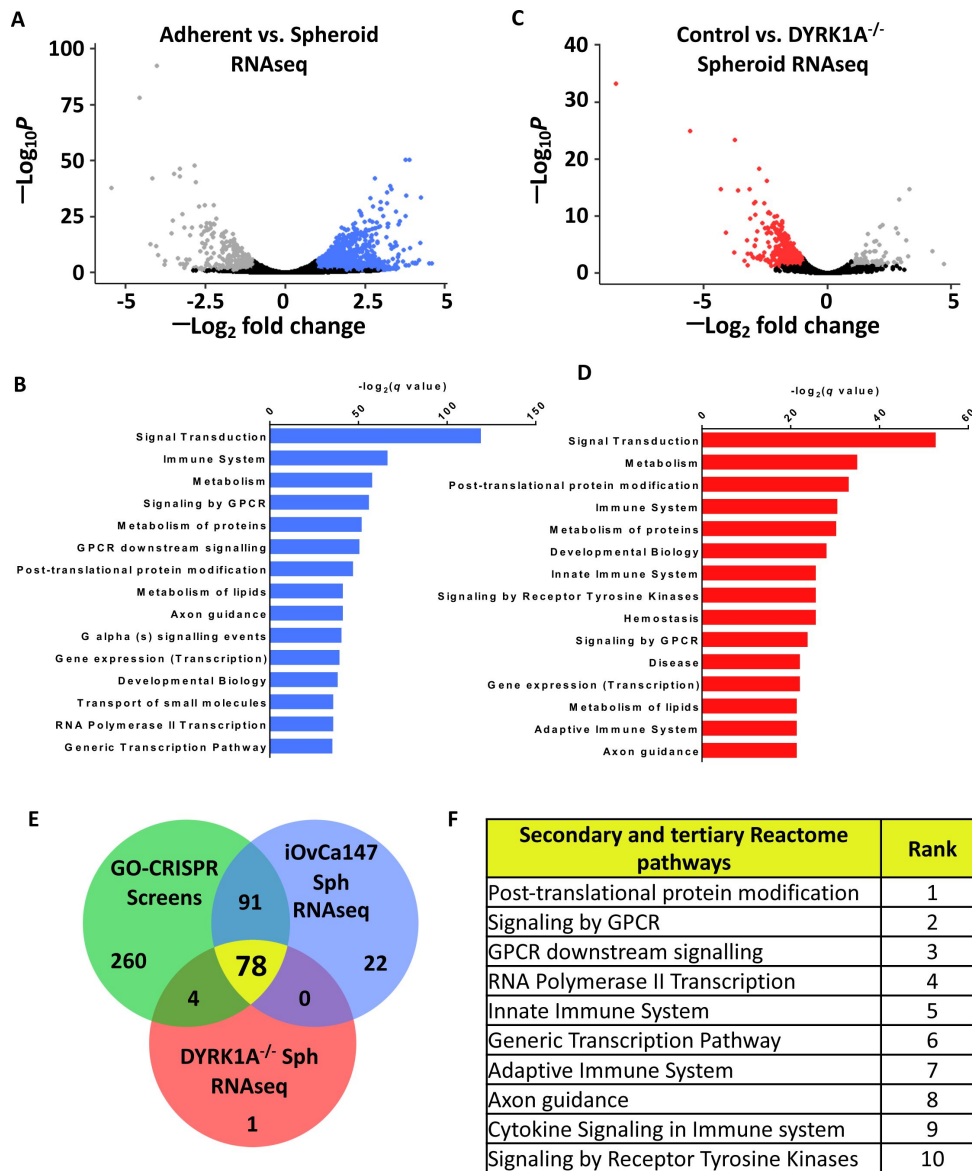


Figure 2.

Axon guidance pathway components are upregulated in iOvCa147 spheroid cells in a *DYRK1A* dependent manner.

A) RNA was isolated from iOvCa147 cells following culture under adherent conditions or in suspension conditions to induce spheroid formation for 6 hours. Triplicate independent cultures were processed for RNA-seq. A volcano plot shows differentially expressed genes in spheroid cells compared to adherent. 1,937 genes were found to be downregulated in iOvCa147 spheroid cells (\log_2 fold change < 1, $p_{\text{adj}} < 0.05$ (Wald test), FDR 10%, highlighted in grey) and 1,834 genes were upregulated (\log_2 fold change > 1, $p_{\text{adj}} < 0.05$, FDR 10%, highlighted in blue). **B)** Top 15 most significantly enriched pathways ($p_{\text{adj}} < 0.05$) whose genes were upregulated in suspension culture compared to adherent in RNA-seq analysis. A volcano plot showing differentially expressed genes in *DYRK1A*^{-/-} spheroid cells compared to iOvCa147 spheroid cells. 744 genes were found to be downregulated in *DYRK1A*^{-/-} spheroid cells (\log_2 fold change < 1, $p_{\text{adj}} < 0.05$ (Wald test), FDR 10%, highlighted in red) and 96 genes were upregulated (\log_2 fold change > 1, $p_{\text{adj}} < 0.05$ (Wald test), FDR 10%, highlighted in grey). **C)** Top 15 most significantly enriched pathways that were represented by downregulated genes in *DYRK1A*^{-/-} suspension culture compared to control cells in suspension. **E)** Venn diagram depicting overlapping enriched pathways identified in GO-CRISPR screens in green; enriched pathways identified in upregulated genes in parental iOvCa147 spheroid cells in blue; and enriched pathways identified in downregulated genes in *DYRK1A*^{-/-} spheroid cells in red. 78 pathways were commonly enriched in all three datasets (shown in yellow). **F)** Top 10 most significantly enriched pathways among the 78 identified in C.

guidance alongside much broader primary or secondary gene sets. This category includes Netrin ligands, receptors, and downstream signaling components, suggesting a previously unappreciated role in HGSOc spheroid viability.

We separately sought to confirm elevated expression of Netrins and some of their signaling components in HGSOc spheroid cell culture. We examined expression levels of ligands and receptors in the three cell lines used in our GO-CRISPR screen using RT-qPCR (**Fig. 3A-C**). The precise identities of upregulated genes varies between cell lines, however each cell line increases expression of some Netrins, at least one *UNC5*, and at least one of *DCC*, *DSCAM*, and *Neogenin*. This suggests that the Netrin pathway components are expressed in HGSOc cells may play a previously unappreciated role in dormancy and disease progression.

Since Netrin signaling has not been previously associated with dormancy we examined expression of Netrin-1 and -3 ligands in spheroids isolated directly from patient ascites by immunohistochemistry. First, we assessed proliferative markers in HGSOc tumor tissue and spheroids by staining for Ki67 and p130. As expected, solid HGSOc tumors display uniform Ki67 positivity and relative absence of p130 (**Fig. 4A-B**). Conversely, serial sections of spheroids demonstrated rare Ki67 nuclear staining and abundant and uniform p130 staining. This indicates that cells in these patient derived spheroids are quiescent (**Fig. 4C-E**). To investigate the presence of Netrins, we initially tested Netrin-1 and -3 antibody specificity using spheroids generated from OVCAR8 cells bearing knock out or over expression of Netrins (**Fig. 4 - Fig. Sup. 1A-F**). Dormant patient derived spheroids were stained for Netrins and epithelial markers Cytokeratin and EpCAM. Since HGSOc is characterized by point mutations in p53 and its accumulation in the nucleus, sections were also stained for p53 to confirm cancer cell identity within these spheroids by high level nuclear staining (**Fig. 4F-H**). Overall, this confirms Netrin expression occurs in dormant HGSOc patient spheroids, precisely the context our screen indicates that they are critical for cell survival.

Netrin signaling stimulates ERK to support HGSOc spheroid survival

Netrin ligands and their dependence receptors are best known for their roles in axon guidance (37), but are appreciated to regulate apoptosis in cancer (23). **Fig. 5A** illustrates components of Netrin signaling and the frequency with which they were discovered to have an ER of <1 in our screens. In addition, intracellular signaling molecules known to be downstream of Netrin receptors that are shared with other enriched pathways identified in our screens, are also illustrated. To confirm screen findings, we independently knocked out *NTN1*, *NTN3*, *NTN4*, *NTN5*, the *UNC5H* receptor homologs (*UNC5A*, *UNC5B*, *UNC5C*, and *UNC5D*), as well as *DCC*, *DSCAM*, and *NEO1* alone or in multigene combinations using lentiviral delivery of sgRNAs and Cas9 (**Fig. 5 - Fig. Sup. 1A-C**). We assessed the effect of their loss on spheroid survival in six HGSOc cell lines (iOvCa147, TOV1946, OVCAR3, OVCAR4, OVCAR8, and COV318). Loss of at least one Netrin ligand resulted in reduced spheroid cell survival in five of six cell lines (**Fig. 5B**). Notably, Netrin-3 loss showed the most pronounced effect on survival. Cell lines such as OVCAR8 and COV318 were relatively resistant to the deletion of Netrin pathway components as individual *UNC5*, *DCC*, and *DSCAM* genes rarely affected viability (**Fig. 5B**). In these instances, combined deletions of *UNC5* family members, or *DCC*;*DSCAM*;*NEO1* (DDN for short) were either inviable or highly sensitive to suspension culture induced cell death, suggesting redundancy in this pathway in some cell lines. Other cell lines, such as OVCAR3, were highly sensitive to the loss of multiple individual ligands and any individual *UNC5H* receptor was highly sensitizing to death induction in suspension (**Fig. 5B**). Overall, these illustrate a robust role for Netrins in survival in this dormant cell culture assay. Importantly, loss of receptor expression does not elevate viability as expected for a dependence receptors, nor does it induce DAPK1 dephosphorylation (**Fig. 5 - Fig. Sup. 1D**), suggesting that Netrin receptors in HGSOc spheroids transmit positive survival signals.

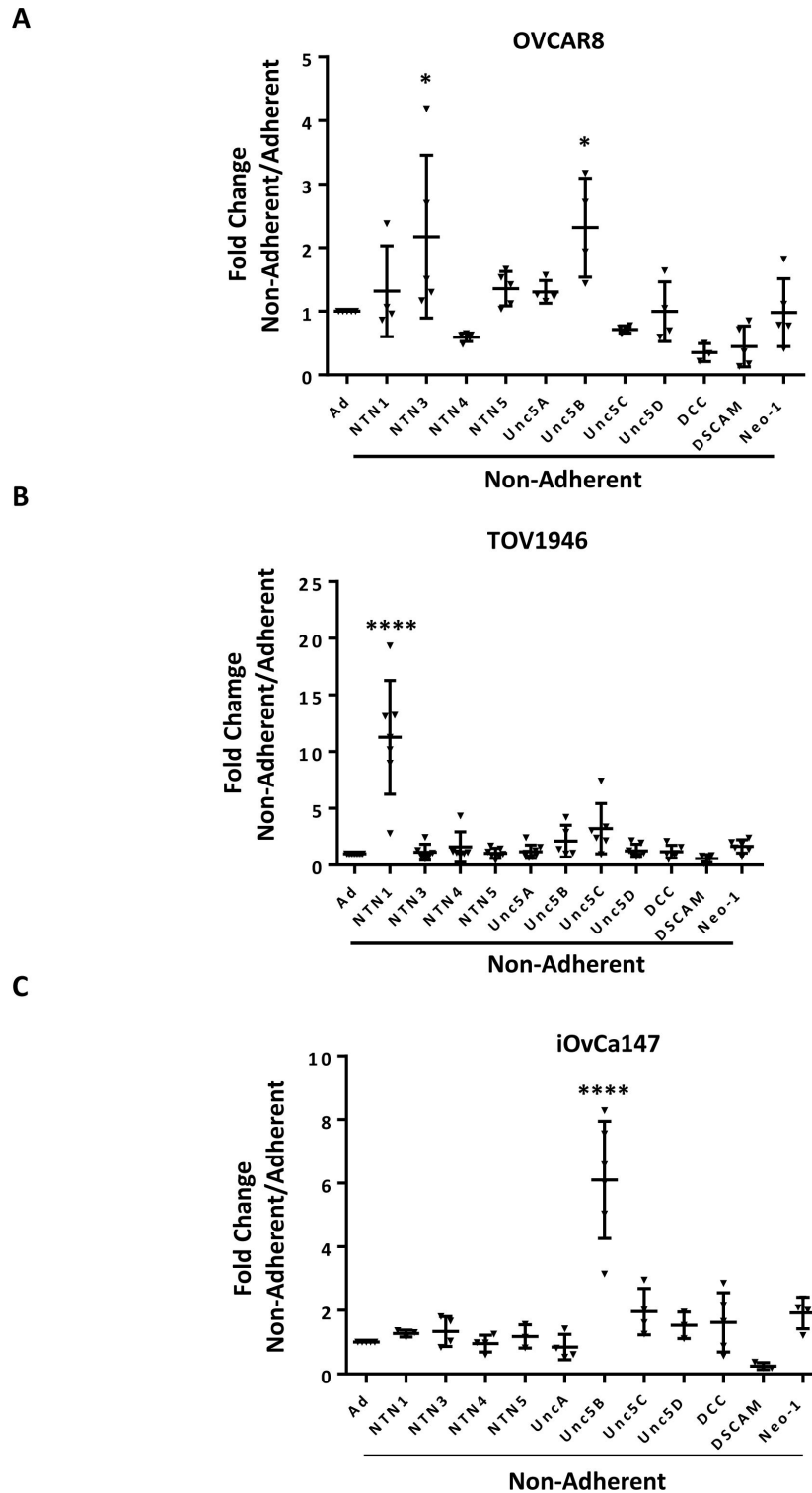


Figure 3.

Expression of Netrin ligands and their dependence receptors is increased in suspension culture.

A-C) RT-qPCR was performed to quantitate mRNA expression levels of Netrin ligands and receptors in three different HGSOC cell lines. Relative expression of the indicated transcripts is shown for suspension culture conditions compared with adherent. All experiments were performed in at least triplicate biological replicates. Means were compared with the same gene in adherent culture using a one way anova (* $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$).

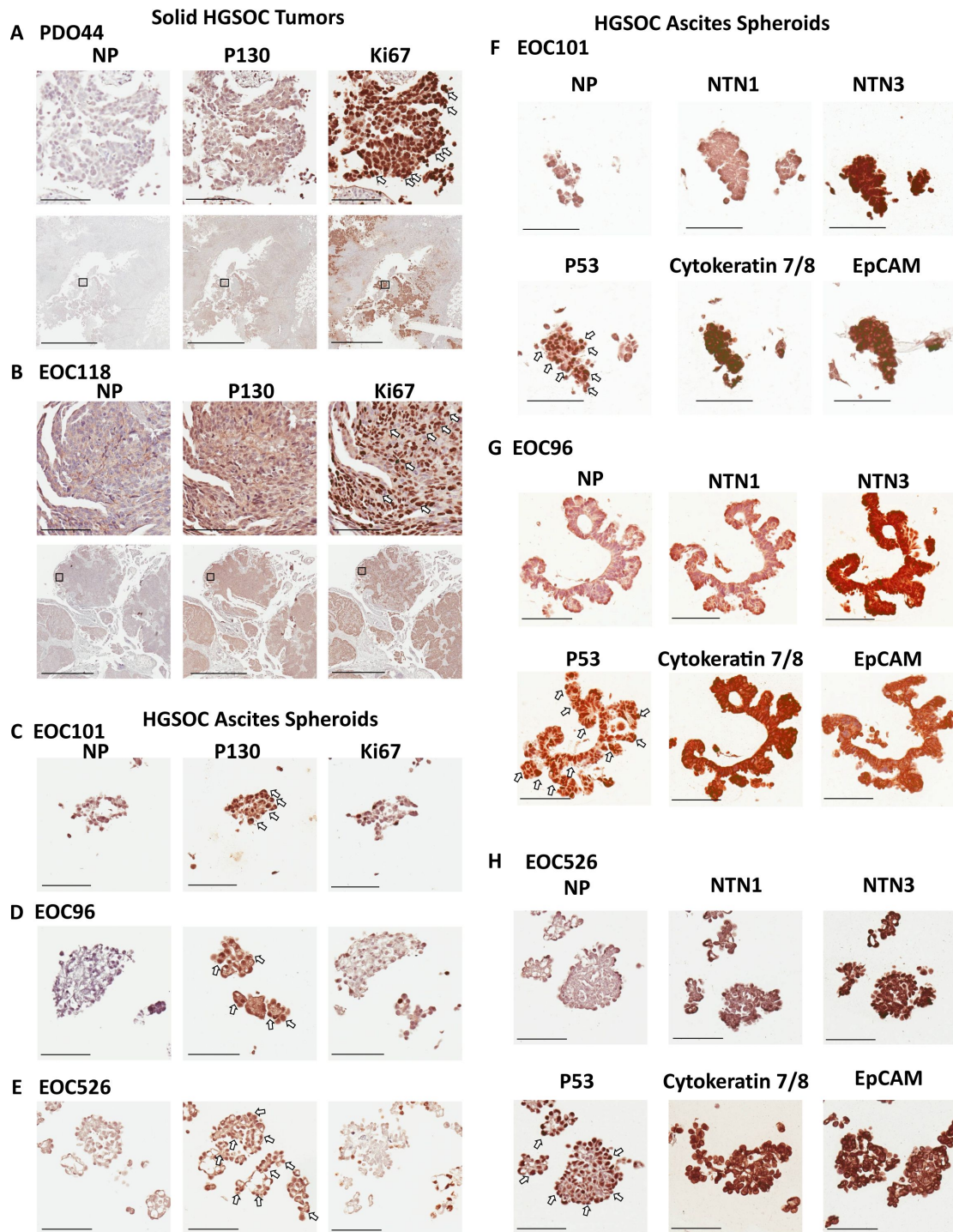


Figure 4.

Netrins are expressed in dormant patient derived spheroids.

Spheroids were isolated from ascites of HGSOC patients and processed for immunohistochemical staining. **A-B)** Serial sections from solid HGSOC tumors were stained with antibodies to p130, Ki67, or a no primary antibody control (NP). Scale bar = 100µm for upper panels and 2mm for lower panels. **C-E)** Serial spheroid sections from the indicated patients were stained with Ki67 and p130. Sections with dense positive nuclear staining are indicated with white arrows. Scale bar = 100µm. **F-H).** Immunohistochemical staining was performed for the indicated proteins on serial sections of ascites derived spheroids. Omission of primary antibody was used as a control for background staining for each patient sample (NP). Scale bar = 100µm

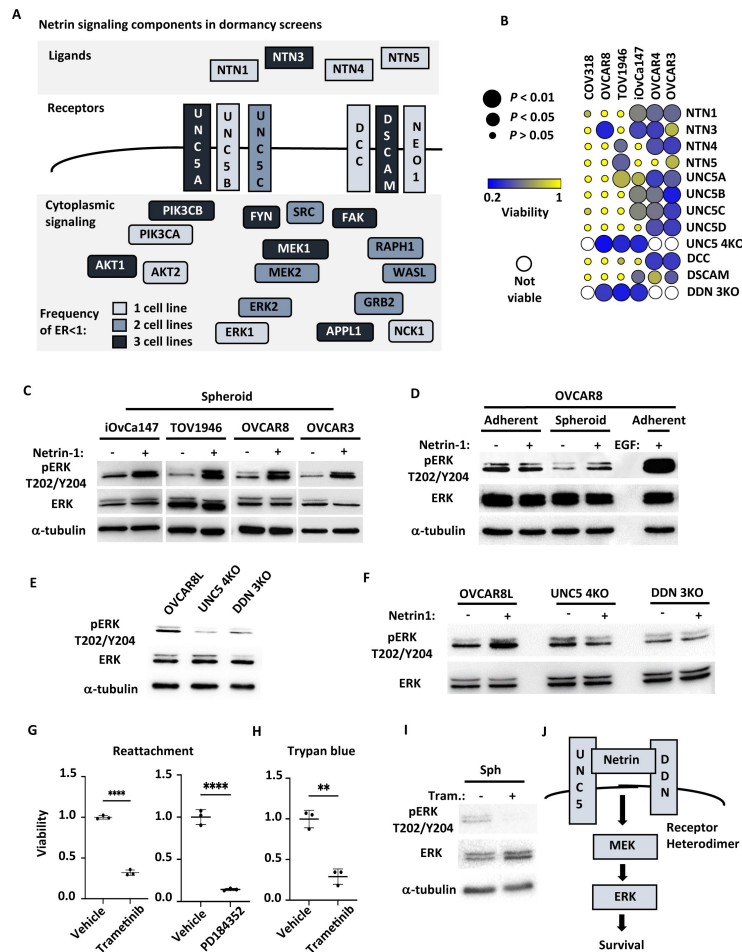


Figure 5.

Netrin ligands and their receptors are required for spheroid cell survival.

A) Illustration of netrin ligands, receptors, and other intracellular signaling molecules that are included in the Axon Guidance pathway category. The frequency of their identification in CRISPR screens is illustrated by shading and indicates how many cell lines had an enrichment ratio <1 for a given component. **B)** The indicated ovarian cancer cell lines were infected with lentiviruses expressing sgRNAs directed against the indicated Netrin signaling genes. Cells were transferred to suspension culture conditions to induce spheroid formation for 72 hours and then returned to adherent conditions for 24 hours to facilitate reattachment. Re-attached cells were stained with Crystal Violet and retained dye was extracted and quantitated to measure relative survival. Each cell-gene combination was assayed in at least three biological replicates, averaged, and viability is displayed as a bubble plot. Mean survival for a given cell-gene combination was compared with GFP control gRNA transduced cells using one way anova and significance levels are illustrated by bubble size. Inviability cell-gene combinations are depicted as empty spaces. **C)** Cultures of the indicated cell lines were cultured in suspension for five days and stimulated with 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Netrin-1. Netrin-1 signaling was analyzed by SDS-PAGE and western blotting for phospho-ERK, ERK, and tubulin. **D)** Quiescent adherent OVCAR8 cells were stimulated with 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Netrin-1 or 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EGF, and compared with OVCAR8 cells in suspension stimulated as in C. Extracts were prepared and blotted for phospho-ERK, ERK, and tubulin. **E)** Suspension cultures of OVCAR8, or knock out derivatives, were harvested and analyzed for relative phosphorylation levels of ERK by western blotting. Total ERK and tubulin blotting serve as expression and loading controls. **F)** Netrin-1 signaling in OVCAR8, UNC5 4KO and DDN 3KO derivatives was tested by transferring cells to suspension and stimulating with Netrin-1 as before. Western blotting for phospho-ERK, ERK were also as before. **G)** OVCAR8 cells were seeded in suspension culture and treated with the MEK inhibitors PD184352, Trametinib or DMSO vehicle for 72 hours. Mean viability was determined by re-attachment and compared by one way anova (**** $P < 0.0001$). **H)** OVCAR8 cells were cultured in suspension and treated with Trametinib or DMSO vehicle as in G. Viability was determined by trypan blue dye exclusion and compared by one way anova (** $P < 0.01$). **I)** Extracts were prepared from Trametinib and control treated spheroid cells and blotted for phospho-ERK, ERK, and tubulin. **J)** Model summarizing the roles of Netrin ligands, receptors, and downstream targets MEK and ERK in dormant survival signaling.

To determine if Netrin dependent signaling is active in HGSOc spheroids, we stimulated cells in suspension with recombinant Netrin-1 (**Fig. 5C**). Western blotting for phospho-ERK, as a measure of activation, revealed stimulation of MEK-ERK signaling in each of the cell lines tested. Because MAPK signaling is best known for its role in proliferation, we also tested Netrin-1 stimulation of quiescent, adherent cells and compared this with stimulation in spheroid culture. Both conditions display similar, low levels of phospho-ERK, but Netrin-1 was only able to stimulate ERK phosphorylation in suspension (**Fig. 5D**). Importantly, stimulation of adherent cells with an equivalent concentration of EGF induced pERK levels commonly seen in proliferating cells. Collectively, the context and magnitude of pERK stimulation by Netrin-1 is inconsistent with proliferative signaling, suggesting it may contribute to survival. This suggested that Netrin is a candidate pathway to provide low level, but essential survival signals through the MAPK pathway in dormant spheroids. We investigated the dependence of ERK phosphorylation on UNC5H and DDN receptors and discovered that it is lower when receptors are deleted (**Fig. 5E**). Furthermore, Netrin-1 stimulation of suspension cultures of OVCAR8 cells, or derivatives deleted for UNC5 family members or DDN receptors, indicated that Netrin receptors are essential to activate ERK in suspension culture (**Fig. 5F**). To confirm that Netrin-MEK-ERK signaling contributes to survival in suspension culture, we used two different MEK inhibitors, PD184352 and Trametinib, to treat OVCAR8 suspension cultures and observed that it causes loss of cell viability in suspension culture (**Fig. 5G**). Since we routinely use reattachment of spheroids to adherent plastic as a test of viability, also tested viability using trypan blue dye exclusion to confirm that Trametinib is truly killing cells in suspension and it revealed the same conclusion (**Fig. 5H**). As expected, treatment of cells in suspension with Trametinib lead to lower phospho-ERK levels (**Fig. 5I**). The simplest explanation of this data is that Netrins signal through a heterodimer or multi-receptor complex containing both an UNC5 and DDN component that provides low level stimulation for MEK and ERK specifically in dormant culture conditions.

Netrin signaling is essential for dormant spheroid survival during metastatic dissemination

To investigate the role of Netrin signaling in the context of residual disease and relapse, we xenografted mice with control OVCAR8L cells, or UNC5 4KO cells, by intraperitoneal injection (**Fig. 6A**). Two weeks following injection, mice were euthanized, and spheroids were obtained by washing the abdominal cavity with PBS. Importantly, at this early stage of engraftment, solid tumor lesions were not yet observable, indicating that we are modeling minimal residual disease where dormancy is most relevant. Extraction of RNA from control OVCAR8 cell spheroids recovered at this time point indicates a reduction in expression of pro-proliferative genes compared to the same cells prior to engraftment (**Fig. 6B**). Furthermore, comparison with RT-qPCR measurements of these same markers in suspension culture induced OVCAR8 spheroids indicates that spheroids from abdominal washes are equivalently withdrawn from the cell cycle (**Fig. 6C**, - **Fig. Sup. 1**). This suggests spheroids at this stage are dormant. Furthermore, recovery of spheroids by replating on adherent plastic indicates that deletion of UNC5 receptors to block Netrin signaling extensively reduces survival under these circumstances (**Fig. 6C**). We also quantitated cancer cells in these abdominal washes by qPCR using human Alu repeat detection to count cells and this also demonstrates that cancer cell abundance is reduced in this dormant state by loss of UNC5 receptors. Further xenografts were performed to investigate the long term consequences of reduced survival of UNC5 4KO cells in mice. This demonstrated that mice engrafted with UNC5 4KO cells had a considerably longer survival than control OVCAR8 recipient mice that received the same number of cells (**Fig. 6E,F**). Collectively, this demonstrates that inhibition of Netrin signaling compromises viability and eventual disease progression in a model of dormancy and dissemination.

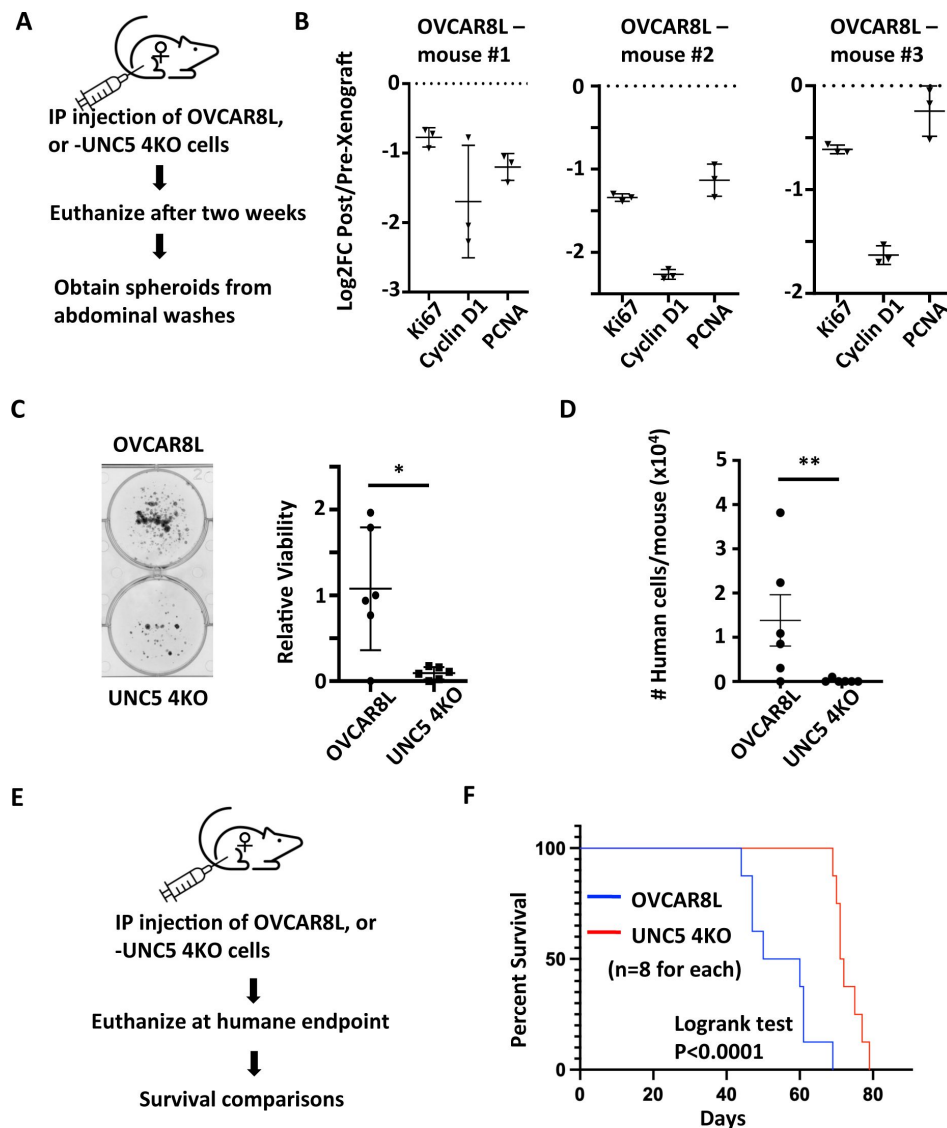


Figure 6.

Loss of Netrin signaling reduces spheroids and prolongs survival.

A) Control OVCAR8L (negative control CRISPR targeted cells) and UNC5 4KO cells were injected into the peritoneal space of female NOD/SCID mice. After two weeks, animals were euthanized and engrafted cells were collected with abdominal washes. **B**) RT-qPCR was used to compare gene expression of the indicated cell cycle markers in RNA extracted from proliferating cells in culture before engraftment and compared with RNA obtained from spheroids in xenografted mice. Technical replicates of RNA derived from three different mice is shown. **C**) Spheroids obtained from abdominal washes from each mouse were plated in adherent conditions to compare their abundance between control and UNC5 4KO genotypes. One example of each genotype of cell is shown. Crystal violet staining and dye extraction were used to quantitate biomass and averages were compared by one way anova (n=6, *P<0.05). **D**) DNA was extracted from cells collected in abdominal washes and human Alu repeats were detected by qPCR to quantitate and compare human cancer cells. Means were compared by one way anova (n=6, **P<0.01). **E**) Control OVCAR8 and UNC5 4KO cells were xenografted as above and mice were monitored until humane endpoint. **F**) Kaplan-Meier analysis of survival for mice engrafted with the indicated genotypes of cells. Survival was compared by logrank test.

Netrin overexpression is correlated with poor outcomes in HGSOc

Genomic studies indicate that HGSOc is one of the most aneuploid cancers (38). In addition to the frequency of copy number variants per tumor, the locations of gains and losses are dissimilar between cases, making this a highly heterogeneous disease. Evaluation of TCGA genomic data for HGSOc indicates rare amplifications or deletions of Netrin or Netrin-receptor genes (Fig. 7 - Fig. Sup. 1A). Because of redundancy of Netrins and their receptor families this data suggests HGSOc cases with deficiency for Netrin signaling are rare. This is consistent with our data that all six cell lines tested reveal evidence of Netrin component dependence for survival (Fig. 5B). Some TCGA HGSOc cases display elevated gene expression for Netrins or their receptors, but only rare cases display low expression (Fig. 7 - Fig. Sup. 1B). This suggests that Netrin signaling in HGSOc is retained despite high copy number variation in this cancer type and there is occasional overexpression.

In agreement with our experimental data that multiple Netrin ligands can contribute to spheroid survival in HGSOc (Fig. 5A&B), sorting cases by high level expression of Netrin-1 and -3 ligands reveals a significantly shorter overall survival compared to cases with low level expression and this trend is also evident in the cases that only overexpress Netrin-3 (Fig. 7A). This genomic data supports the interpretation that Netrin signaling is retained in HGSOc and its elevation is deleterious to patient outcome.

We investigated overexpression of Netrin-1 and -3 in spheroid survival by generating OVCAR8 derivatives that stably overexpress these proteins (Fig. 7B). We then utilized these cells in suspension culture assays for spheroid survival as before (Fig. 7C). This data indicates that overexpression of either Netrin-1 or -3 increases OVCAR8 cell survival in dormant spheroid culture conditions. Examination of fixed spheroids isolated from this experiment further indicates that elevated survival in this experiment is explained by an increase in abundance of individual spheroids that overexpress either Netrin-1 or -3 (Fig. 7D). These experiments reveal the significance of a previously undiscovered role for Netrins in HGSOc. High level expression correlates with poor outcome and in suspension culture, overexpression confers oncogenic properties on HGSOc cells.

Netrin overexpression induces abdominal spread of HGSOc

Our findings from CRISPR screens and cell culture experiments indicate that Netrin signaling supports dormant HGSOc cell survival. Our analysis of TCGA is also predictive of a worse outcome for patients. We sought to solidify these findings by searching for how Netrin signaling affects HGSOc disease pathogenesis.

We utilized a xenograft assay in which OVCAR8 cells overexpressing Netrin-1 or -3 were injected into the peritoneal cavity and compared with OVCAR8 cells bearing an empty vector as control. Mice were harvested following 35 days to analyze disease dissemination and characterize the effect of Netrins in this model of HGSOc metastatic spread (Fig. 8A). Necropsy of all animals at endpoint allowed for the identification and quantitation of tumor nodules within the abdomen (Fig. 8B). Petal plots illustrate the frequency of specific organ and tissue sites displaying tumor nodules (Fig. 8B). This revealed that spread to the omentum was similar across all genotypes of xenografted cells and it occurred in all mice (Fig. 8B). In contrast, tumor nodules were detected with increased abundance on the diaphragm, the liver, and mesenteries that support the uterus (mesometrium) (Fig. 8B). In addition to more frequent disease spread to these locations caused by Netrin overexpressing cells, we note that the quantity of nodules was also increase in comparison with OVCAR8 control cells (Fig. 8C-F). We confirmed the source of these lesions to be the xenografted cells using immunohistochemical staining for human cytokeratin (Fig. 8G,H). Lastly, Netrin-1 and -3 histochemical staining confirms its presence in the local tumor

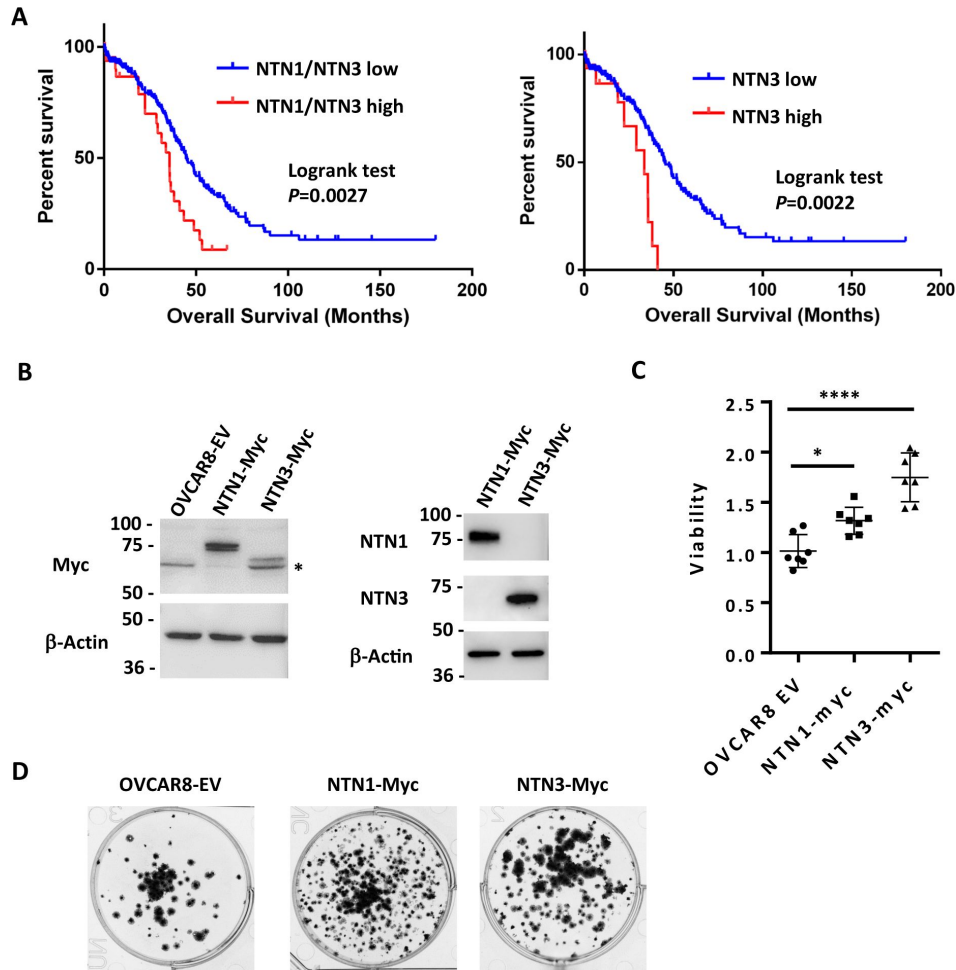


Figure 7.

Netrin ligand overexpression is associated with poor clinical outcome in HGSOC.

A) TCGA RNA-seq data for HGSOC patients (TCGA PanCancer Atlas study) was used to identify high Netrin-1 or -3 and low Netrin-1 or -3 expressing patients (high expressing are above z-score 1.2). Overall survival was used to construct Kaplan-Meier plots and survival was compared using a logrank test. **B)** OVCAR8 cells were stably transduced with lentiviral constructs to overexpress epitope tagged Netrin-1 or -3. Western blotting for Netrins, Myc-tags, and Actin were used to determine relative expression levels of both Netrins in these cell populations and vector controls. **C)** Control and Netrin overexpressing cells were transferred to suspension culture conditions to form spheroids, and replated to assay for viability. Mean viability and standard deviation is shown for each. One way anova was used to compare survival (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$). **D)** Reattached spheroids were fixed and stained with Crystal Violet to examine size and abundance in control and Netrin-1 or -3 overexpression.

microenvironment (**Fig. 8G,H**). The similarity of increased tumor nodules seen in xenografts and elevated spheroid formation and viability seen in culture suggests that Netrin signaling improves cell viability in spheroid aggregates *in vivo* leading to increased disease spread.

Discussion

In this report we investigated survival mechanisms in a model of HGSOc dormancy. We utilized a modified CRISPR screening approach that was adapted to discover gene loss events in largely non-proliferative conditions. We compared essential genes discovered in the screen with gene expression increases identified by RNA-seq in dormant HGSOc cultures. This implicated the Netrin signaling pathway in HGSOc spheroid survival. We independently validated the role of Netrins, their receptors, and downstream intracellular targets MEK and ERK in the survival biology of HGSOc cells in dormant culture and *in vivo* in xenografts. Furthermore, we reveal that overexpression of Netrin-1 and -3 are correlated with poor clinical outcome in HGSOc and overexpression of these ligands induces elevated survival in dormant HGSOc culture conditions and increased disease spread in a xenograft model of dissemination. Our work implicates Netrins, their receptors, and MEK-ERK as a previously unappreciated, but critical signaling network in HGSOc survival.

HGSOc spheroid cell biology has presented a unique challenge to cancer chemotherapy. Dormant spheroids are most abundant in patients with late-stage disease and they contribute to therapeutic resistance and seed metastases (39–41). Hence, there is a critical unmet need to understand HGSOc spheroid dependencies and target them therapeutically. Our data suggests that Netrin signaling is a universally active mechanism in spheroid cell survival. HGSOc is characterized by extensive genomic rearrangements and copy number variants (38), and we speculate that Netrin signaling is retained because of the extensive redundancy of components of this pathway. Netrin-1 and -3 can both contribute to survival signaling and knock out of three or four different Netrin receptors is necessary to compromise Netrin signaling in survival. A key goal for the future is to identify Netrin-1 or -3 overexpression patients and compare their specific disease progression patterns with our xenograft model. This will be most informative of the effects of Netrin ligand overexpression in scenarios of dormancy, metastasis, and chemotherapy resistance.

This study demonstrates that Netrins function to stimulate UNC5H and fibronectin repeat containing receptors such as DCC to activate survival signals in HGSOc spheroids. This is distinct from the known role of UNC5H and DCC as dependence receptors where Netrin inhibits their proapoptotic signaling (25). Our data does not show elevated survival of spheroid cells in response to deletions of receptors, even in instances where families of Netrin receptors are co-deleted. Consistent with this observation, overexpression of Netrin-1 or -3 in OVCAR8 cells stimulates higher level survival in suspension. In colon cancer, deletion of DCC confers a survival advantage and underscores the dependence receptor concept (42, 43). In HGSOc DCC or UNC5H deletions are relatively rare (38). This suggests that ovarian cancer cells utilize Netrin signals for positive survival signaling instead of to neutralize inherent death signals from dependence receptors. Our data suggests that Netrin activates MEK and ERK to support cell survival indicating that targeting ligands, receptors or downstream at MEK are all possible approaches to inhibit this survival pathway. Netrin-1 inhibition in solid tumor xenograft models of melanoma have been shown to be effective in combination with chemotherapy (44), but its effects on a dormant scenario are unknown. Identifying agents that cooperate with standard HGSOc chemotherapeutic agents such as carboplatin would offer an attractive strategy to eradicate dormant cells while combating progressive disease. Alternatively, a novel approach to targeting dormancy discovered in this study is, ironically, MEK inhibition. While MAPK signaling in cancer is universally known for its role in proliferation (45), and MEK inhibitors are used to block proliferation (46, 47), it is noteworthy that Netrin stimulation of MAPK signaling is reported to provide survival signals and to guide axon outgrowth in a non-proliferative context (26, 48). Dormancy is

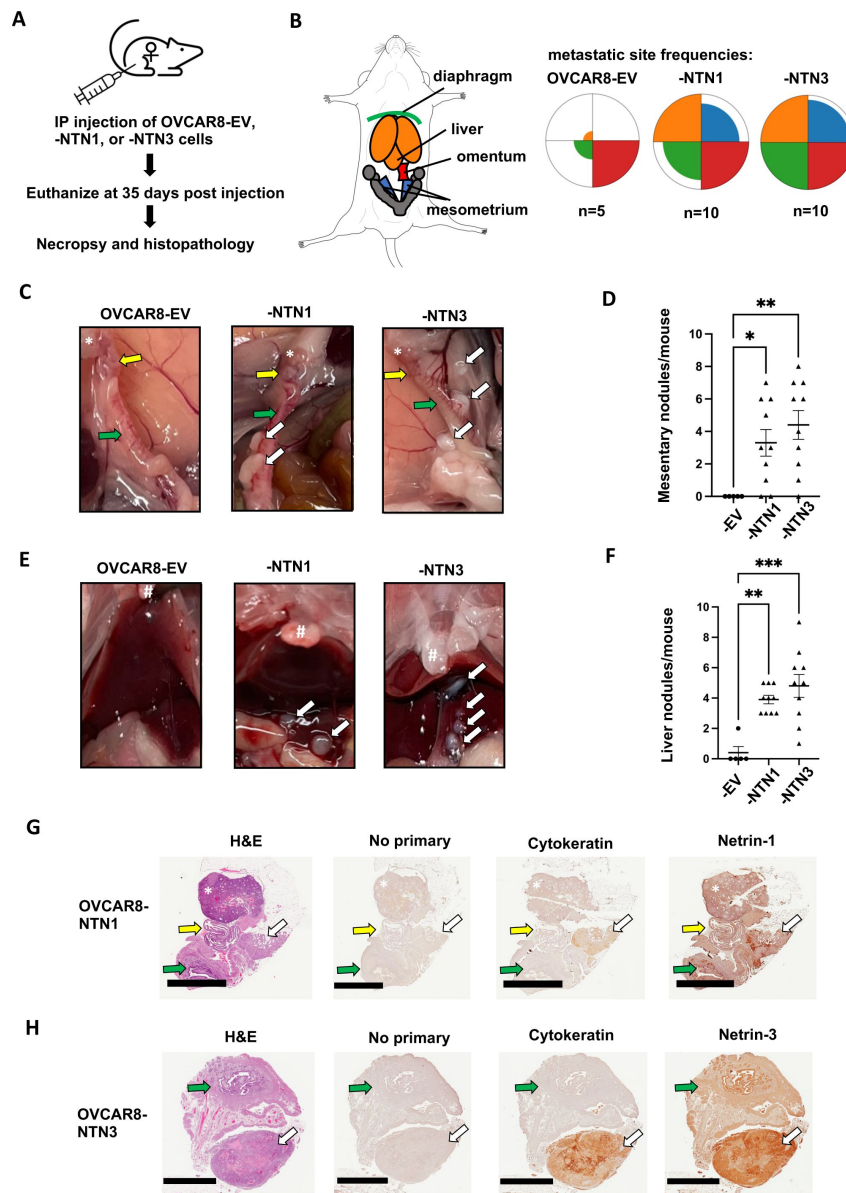


Figure 8.

Netrin overexpression causes increased dissemination of tumor nodules.

A) Netrin overexpressing and control OVCAR8 cells were injected into the intraperitoneal space of female NOD/SCID mice. Mice were euthanized following 35 days and analyzed for disease burden by necropsy and histopathology. **B)** The spread of cancer to the diaphragm, liver, omentum, and mesometrium was determined from necropsies and colors used in the anatomical schematic correspond with petal plots for each genotype of cells. Petal plot radius illustrates frequency of mice bearing disease spread to a particular location. The radius of color fill is proportional to the total number of animals with tumor nodules found in that location. **C)** Photographs of necropsy findings in the mesometrium. Locations of ovaries (*), oviduct (yellow arrow), and uterine horn (green arrow) are indicated in each case. Tumor nodules are indicated by white arrows. **D)** The number of mesometrium associated tumor nodules was determined for each mouse. Mean values are indicated and differences between genotype were determined by one way anova (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). **E)** Photographs of necropsy findings in the liver. Location of sternum is indicated (#) in each image. Tumor nodules are indicated by white arrows. **F)** The number of liver associated tumor nodules was determined for each mouse. Mean values are indicated and differences between genotype were determined by one way anova (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). **G** and **H)** Histology of mesometrial tumor nodules are shown. Serial sections were stained with H&E, or with the indicated antibodies for immunohistochemistry. Ovaries are indicated (*), as are the oviduct (yellow arrow), the uterus (green arrow), and the tumor nodule (white arrow). Scale bar = 2mm

characterized by low phospho-ERK levels (3 [↗](#), 6 [↗](#)), indicating low MEK activity, however low levels of RAS-MAPK signaling are known to provide survival signals (45 [↗](#)). A challenge with deploying MEK inhibitors as an anti-dormancy setting in HGSOc therapy is its incompatibility with standard chemotherapies that rely on cell proliferation. Overall, our study aimed to identify potential new therapeutic targets in dormancy and Netrins and MEK are potential new candidates for dormant HGSOc disease.

Current literature offers little to connect Netrins with HGSOc beyond the observation that *NTN1* expression is increased in tumors compared to benign lesions (49 [↗](#)). Similarly, dormancy literature does not include a role for Netrins (3 [↗](#)–6 [↗](#), 50 [↗](#)). However, we expect that Netrin signaling may play an unappreciated role in dormancy in other cancer disease site paradigms. As stated in the introduction, dormancy is characterized by acquisition of stem like properties, EMT, and in most paradigms it involves rare cells establishing themselves in perivascular or bone marrow niches and Netrins have also been implicated in these processes (51 [↗](#)–55 [↗](#)). Inhibition of Netrin-1 with NP137 and treatment with decitabine has been shown to reduce lung seeding suggesting that Netrins are relevant in a metastatic scenario that may include dormant intermediate steps in dissemination (56 [↗](#)). Furthermore, Netrin signaling through UNC5B is known to direct vascular branching (57 [↗](#)). This suggests that Netrins are available in the perivascular niche where dormant cells often reside. Lastly, Netrin-1 has been shown to be a component of the bone marrow niche that suppresses hematopoietic stem cell proliferation (51 [↗](#)). While not a cancer dormancy scenario, it indicates that Netrins support some solitary dormant cell properties and are expressed by resident cells in the appropriate dormant cell niches beyond just HGSOc. For these reasons we expect Netrins will have a significant role in tumor dormancy beyond ovarian cancer.

Methods

Cell Lines and Engineering Cas9+ cells

High-grade serous ovarian cancer (HGSOc) cell lines OVCAR3, OVCAR4, OVCAR8, COV318, TOV1946 and iOvCa147 were used in this study. The iOvCa147 cells have previously been characterized and reported (58 [↗](#)). All cell lines were verified by STR analysis. iOvCa147, OVCAR8, and TOV1946 cells were engineered to express Cas9 using pLentiCas9-Blast and clones were isolated. High Cas9 editing efficiency was determined by viability studies using sgRNAs targeting selected fitness genes (PSMD1, PSMD2, EIF3D) and a non-targeting control (LacZ) as previously described (59 [↗](#)).

Lentiviral sgRNA library preparation

HEK293T cells were transfected with the combined A and B components of the GeCKO v2 whole genome library (123,411 sgRNAs in total) along with plasmids encoding lentiviral packaging proteins (60 [↗](#)). Media was collected 2-3 days later, cells and debris were pelleted by centrifugation, and supernatant containing viral particles was filtered through a 0.45 μ m filter and stored at -80°C with 1.1 g/100 mL BSA.

GO-CRISPR screens in iOvCa147, OVCAR8, and TOV1946 cells

Cas9-positive and Cas9-negative cells were separately transduced with lentiviruses at a multiplicity of infection of 0.3 and with a predicted library coverage of >1000-fold. Cells were selected in puromycin and maintained in complete media (DMEM/F12 with 10% FBS, 1% pen-strep-glutamine), containing puromycin in all following steps. More than 10^9 cells were collected and split into three groups consisting of approximately 3.0×10^8 cells. Triplicate samples of 6.2×10^7 cells were saved for sgRNA sequence quantitation (T_0). The remaining cells were seeded at 2.0×10^6 cells/mL in 20 x 10 cm ULA plates. Following 2 days of culture, media containing spheroids was transferred to 10 x 15 cm adherent tissue culture plates. The next day unattached spheroid

cells were collected and re-plated onto additional 15 cm plates. This process was repeated for a total of 5 days to maximally capture viable cells. Attached cells were collected and pooled for DNA extraction (T_p). Genomic DNA was extracted using the QIAmp DNA Blood Maxi Kit (Qiagen, #51194). PCR amplification and barcoding performed as described (Hart paper, Cell, 2015) using NEBNext Q5 Ultra mastermix (NEB, # MO544). PCR products were extracted from agarose using a Monarch DNA Gel Extraction Kit (NEB, # T1020), quantitated and next generation sequencing was performed using an Illumina NextSeq 75 cycle High Output kit on an Illumina NextSeq platform.

TRACS analysis

The library reference file containing a list of all sgRNAs and their sequences (CSV file), raw reads for the pooled sgRNA library (FASTQ files (L_0) and raw reads (FASTQ files) for all T_0 and T_f timepoints and replicates for Cas9-positive and Cas9-negative cells were loaded into TRACS (<https://github.com/developerpuru/TRACS>)(61). TRACS then automatically trimmed the reads using Cutadapt (v1.15), built a Bowtie2 (v2.3.4.1) index and aligned the reads using Samtools (v1.7). TRACS used the MAGeCK read count function (v0.5.6) to generate read counts and incremented all reads by 1 to prevent zero counts and division-by-zero errors. The TRACS algorithm was then run using this read count file to determine the Library Enrichment Score (ES), Initial ES, Final ES and the Enrichment Ratio (ER) for each gene. VisualizeTRACS was used to generate graphs of Initial and Final ratios.

Pathway enrichment analyses

For GO-CRISPR screens and multi-omics comparisons, we used the filtered list of genes obtained using TRACS and performed gene ontology and pathway enrichment analysis using the ConsensusPathDB enrichment analysis test (Release 34 (15.01.2019), <http://cpdb.molgen.mpg.de/>) for top-ranked genes of interest. p_{adj} values and ER values for each gene were used as inputs. The minimum required genes for enrichment was set to 45 and the FDR-corrected p_{adj} value cutoff was set to < 0.01 . The Reactome pathway dataset was used as the reference. For each identified pathway, ConsensusPathDB provides the number of enriched genes and a q value (p_{adj}) for the enrichment. Bar plots were generated in R 3.6.2 using these values to depict the significant pathways identified.

Generating DYRK1A knockout cells

A double cutting CRISPR/Cas9 approach with a pair of sgRNAs (sgRNA A and B) was used to completely excise exon 2 (322 bp region) of *DYRK1A* using a px458 vector (Addgene #48138) that was modified to express the full CMV promoter. PCR primers that flank the targeted region of *DYRK1A* were used to verify deletion. Single-cell clones were generated by limiting dilutions and evaluated for *DYRK1A* status by PCR, western blot, and sequencing. See Supplemental Table 1 for sgRNA and PCR primer sequences.

DYRK1A IP kinase assay

Whole cell lysates from adherent parental iOvCa147 cells and *DYRK1A*^{-/-} cells were extracted using complete RIPA buffer and incubated overnight with DYRK1A antibody (Cell Signaling Technology anti-DYRK1A rabbit antibody #8765). Samples were then washed with buffer and Dynabeads (Thermo Fisher Scientific Dynabeads Protein G #10003D) were added for 2 hours. Samples were then washed with buffer and recombinant Tau protein (Sigma recombinant Tau protein #T0576) and ATP (Sigma #A1852) were added and samples were incubated for 30 minutes at 37°C. 5x SDS was then added and samples were resolved by SDS-PAGE. Antibodies used for western blotting were phosphospecific Tau antibody (Cell Signaling Technology phospho-Tau Ser-404 rabbit antibody #20194) and Tau protein (Cell Signaling Technology anti-Tau rabbit antibody #46687).

RNA preparation and RNA-sequencing

Total RNA was collected from parental iOvCa147 cells and *DYRK1A*^{-/-} cells from 24-hour adherent or 6-hour spheroid conditions using the Monarch Total RNA Miniprep Kit (NEB #T2010S) as described above. RNA was collected in three replicates for each condition (adherent and spheroids). Samples were quantitated using Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) and quality control analysis using Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies #G2939BA) and RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies #5067-1511). Ribosomal RNA removal and library preparation was performed using ScriptSeq Complete Gold Kit (Illumina #BEP1206). High-throughput sequencing was performed on an Illumina NextSeq 500 platform (mid-output, 150-cycle kit).

RNA-seq analyses

Raw FASTQ data was downloaded from Illumina BaseSpace. Reads were aligned using STAR 2.6.1a([62](#)) to the human genome (Homo_sapiens.GRCh38.dna.primary_assembly.fa; sjdbGTFfile: Homo_sapiens.GRCh38.92.gtf) to generate read counts. DESeq2 was run with BEAVR([63](#)) and used to analyze read counts (settings: False discovery rate (FDR): 10%; drop genes with less than 1 reads) to identify differentially expressed genes (\log_2 fold change > 1 for upregulated genes; or \log_2 fold change < -1 for downregulated genes; $p_{\text{adj}} < 0.05$) for the following comparisons: parental iOvCa147 adherent cells vs. parental iOvCa147 spheroid cells; or parental iOvCa147 spheroid cells vs. *DYRK1A*^{-/-} spheroid cells. For RNA-seq, we formed pathway analyses in BEAVR and downloaded the pathway enrichment table to construct bar plots and determine overlapping pathways using R 3.6.2.

Western blots

Adherent cells were washed in 1x PBS and lysed on the plate by the addition of complete RIPA buffer with protease (Cell Signaling Technology #5871S) and phosphatase (Cell Signaling Technologies #5870S) inhibitors and incubated for 5-10 minutes on ice. Spheres were collected by gentle centrifugation at 300 rpm, washed gently in ice cold PBS, centrifuged again and then resuspended in RIPA buffer as above. Samples were then centrifuged at 14,000 RPM at 4°C for 10 minutes. The supernatant liquid for each sample was collected and the pellets re-extracted with RIPA containing the above inhibitor cocktails. Following centrifugation, the supernatants for each treatment were collected and pooled. Protein was determined by Bradford assay. To assess the effect of Netrin 1 on downstream signaling, spheres incubated under non adherent conditions for 5 days were challenged with the addition of 500 ng/ml human recombinant Netrin-1 (R&D Systems #6419-N1-025) for a period of 20 minutes before collection. Lysates were mixed with 5x SDS loading dye buffer and resolved using standard SDS-PAGE protocols. Antibodies used for blotting were p42/44 MAPK (Erk1/2) (Cell Signaling Technology rabbit antibody #4695), Phospho-p44/42 MAPK(Erk1/2) T202/Y204 (Cell Signaling Technology; rabbit antibody #4370), p38 MAPK (Cell Signaling Technology; rabbit antibody #9212), p38 MAPK T180/Y182 (Cell Signaling Technology; rabbit antibody #9211), p130(RBL2, Santa Cruz Biotechnology, rabbit antibody sc-317 discontinued), Ki67 (Abcam rabbit antibody, # ab16667), DYRK1A (Cell Signaling Technology anti-DYRK1A rabbit antibody #8765), Netrin-1 (Abcam rabbit antibody #ab126729), Netrin-3 (Abcam rabbit antibody #ab185200), α -tubulin (Cell Signaling Technology anti- α Tubulin rabbit antibody #2125) and β -actin (Millipore Sigma rabbit antibody #A2066).

RT-qPCR analysis of gene expression

Cells from a minimum of three biological replicates were triturated off the plate using Versene (0.5mM EDTA in PBS), collected, counted and 10^6 cells plated onto Ultra-Low Attachment cell culture dishes (Corning) to induce sphere formation. The spheres were collected after 24 h and RNA extracted using the Monarch Total RNA Miniprep Kit (New England Biolabs #T2010S). RNA was extracted from adherent cells directly from the plate. Extracted RNA was quantitated using a NanoDrop and stored at -80° until used. First strand cDNA was generated from isolated RNA using

the iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, #1708890) and RT-qPCR performed on the resulting cDNA (diluted 5-fold) using the iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, #1708882) and following the manufactures instructions. Reactions were performed in 0.2ml non-skirted low profile 96 well PCR plates (Thermo Scientific, #AD-0700) using a CFX Connect Real Time System thermo-cycler (Bio-Rad).

TCGA patient data analyses

We used the cBioPortal for Cancer Genomics (<https://www.cbioportal.org>)⁽⁶⁴⁾ to analyze Netrin pathway alterations in Ovarian Serous Cystadenocarcinoma patients (TCGA, PanCancer Atlas) for genomic alterations and mRNA expression. OncoPrints were generated for mRNA expression (mean z-score threshold ± 1.5), and mutations and putative copy number alterations for the following genes: *NTN1*, *NTN3*, *NTN4*, *NTN5*, *UNC5A*, *UNC5B*, *UNC5C*, *UNC5D*, *DCC*, *DSCAM*. Survival analysis of *NTN1*, and -3 utilized patients from TCGA, PanCancer Atlas dataset and RNA-seq expression (high expression z-score threshold > 1.2 and low is below 1.2).

Generation of gene knockout cell lines

Gibson Assembly (NEB #E2611) was used to clone sgRNAs sequences derived from the GeCKO v2 library per gene of interest (*NTN1*, *NTN3*, *NTN4*, *NTN5*, *DSCAM*, *DCC*, *NEO1*, *UNC5A*, *UNC5B*, *UNC5C*, *UNC5D*, and *EGFP* control (See Supplemental Table 1 for sgRNA sequences for each)) into lentiCRISPR v2 (Addgene #52961). For individual gene knockouts pooled libraries of up to four sgRNAs were generated. For multiple gene knockouts pooled libraries of two sgRNAs/gene were constructed. To each 20-nucleotide guide (Supplemental table I) was appended the 5' sequence, 5'-TATCTTGTGGAAAGGACGAAACACC-3' and the 3' sequence, 5'-GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAAT-3' (65). A 100 bp fragment was then generated using the forward primer, 5'-GGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCG-3', and reverse primer, 5'-CTAGCCTTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC-3'. The resulting gel purified fragment was quantitated by Qubit and cloned into the lentiviral vector LentiCRISPR-V2 previously digested with BsmBI (New England Biolabs, # R0739) as described (65). To generate virus particles, HEK293T cells were transfected with the assembled plasmid along with plasmids encoding lentiviral packaging proteins. Media was collected after 2-3 days and any cells or debris were pelleted by centrifugation at 500 x g. Supernatant containing viral particles was filtered through a low protein binding 0.45 μ M filter. For each knockout, it was important to ensure that each target cell was transduced with a full complement of guides. To ensure this, the cells were transduced at relatively high MOI. Briefly, 25,000 cells were plated and transduced with fresh HEK293T conditioned media containing virus. While we did not titer the viral preparations for these experiments, previous experience indicated that we could generate sufficiently high virus titers using our protocol. Under these conditions, we found a lack of puromycin sensitive cells following 2-3 days in media containing 2-4 μ g/ml puromycin indicating that every cell received at least one virus particle. Multi-gene knock outs were created through multiple rounds of infection with the relevant culture supernatants followed by one round of puromycin selection.

Generation of gene overexpression cell lines

Plasmids encoding Netrin1 and Netrin3 were obtained from Addgene (Ntn1-Fc-His, #72104 and Ntn3-Fc-His, #72105). Netrin1 was PCR amplified using the forward primer 5'-GCTATCGATATCCCAAACGCCACCATGATGCGCGCTGTGTGGGAGGCGCTG-3' and reverse 5'-GCTATCTCTAGAGGCCTTCTTGCACTTGCCCTTCTTCTCCCG-3' and cloned into the EcoRV/XbaI sites of pcDNA3.1/myc-HisA. For lentiviral expression, pcDNA NTN1 was amplified using the primers, forward 5'-CACTGTAGATCTCCCAAACGCCACCATGATGCGCGCTGTGTGGGAGGCGCTG-3' and, reverse 5'-ACGCGTGAATTCTTATCAACCGGTATGCATATTCAGATCCTTCTGAGAT-3' while NTN3 was amplified from pcDNA NTN3 using, forward 5'-CTCGAGAGATCTGCGGCCGCCACCATGCCTGGCTGGCCCTGG-3' and the same reverse primer as for

NTN1. In this way both constructs carry a C-terminal Myc tag. Both cDNA's were inserted into the BamHI/EcoRI sites of the lentiviral expression vector FUtDWTW (Addgene #22478). Construction of lentiviral particle and transduction into the target cells was as described above.

Spheroid formation and reattachment viability assays

For each targeted gene or cDNA expressed in iOvCa147, OVCAR3, OVCAR4, OVCAR8, COV318, or TOV1946 cells, spheroid viability was assayed as follows: Three to ten biological replicate cultures of knockout cells were cultured for 72 hours in suspension conditions using ULA plasticware (2×10^6 cells per well) to allow spheroid formation. Addition of therapeutics (Trametinib, Selleckchem, #S4484) was made at the time of plating. Spheroids were collected and transferred directly to standard plasticware to facilitate reattachment for 24 hours, or dissociated and mixed with trypan blue. Reattached cells were fixed in 25% methanol in PBS for 3 minutes. Fixed cells were incubated for 30 minutes with shaking in 0.5% crystal violet, 25% methanol in PBS. Plates were carefully immersed in water to remove residual crystal violet and destained in 10% acetic acid in 1x PBS for 1 hour with shaking to extract crystal violet from cells. Absorbance of crystal violet was measured at 590 nm using a microplate reader (Perkin Elmer Wallac 1420).

Xenografts

All animal experiments were approved by the Animal Care Committee at Western University (protocol #2020-039). ARRIVE principles were followed in carrying out xenograft experiments. Female NOD-SCID mice were purchased from JAX (#001303). They were randomly selected prior to being engrafted between six and eight weeks of age with 4×10^6 OVCAR8 control or modified derivatives. Five to ten mice were housed for 14 days, 35 days, or until humane endpoint for each OVCAR8 or modified derivative. Following euthanasia all mice were subjected to a necropsy to analyze disease spread. Tumor lesions were photographed and quantitated by individuals unaware of the genotypes. Abdominal organs and associated tumor lesions were fixed in 10% formalin overnight and transferred to 70% ethanol and later embedded, sectioned and stained as described below. In cases where abdominal washes were performed, an incision was made in the peritoneal membrane and PBS was injected, the abdominal region was agitated and PBS was withdrawn using a P1000 pipet tip and aliquoted for downstream analysis in cell culture and qPCR.

Patient derived spheroids

Patient derived spheroids were isolated from ascites fluid obtained from debulking surgical procedures. These HGSOc samples were obtained with permission and institutional research ethics oversight (Project ID #115904). Spheroids were prepared by filtering the ascites fluid through a 100 μ m mesh filter and washing the captured spheroids from the filter with PBS. The spheres were collected by gravity on ice in PBS, washed twice with ice cold PBS and allowed to settle on ice. Spheres were then fixed for 20 minutes in 10% formalin, washed, and resuspended in PBS before being embedded in paraffin.

Histology and immunohistochemistry

Fixed organs from xenografts or spheroids were embedded in paraffin, sectioned, and stained with H&E using standard methods. For immunohistochemistry, sections were deparaffinized by standard procedures and antigen retrieval was performed in 10mM citrate, pH6.0. The sections were blocked with 10% goat serum/3% BSA/0.3% Triton X-100 and stained with antibodies to Netrin-1 (Abcam #ab126729, 1:200), Cytokeratin (human specific cytokeratin 7 and 8, ZETA Corporation #Z2018ML, 1:200), EpCAM (Cell Signaling Technology, #14452, 1:250), p53 (Cell Signaling Technologies, #2527, 1:125), Netrin-3 (1:250), Ki67 (Cell Signaling Technology, #12202, 1:400) and p130 (RBL2, Santa Cruz Biotechnology, SC-317, 1:150). Netrin-3 antibodies were generated using immunized rabbits and their generation and purification will be published

elsewhere. Primary antibodies were followed with a biotinylated anti-rabbit (Vector Labs, # BA-1000) or anti-mouse (Jackson ImmunoResearch, #115-067-003) IgG as a secondary antibody (1:500). Proteins were visualized using DAB chemistry (ImmPACT DAB, Vector Labs, #SK-4105).

Statistical analyses

Specific statistical tests used are indicated in the figure legends for each experiment. Analysis was done using GraphPad Prism 6.

Materials availability

All previously unpublished reagents created in this study are available on request from the corresponding author.

Data availability

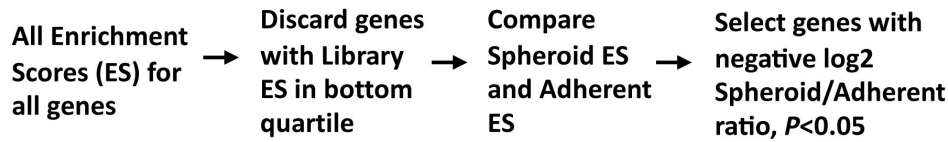
All sequencing data have been deposited in GEO under accession codes GSE190294 and GSE150246. Source data for graphs and original blots are available in source data files, or from public databases as described in the methods section.

References

1. Giancotti FG. (2013) **Mechanisms governing metastatic dormancy and reactivation** *Cell* **155**:750–64
2. Massague J, Ganesh K. (2021) **Metastasis-Initiating Cells and Ecosystems** *Cancer Discov* **11**:971–94
3. Sosa MS, Bragado P, Aguirre-Ghiso JA. (2014) **Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field** *Nat Rev Cancer* **14**:611–22
4. Phan TG, Croucher PI. (2020) **The dormant cancer cell life cycle** *Nat Rev Cancer* **20**:398–411
5. Goddard ET, Bozic I, Riddell SR, Ghajar CM. (2018) **Dormant tumour cells, their niches and the influence of immunity** *Nat Cell Biol* **20**:1240–9
6. Yeh AC, Ramaswamy S. (2015) **Mechanisms of Cancer Cell Dormancy--Another Hallmark of Cancer?** *Cancer Res* **75**:5014–22
7. Correa RJ, Peart T, Valdes YR, DiMattia GE, Shepherd TG. (2012) **Modulation of AKT activity is associated with reversible dormancy in ascites-derived epithelial ovarian cancer spheroids** *Carcinogenesis* **33**:49–58
8. Lengyel E, Burdette JE, Kenny HA, Matei D, Pilrose J, Haluska P, et al. (2014) **Epithelial ovarian cancer experimental models** *Oncogene* **33**:3619–33
9. Hu J, Nakhla H, Friedman E. (2011) **Transient arrest in a quiescent state allows ovarian cancer cells to survive suboptimal growth conditions and is mediated by both Mirk/dyrk1b and p130/RB2** *Int J Cancer* **129**:307–18

A

TRACS (Toolset for the Ranked Analysis of GO-CRISPR Screens) algorithm:



B

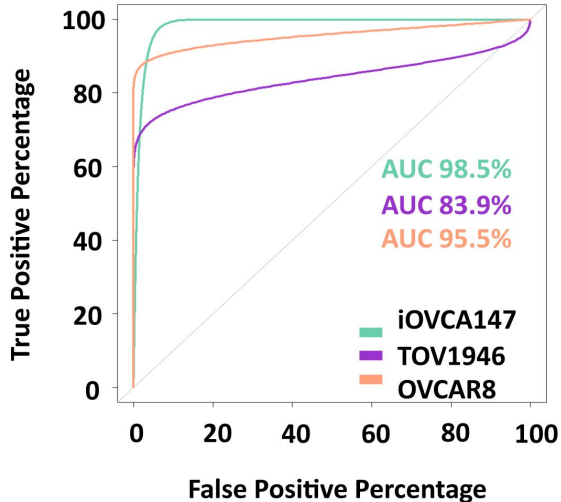
Gene scoring formula

$$\text{Gene score: } GS_j = \sum_{i=1}^s \left(\log_2 \frac{[\text{normalized sgRNA abundance}]_{\text{Cas9+}}}{[\text{avg normalized sgRNA abundance}]_{\text{Cas9-}}} \right)$$

$$\text{Enrichment score: } ES_j = \frac{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n GS \text{ rank}}{s}$$

$$\text{Enrichment ratio: } ER_j = \log_2 \frac{ES_{j_{\text{final}}}}{ES_{j_{\text{initial}}}}$$

C



D

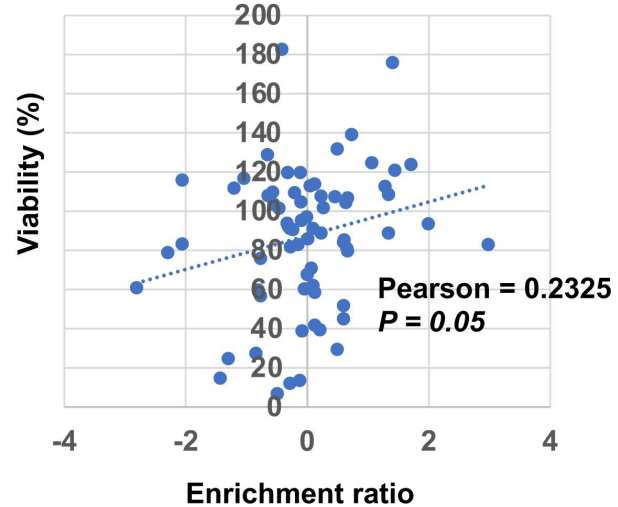


Figure 1 - Figure Supplement 1.

CRISPR screen analysis details and internal controls.

A) Flowchart of data analysis used to identify genes that are most relevant to ovarian cancer cell survival in suspension. **B)** Mathematical formulas to define gene scores, enrichment scores (n =guides per gene), and enrichment ratios used by TRACS. **C)** Receiver-operator curves were generated to assess TRACS categorization of 1000 non-targeting control sgRNAs in the GeCKOv2 library for each of the three cell lines screened. **D)** Spheroid cell viability levels from low throughput siRNA gene knock downs for 35 genes in iOvCa147 and OVCAR8 cells was plotted against the enrichment ratio for the same genes in the same two cell lines from this screen. These independent approaches to measure viability were compared using linear regression.

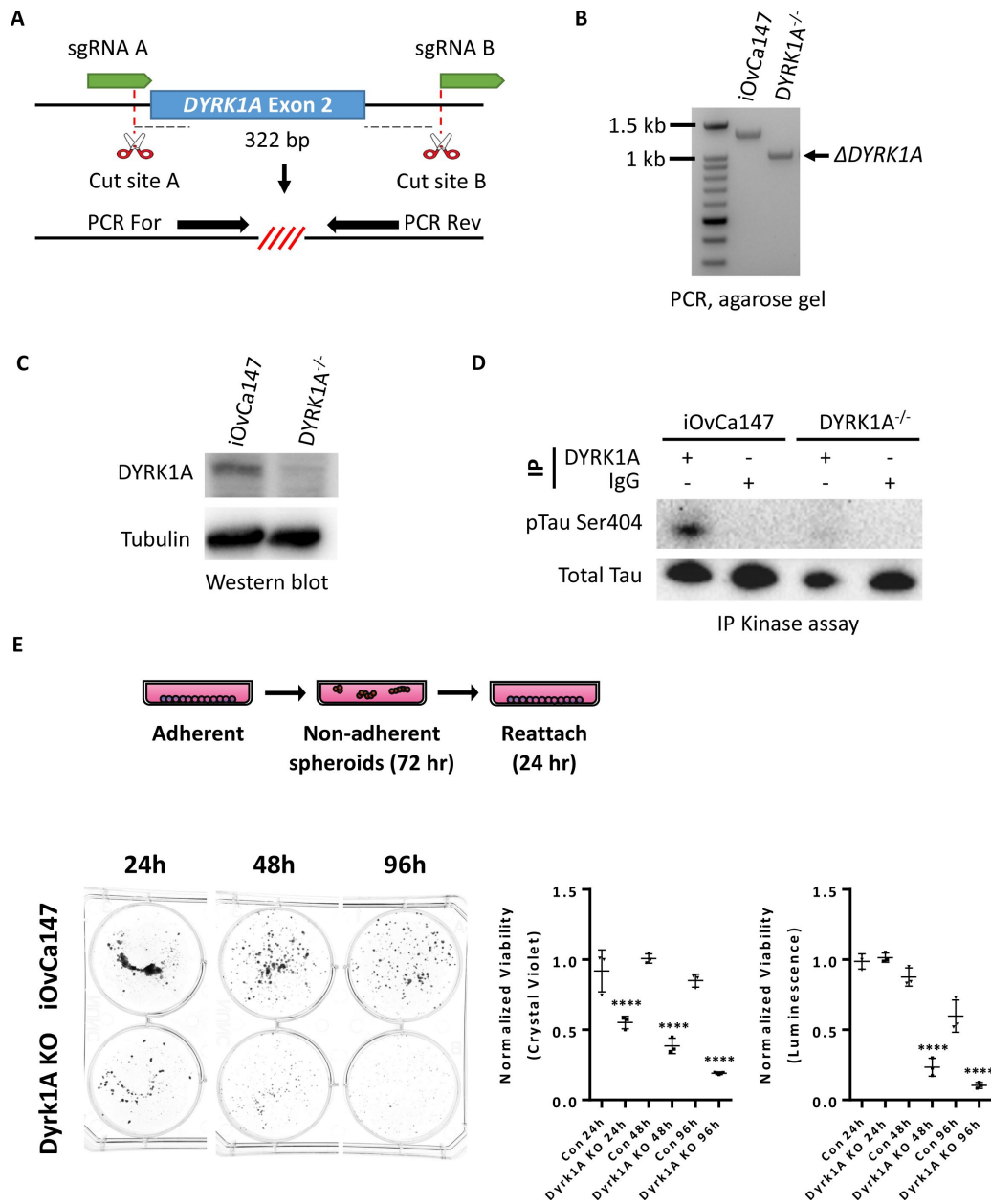


Figure 2 - Figure Supplement 1.

Generation of iOvCa147 cells deficient for DYRK1A and loss of viability in suspension.

A) Strategy to generate *DYRK1A*^{-/-} cells using a pair of sgRNAs that flank exon 2. PCR For and PCR Rev primers flank exon 2 and are used to detect deletion events. **B)** Agarose gel showing PCR products for iOvCa147 cells and putative *DYRK1A*^{-/-} cells. The full length amplicon containing exon 2 was detected in parental iOvCa147 cells (1,348 bp). A smaller amplicon (1,026 bp) was detected in *DYRK1A*^{-/-} cells, indicating successful excision of the 322 bp region encompassing exon 2. **C)** Western blot comparing DYRK1A expression in iOvCa147 cells and *DYRK1A*^{-/-} cells. **D)** IP kinase assay to evaluate DYRK1A activity in *DYRK1A*^{-/-} cells. Anti-DYRK1A antibodies or IgG was used to immunoprecipitate from iOvCa147 and *DYRK1A*^{-/-} cells. Precipitates were incubated with ATP and Tau protein. Samples were resolved by SDS-PAGE and probed with pSer404-Tau antibody. **E)** Parental iOvCa147 or *DYRK1A*^{-/-} cells were incubated in suspension conditions for 24 hours, 72 hours, or 4 days to induce spheroid formation, and then re-plated in adherent conditions for 24 hours to allow reattachment. Reattached spheroid cells were stained with crystal violet and absorbance was quantified. Alternatively, cells in suspension were isolated and utilized for Cell TitreGLO cell viability measurements. *DYRK1A*^{-/-} spheroid cells had impaired survival compared to parental iOvCa147 spheroid cells at each time point and reattached and crystal violet stained cell viability matched Cell TitreGLO measurements of viability (one way anova, ****P<0.0001).

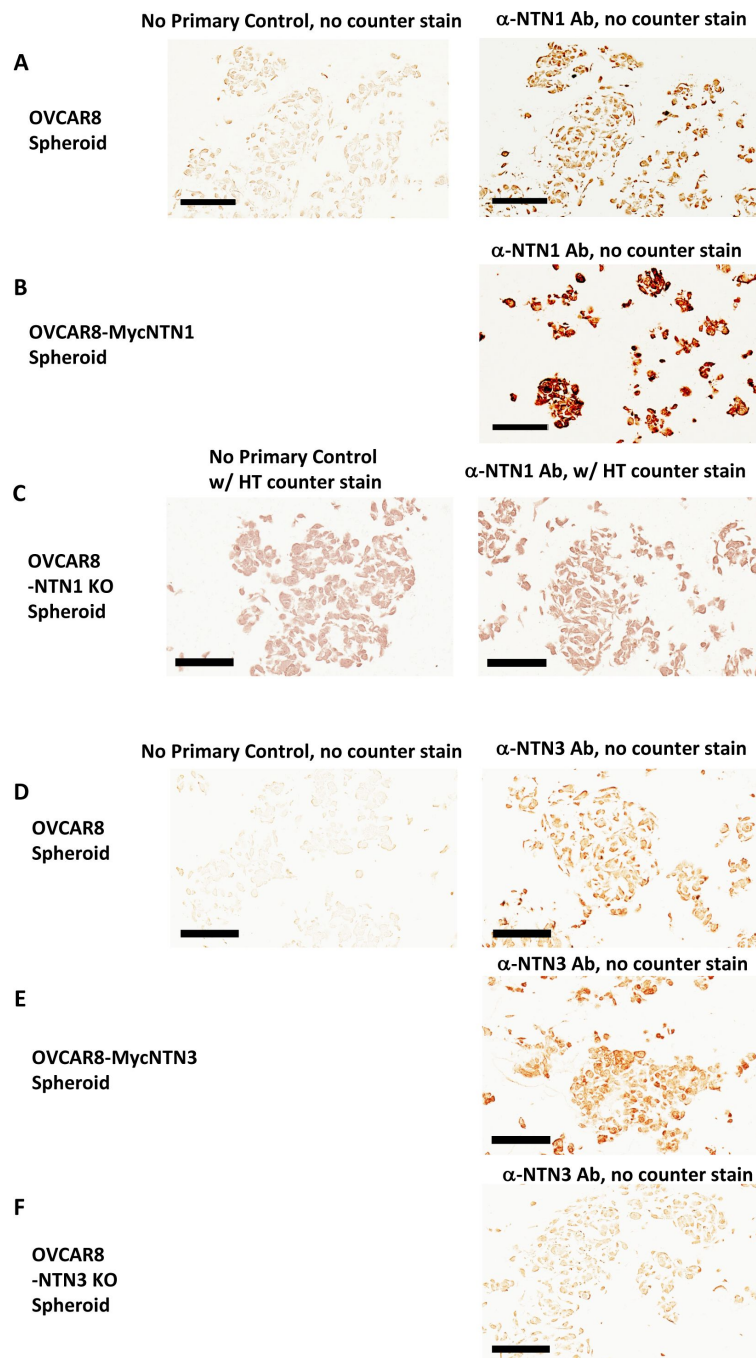


Figure 4 - Figure Supplement 1.

Specificity of Netrin-1 and Netrin-3 IHC staining of OVCAR8 spheroids.

A) OVCAR8 cells were allowed to form spheroids for six hours before fixation in formalin and embedding in paraffin for sectioning. Serial sections were stained with Netrin-1 Abs or a no primary antibody control. **B)** OVCAR8 cells overexpressing Netrin-1 were used to prepare spheroids as in A and stained in parallel to samples in A. **C)** OVCAR8 deleted for Netrin-1 expression were used to prepare spheroids as in A and serial sections were stained for Netrin-1 or with a no primary antibody control and counter stained. **D)** OVCAR8 cells were allowed to form spheroids for six hours before fixation in formalin and embedding in paraffin for sectioning. Serial sections were stained with Netrin-3 Abs or a no primary antibody control. **E)** OVCAR8 cells overexpressing Netrin-3 were used to prepare spheroids as in D and stained in parallel to samples in D. **F)** OVCAR8 deleted for Netrin-3 expression were used to prepare spheroids as in D and serial sections were stained for Netrin-3 or with a no primary antibody control. All scale bars = 100µm

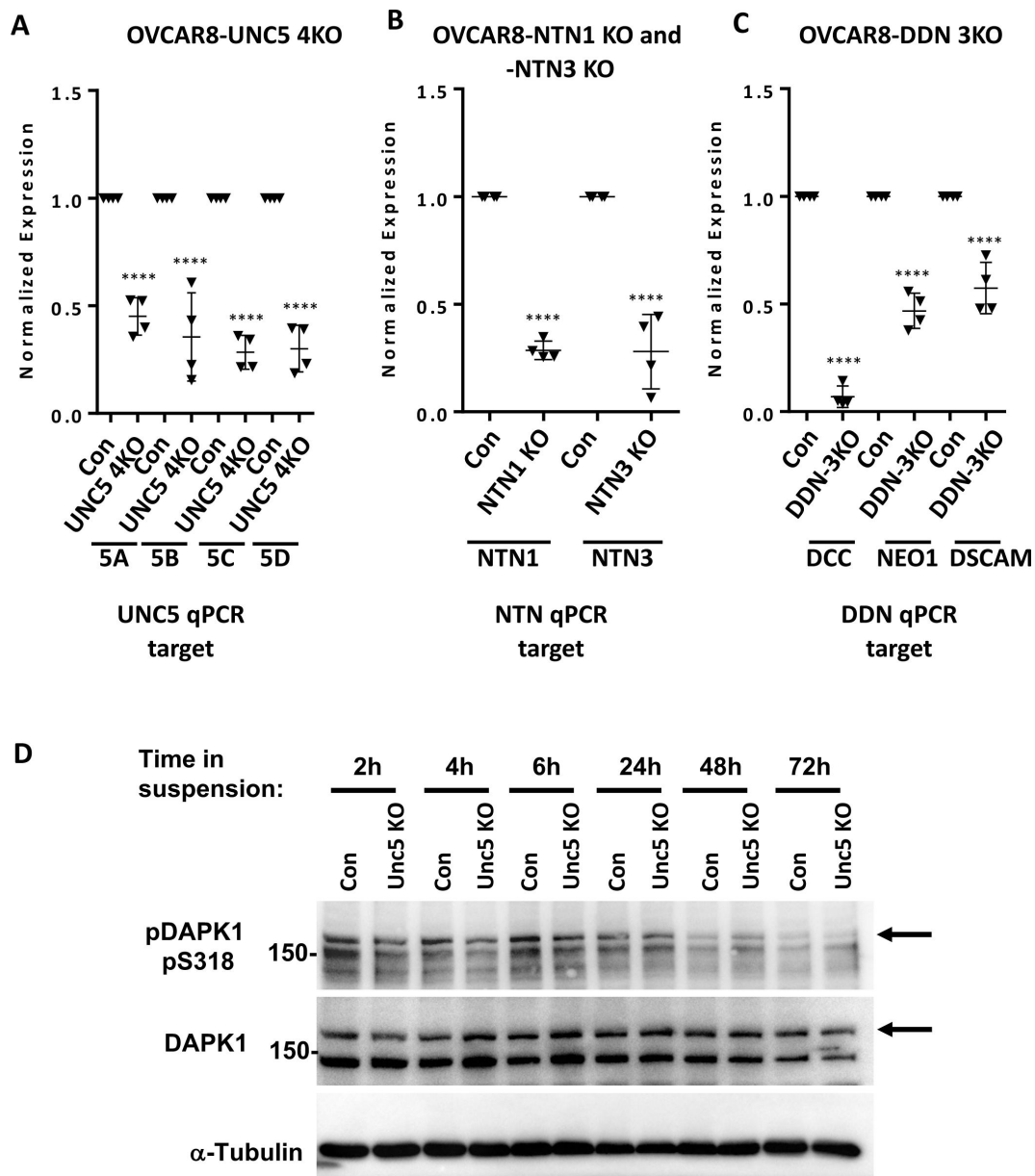


Figure 5 - Figure Supplement 1.

Evaluation of target gene transcript levels in multigene knock out cells.

A) RT-qPCR was performed on RNA isolated from control sgRNA expressing OVCAR8 cells and UNC5 4KO to assess expression of UNC5 family members. Graphs depict relative expression levels for each indicated gene in control and knock out cell lines. Mean expression levels of targeted cells were compared to background measurements using one way anova (****P<0.0001). **B)** RT-qPCR was used to measure mRNA levels of NTN1 and NTN3 transcripts in their respective CRISPR targeted, and OVCAR8 controls. Mean values were compared by one way anova (****P<0.0001). **C)** Levels of mRNA corresponding to DCC, DSCAM, and NEO1 were determined by RT-qPCR in DDN 3KO cells and control OVCAR8. Mean values were compared by one way anova (****P<0.0001). **D)** The indicated genotypes of cells were subjected to suspension culture and protein extracts were prepared at the indicated times. Proteins were resolved by SDS-PAGE, blotted, and probed with the indicated antibodies.

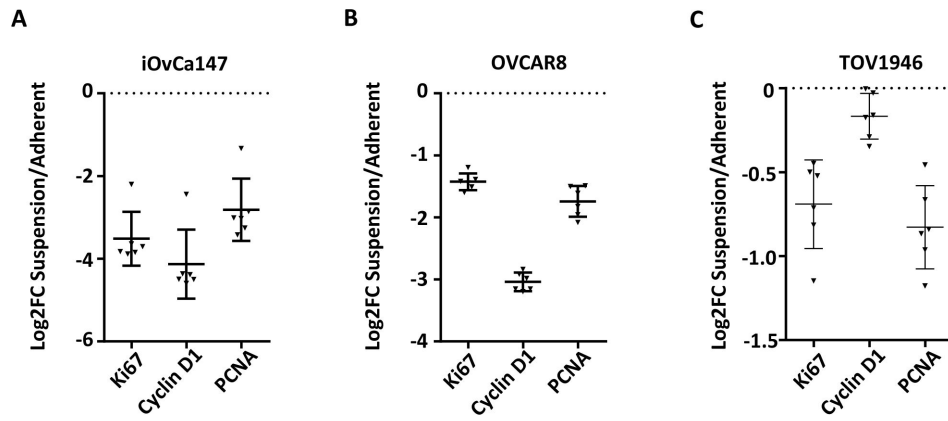


Figure 6 - Figure Supplement 1.

Evaluation of dormancy arrest in cell culture by RT-qPCR.

RNA was extracted from asynchronously proliferating cells and suspension cultures 72 hours post transfer from adherent. RT-qPCR was used to compare gene expression of the indicated cell cycle markers in iOvCa147, OVCAR8, TOV1946.

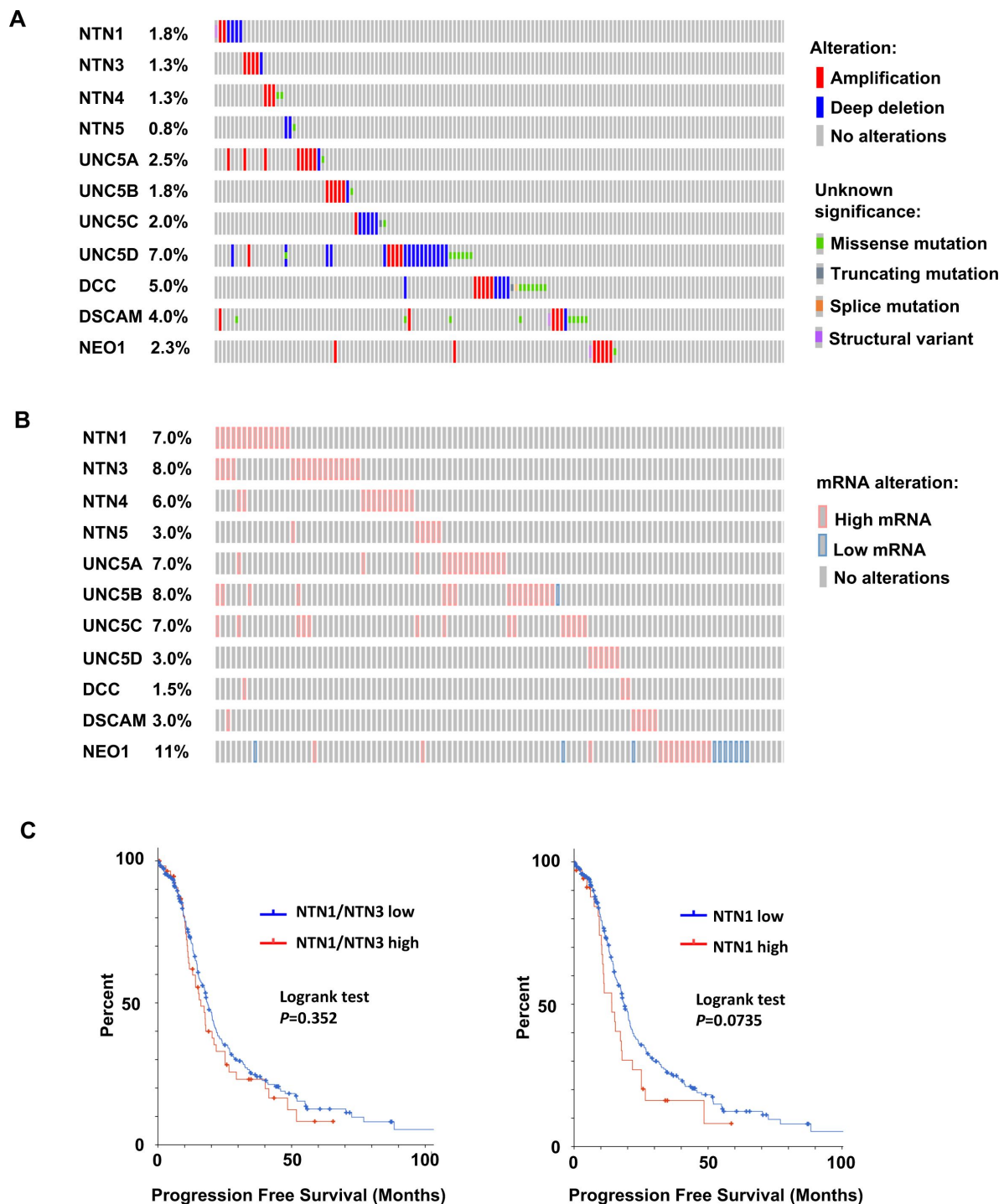


Figure 7 - Figure Supplement 1.

Frequency of Netrin ligand and receptor deletions, mutations or expression changes in high grade serous ovarian cancer.

A) Oncoprint of genetic alterations in 10 netrin signaling related genes in 398 patients. Alteration types are defined on the right. Only the first 154 patients are shown. **B)** Oncoprint illustrating gene expression outliers among 10 netrin signaling related genes in 201 patients (first 122 patients shown). Genomic data used is from Ovarian Serous Cystadenocarcinoma (TCGA, PanCancer Atlas) (201 samples with RNA seqV2, z-score cut off of 1.5). **C)** TCGA RNA-seq data for HGSOC patients (TCGA PanCancer Atlas study) was used to identify high Netrin-1 or -3 and low Netrin-1 or -3 expressing patients (high expressing are above z-score 1.2). Progression free survival was used to construct Kaplan-Meier plots and survival was compared using a logrank test.

10. MacDonald J, Ramos-Valdes Y, Perampalam P, Litovchick L, DiMattia GE, Dick FA. (2017) **A Systematic Analysis of Negative Growth Control Implicates the DREAM Complex in Cancer Cell Dormancy** *Mol Cancer Res* **15**:371–81
11. Correa RJ, Valdes YR, Peart TM, Fazio EN, Bertrand M, McGee J, et al. (2014) **Combination of AKT inhibition with autophagy blockade effectively reduces ascites-derived ovarian cancer cell viability** *Carcinogenesis* **35**:1951–61
12. Correa RJ, Valdes YR, Shepherd TG, DiMattia GE. (2015) **Beclin-1 expression is retained in high-grade serous ovarian cancer yet is not essential for autophagy induction in vitro** *Ovarian Res* **8**
13. Shepherd TG, Dick FA. (2022) **Principles of dormancy evident in high-grade serous ovarian cancer** *Cell Div* **17**
14. Lheureux S, Gourley C, Vergote I, Oza AM. (2019) **Epithelial ovarian cancer** *Lancet* **393**:1240–53
15. Lengyel E. (2010) **Ovarian cancer development and metastasis** *Am J Pathol* **177**:1053–64
16. Bowtell DD, Bohm S, Ahmed AA, Aspuria PJ, Bast RC, Beral V, et al. (2015) **Rethinking ovarian cancer II: reducing mortality from high-grade serous ovarian cancer** *Nat Rev Cancer* **15**:668–79
17. Peart T, Ramos Valdes Y, Correa RJ, Fazio E, Bertrand M, McGee J, et al. (2015) **Intact LKB1 activity is required for survival of dormant ovarian cancer spheroids** *Oncotarget* **6**:22424–38
18. Buensuceso A, Ramos-Valdes Y, DiMattia GE, Shepherd TG. (2019) **AMPK-Independent LKB1 Activity Is Required for Efficient Epithelial Ovarian Cancer Metastasis** *Mol Cancer Res*
19. Chen MW, Yang ST, Chien MH, Hua KT, Wu CJ, Hsiao SM, et al. (2017) **The STAT3-miRNA-92-Wnt Signaling Pathway Regulates Spheroid Formation and Malignant Progression in Ovarian Cancer** *Cancer Res* **77**:1955–67
20. Osterman CJ Diaz, Ozmadenci D, Kleinschmidt EG, Taylor KN, Barrie AM, Jiang S, et al. (2019) **FAK activity sustains intrinsic and acquired ovarian cancer resistance to platinum chemotherapy** *Elife* **8**
21. Rajasekharan S, Kennedy TE. (2009) **The netrin protein family** *Genome Biol* **10**
22. Kryza D, Wischhusen J, Richaud M, Hervieu M, Sidi Boumedine J, Delcros JG, et al. (2023) **From netrin-1-targeted SPECT/CT to internal radiotherapy for management of advanced solid tumors** *EMBO Mol Med* **15**
23. Mehlen P, Delloye-Bourgeois C, Chedotal A. (2011) **Novel roles for Slits and netrins: axon guidance cues as anticancer targets?** *Nat Rev Cancer* **11**:188–97
24. Arakawa H. (2004) **Netrin-1 and its receptors in tumorigenesis** *Nat Rev Cancer* **4**:978–87
25. Brisset M, Grandin M, Bernet A, Mehlen P, Hollande F. (2021) **Dependence receptors: new targets for cancer therapy** *EMBO Mol Med* **13**

26. Forcet C, Stein E, Pays L, Corset V, Llambi F, Tessier-Lavigne M, et al. (2002) **Netrin-1-mediated axon outgrowth requires deleted in colorectal cancer-dependent MAPK activation** *Nature* **417**:443–7
27. Larrieu-Lahargue F, Welm AL, Thomas KR, Li DY. (2010) **Netrin-4 induces lymphangiogenesis in vivo** *Blood* **115**:5418–26
28. Yin K, Wang L, Zhang X, He Z, Xia Y, Xu J, et al. (2017) **Netrin-1 promotes gastric cancer cell proliferation and invasion via the receptor neogenin through PI3K/AKT signaling pathway** *Oncotarget* **8**:51177–89
29. Llambi F, Lourenco FC, Gozuacik D, Guix C, Pays L, Del Rio G, et al. (2005) **The dependence receptor UNC5H2 mediates apoptosis through DAP-kinase** *EMBO J* **24**:1192–201
30. Castets M, Coissieux MM, Delloye-Bourgeois C, Bernard L, Delcros JG, Bernet A, et al. (2009) **Inhibition of endothelial cell apoptosis by netrin-1 during angiogenesis** *Dev Cell* **16**:614–20
31. Bruikman CS, Zhang H, Kemper AM, van Gils JM. (2019) **Netrin Family: Role for Protein Isoforms in Cancer** *J Nucleic Acids* **39**:47123
32. Jiang S, Richaud M, Vieugue P, Rama N, Delcros JG, Siouda M, et al. (2021) **Targeting netrin-3 in small cell lung cancer and neuroblastoma** *EMBO Mol Med* **13**
33. Shepherd TG, Theriault BL, Campbell EJ, Nachtigal MW. (2006) **Primary culture of ovarian surface epithelial cells and ascites-derived ovarian cancer cells from patients** *Nat Protoc* **1**:2643–9
34. Litovchick L, Chestukhin A, DeCaprio JA. (2004) **Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates RBL2/p130 during quiescence** *Molecular and cellular biology* **24**:8970–80
35. Zanoni M, Piccinini F, Arienti C, Zamagni A, Santi S, Polico R, et al. (2016) **3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained** *Sci Rep* **6**
36. Di Vona C, Bezdán D, Islam AB, Salichs E, Lopez-Bigas N, Ossowski S, et al. (2015) **Chromatin-wide profiling of DYRK1A reveals a role as a gene-specific RNA polymerase II CTD kinase** *Mol Cell* **57**:506–20
37. Meijers R, Smock RG, Zhang Y, Wang JH. (2020) **Netrin Synergizes Signaling and Adhesion through DCC** *Trends Biochem Sci* **45**:6–12
38. Network CGA. (2011) **Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma** *Nature* **474**:609–15
39. Ahmed N, Stenvers KL. (2013) **Getting to know ovarian cancer ascites: opportunities for targeted therapy-based translational research** *Front Oncol* **3**
40. Narod S. (2016) **Can advanced-stage ovarian cancer be cured?** *Nat Rev Clin Oncol* **13**:255–61
41. Keyvani V, Farshchian M, Esmaili SA, Yari H, Moghbeli M, Nezhad SK, et al. (2019) **Ovarian cancer stem cells and targeted therapy** *J Ovarian Res* **12**
42. Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, et al. (1990) **Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers** *Science* **247**:49–56

43. Mehlen P, Rabizadeh S, Snipas SJ, Assa-Munt N, Salvesen GS, Bredesen DE. (1998) **The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis** *Nature* **395**:801–4
44. Boussouar A, Tortereau A, Manceau A, Paradisi A, Gadot N, Vial J, et al. (2020) **Netrin-1 and Its Receptor DCC Are Causally Implicated in Melanoma Progression** *Cancer Res* **80**:747–56
45. Downward J. (2003) **Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy** *Nat Rev Cancer* **3**:11–22
46. Barbosa R, Acevedo LA, Marmorstein R. (2021) **The MEK/ERK Network as a Therapeutic Target in Human Cancer** *Mol Cancer Res* **19**:361–74
47. Flaherty KT, Infante JR, Daud A, Gonzalez R, Kefford RF, Sosman J, et al. (2012) **Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations** *N Engl J Med* **367**:1694–703
48. Chen J, Du H, Zhang Y, Chen H, Zheng M, Lin P, et al. (2017) **Netrin-1 Prevents Rat Primary Cortical Neurons from Apoptosis via the DCC/ERK Pathway** *Front Cell Neurosci* **11**
49. Papanastasiou AD, Pampalakis G, Katsaros D, Sotiropoulou G. (2011) **Netrin-1 overexpression is predictive of ovarian malignancies** *Oncotarget* **2**:363–7
50. Recasens A, Munoz L. (2019) **Targeting Cancer Cell Dormancy** *Trends Pharmacol Sci* **40**:128–41
51. Renders S, Svendsen AF, Panten J, Rama N, Maryanovich M, Sommerkamp P, et al. (2021) **Niche derived netrin-1 regulates hematopoietic stem cell dormancy via its receptor neogenin-1** *Nat Commun* **12**
52. Ozmadenci D, Feraud O, Markossian S, Kress E, Ducarouge B, Gibert B, et al. (2015) **Netrin-1 regulates somatic cell reprogramming and pluripotency maintenance** *Nat Commun* **6**
53. Lengrand J, Pastushenko I, Vanuytven S, Song Y, Venet D, Sarate RM, et al. (2023) **Pharmacological targeting of netrin-1 inhibits EMT in cancer** *Nature* **620**:402–8
54. Ducarouge B, Redavid AR, Victoor C, Chira R, Fonseca A, Hervieu M, et al. (2023) **Netrin-1 blockade inhibits tumor associated Myeloid-derived suppressor cells, cancer stemness and alleviates resistance to chemotherapy and immune checkpoint inhibitor** *Cell Death Differ*
55. Cassier PA, Navaridas R, Bellina M, Rama N, Ducarouge B, Hernandez-Vargas H, et al. (2023) **Netrin-1 blockade inhibits tumour growth and EMT features in endometrial cancer** *Nature* **620**:409–16
56. Grandin M, Meier M, Delcros JG, Nikodemus D, Reuten R, Patel TR, et al. (2016) **Structural Decoding of the Netrin-1/UNC5 Interaction and its Therapeutical Implications in Cancers** *Cancer Cell* **29**:173–85
57. Lu X, Le Noble F, Yuan L, Jiang Q, De Lafarge B, Sugiyama D, et al. (2004) **The netrin receptor UNC5B mediates guidance events controlling morphogenesis of the vascular system** *Nature* **432**:179–86
58. Tong JG, Valdes YR, Sivapragasam M, Barrett JW, Bell JC, Stojdl D, et al. (2017) **Spatial and temporal epithelial ovarian cancer cell heterogeneity impacts Maraba virus oncolytic potential** *BMC Cancer* **17**

59. Hart T, Chandrashekhar M, Aregger M, Steinhart Z, Brown KR, MacLeod G, et al. (2015) **High-Resolution CRISPR Screens Reveal Fitness Genes and Genotype-Specific Cancer Liabilities** *Cell* **163**:1515–26
60. Sanjana NE, Shalem O, Zhang F. (2014) **Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening** *Nat Methods* **11**:783–4
61. Perampalam P, MacDonald JI, Dick FA. (2020) **GO-CRISPR; a highly controlled workflow to discover gene essentiality** <https://doi.org/10.1101/2020.06.04.134841>
62. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. (2013) **STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner** *Bioinformatics* **29**:15–21
63. Perampalam P, Dick FA. (2020) **BEAVR: a browser-based tool for the exploration and visualization of RNA-seq data** *BMC Bioinformatics* **21**
64. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. (2012) **The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data** *Cancer Discov* **2**:401–4
65. Wang T, Lander ES, Sabatini DM. (2016) **Large-Scale Single Guide RNA Library Construction and Use for CRISPR-Cas9-Based Genetic Screens** *Cold Spring Harb Protoc* **3**

Editors

Reviewing Editor

Ivan Topisirovic

Jewish General Hospital, Montreal, Canada

Senior Editor

Erica Golemis

Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, United States of America

Joint Public Review:

In this article, the authors employed modified CRISPR screens ["guide-only (GO)-CRISPR"] in the attempt to identify the genes which may mediate cancer cell dormancy in the high grade serous ovarian cancer (HGSOC) spheroid culture models. Using this approach, they observed that abrogation of several of the components of the netrin (e.g., DCC, UNC5Hs) and MAPK pathways compromise survival of non-proliferative ovarian cancer cells. This strategy was complemented by the RNAseq approach which revealed that number of the components of the netrin pathway are upregulated in non-proliferative ovarian cancer cells, and that their overexpression is lost upon disruption of DYRK1A kinase that has been previously demonstrated to play a major role in survival of these cells. Perampalam et al. then employed a battery of cell biology approaches to support the model whereby the Netrin signaling governs the MEK-ERK axis to support survival of non-proliferative ovarian cancer cells. Moreover, the authors show that overexpression of Netrins 1 and 3 bolsters dissemination of ovarian cancer cells in the xenograft mouse model, while also providing evidence that high levels of the aforementioned factors are associated with poor prognosis of HGSOC patients.

Strengths:

In this valuable study Perampalam et al. developed a CRISPR-based screening approach to identify key genes that are enriched in high grade serous ovarian cancer spheroids. This led to a discovery that Netrin signaling plays a prominent role in survival of ovarian cancer cells.

During revision, the authors provide additional evidence to support their central claims and to this end, it was found that they now provide solid evidence to substantiate the proposed model. This work is anticipated to be of interest to cancer biologists specializing in ovarian cancer biology.

<https://doi.org/10.7554/eLife.91766.2.sa0>

Author response:

The following is the authors' response to the original reviews.

Reviewer #1 (Public Review):

Summary:

Perampalam et al. describe novel methods for genome-wide CRISPR screening to identify and validate genes essential for HGSOc spheroid viability. In this study, they report that Netrin signaling is essential for maintaining disseminated cancer spheroid survival, wherein overexpression of Netrin pathway genes increases tumor burden in a xenograft model of ovarian cancer. They also show that high netrin expression correlates with poor survival outcomes in ovarian cancer patients. The study provides insights into the biology of netrin signaling in DTC cluster survival and warrants development of therapies to block netrin signaling for treating serous ovarian cancer.

Strengths:

- The study identifies Netrin signaling to be important in disseminated cancer spheroid survival*
- A Novel GO-CRISPR methodology was used to find key genes and pathways essential for disseminated cancer cell survival*

Thanks for the endorsement of our work and its importance to metastasis in ovarian cancer.

Weaknesses:

- The term dormancy is not fully validated and requires additional confirmation to claim the importance of Netrin signaling in "dormant" cancer survival.*
- Findings shown in the study largely relate to cancer dissemination and DTS survival rather than cancer dormancy.*

Much of the validation of dormancy and cell cycle arrest in HGSOc spheroids, as well as the culture model, have been published previously and hence was not repeated here. I think this reviewer will appreciate the updated citations and explanations to better illustrate the state of knowledge. We have also added new experiments that further emphasize the dormant state of spheroid cells in culture and xenografts, as well as patient derived spheroids used in this study.

Reviewer #1 (Recommendations for Authors):

(1) It is unclear what spheroid/adherent enrichment ratio is and how it ties into genes affecting cell viability. Why is an ER below 1 the criteria for selecting survival genes?

Our screen uses the 'guide only' comparison in each culture condition to establish a gene score under that specific condition. A low adherent score captures genes that are essential

under standard culture conditions where cells are proliferating and this can include genes needed for proliferation or other basic functions in cell physiology. A low spheroid score identifies the genes that are most depleted in suspension when cells are growth arrested and this is an indication of cell death in this condition. Since gene knock outs are first established in adherent proliferating conditions, essential genes under these conditions will already start to become depleted from the population before suspension culture. By selecting genes with a ratio of <1 we can identify those that are most relevant to dormant suspension culture conditions. Ultimately, the lowest enrichment ratio scores represent genes whose loss of function is dispensable in the initial adherent condition, but critical for survival in suspension and this is what we aimed to identify. We've updated Figure 1B to illustrate this and we've updated the explanation of the enrichment ratio on page 6, lines 144 to 147 of the results.

(2) The WB for phospho-p38 in figure 1A for OVCAR8 line does not show increased phosphorylation in the spheroid relative to the adherent. If anything, phospho-p38 appears to be reduced in the spheroid. Can the authors provide a better western blot?

We've updated this blot with a longer exposure, see Figure 1A. Phosphorylation levels of p38 are essentially unchanged in OVCAR8 cells in suspension culture, although the overall levels of p38 may be slightly reduced in dormant culture conditions.

(3) How did the authors confirm dormancy apart from western blot for phospho-ERK vs phospho-p38? Authors should add EdU/BrdU staining and/or Ki67 staining to confirm dormancy.

Previous publications that appear as citations 7,10, and 33 in the reference list established the growth arrest state of these cells in suspension culture in the past. This included measuring other known markers of dormancy and quiescence such as p27, p130, and reduced cyclin/cdk activity and 3H-thymidine incorporation. In addition, other associated characteristics of dormancy such as EMT and catabolic metabolism have been demonstrated in these culture conditions (see citation 11 and Rafehi et al. *Endocr. Relat. Cancer* 23;147-59). We've added these additional citations to our descriptions of dormant spheroid culture to better clarify the status of these cells in our experiments (see page 6, lines 126-28). To ensure that cells are growth arrested in the experiments shown in this paper, we have updated Figure 1A to include blots of p130 and Ki67 to further emphasize that spheroid cells are not proliferating as the quiescence marker (p130) is high and the proliferative marker (Ki67) is lost in suspension culture.

(4) Can the authors report spheroid volume over time in culture? How was viability measured?

We've updated the methods (see page 27, line 574) to better highlight the description of cell survival that answers both of these questions. At the ends of experimental time points in both the screen and viability assays we captured live cells by replating on adherent plasticware. We fixed and stained with crystal violet and photographed plates to illustrate the sizes of spheroids (shown in Fig. 2 Supplement 1E, Fig. 6C, and 7D). We subsequently extracted the dye and quantitated it spectrophotometrically to quantitatively compare biomass of viable cells between experiments irrespective of the relatively random shapes of spheroids. We found reattachment and staining in this manner to match traditional viability assays such as CellTiter-Glo in a previous paper (10). Furthermore, biomass never increases in culture and diminishes gradually over time in culture consistent with the non-proliferative state of these experiments. Double checks of this equivalency of viability and reattached biomass measurements, as well as demonstrating that biomass is lost over time, are shown in Fig. 2 Supplement 1E that compares reattached crystal violet staining measurements with CellTiter-

Glo for DYRK1A knock out cells over time in culture. In addition, we include a comparison of crystal violet staining of reattached spheroids with trypan blue dye exclusion in Fig. 5G and H. In both cases reattachment and more direct viability assays demonstrate the same conclusion that Netrin signaling supports viability in dormant culture.

(5) Please show survival significance of Netrin signaling genes in recurrence/relapse free survival to claim importance in cancer dormancy.

See Fig. 7 Supplement 1C where we include the recurrence free survival data. Netrin-1, and -3 high expressors also have a numerically shorter progression free survival but it is not statistically significant. Netrin-1 overexpression alone is also shown and it shows shorter survival with a P-value of 0.0735. Elevated survival of dormant cells in a residual disease state is expected to increase the chance of relapse and shorten this interval. Thus, this data is consistent with our model, but lacks statistical significance.

There are many alternative ways to interpret what shorter progression free survival, or overall survival, may mean biologically. Since survival of dormant cells is but one of them, we also added new data to experimentally investigate the role of endogenous Netrin signaling in dormant residual disease in Fig. 6 and described on page 12, lines 266-87. We used xenograft experiments to show OVCAR8 spheroids form and withdraw from the cell cycle equivalently to suspension culture following intraperitoneal injection. Furthermore, loss of Netrin signaling due to receptor deletions compromises survival during this early window before disseminated lesions form. This argues that Netrin signaling contributes to survival during this window of dormancy. In addition, mice engrafted with mutant cells experience prolonged survival when Netrin signaling is blocked. Together, these experiments further argue that Netrin signaling supports survival in the dormant, non-proliferative phase, and leads to reduced survival of mice.

(6) The authors show IHC staining of patient ascites derived HGSOc spheroids. However, no marker for dormancy is shown in these spheroids. Adding Ki67 staining or phospho-ERK vs phospho-p38 would be necessary to confirm cancer dormancy.

We have added new staining for Ki67 and p130 that compares these markers in HGSOc tumors where Ki67 is high and p130 is low with ascites derived spheroids where staining is the opposite. Importantly, expression of p130 is linked to cellular quiescence and is not found to accumulate in the nucleus of cells that are just transiting through G1. This confirms that the ascites derived spheroids are dormant. See Fig. 4A-E and described on page 9, lines 201-7.

(7) Overall, the findings are interesting in the context of cancer dissemination. There is not enough evidence for cancer dormancy and the importance of Netrin signaling in the survival of cancer dormancy. Overexpression of Netrin increases phosphorylation of ERK, leading one to expect an increase in proliferation. This suggests that Netrin breaks cancer cells out of dormancy, into a proliferative state.

We have found that the discovery of Netrin activation of MEK-ERK in growth arrested cells is counterintuitive to many cancer researchers. However, this axis exists in other paradigms of Netrin signaling in axon outgrowth that are not proliferation related (see citation 26, Forcet et al. Nature 417; 443-7 as an example). We have added Fig. 5D and descriptions on page 11, lines 244-52 to better clarify that Netrins CAN'T induce cell proliferation through ERK. Addition of recombinant Netrin-1 can only induce ERK phosphorylation in suspension culture conditions and not in quiescent adherent conditions. The small magnitude of ERK phosphorylation induced by Netrin-1 in suspension compared to treating adherent, quiescent cells with the same concentration of mitogenic EGF further emphasizes that this is not a proliferative signal. Lastly, the new xenograft experiment in Fig. 6A-D (described on page 12,

lines 266-81 demonstrates the growth arrested context in which Netrin signaling in dormant spheroids leads supports viability.

(8) If authors wish to claim cancer dormancy as the premise of their study, additional confirmatory experiments are required to support their claims. Alternatively, based on the current findings of the study, it would be best to change the premise of the article to Netrin signaling in cancer dissemination and survival of disseminated cancer spheroids rather than cancer dormancy.

I expect that this reviewer will agree that we have added more than sufficient explanations of background work on HGSOc spheroid dormancy from the literature, as well as new experiments that address their questions about dormancy in our experiments.

Reviewer #2 (Public Review):

Summary:

In this article, the authors employed modified CRISPR screens ["guide-only (GO)-CRISPR"] in the attempt to identify the genes which may mediate cancer cell dormancy in the high grade serous ovarian cancer (HGSOc) spheroid culture models. Using this approach, they observed that abrogation of several of the components of the netrin (e.g., DCC, UNC5Hs) and MAPK pathways compromise the survival of non-proliferative ovarian cancer cells. This strategy was complemented by the RNAseq approach which revealed that a number of the components of the netrin pathway are upregulated in non-proliferative ovarian cancer cells and that their overexpression is lost upon disruption of DYRK1A kinase that has been previously demonstrated to play a major role in survival of these cells. Perampalam et al. then employed a battery of cell biology approaches to support the model whereby the Netrin signaling governs the MEK-ERK axis to support survival of non-proliferative ovarian cancer cells. Moreover, the authors show that overexpression of Netrins 1 and 3 bolsters dissemination of ovarian cancer cells in the xenograft mouse model, while also providing evidence that high levels of the aforementioned factors are associated with poor prognosis of HGSOc patients.

Strengths:

Overall it was thought that this study is of potentially broad interest in as much as it provides previously unappreciated insights into the potential molecular underpinnings of cancer cell dormancy, which has been associated with therapy resistance, disease dissemination, and relapse as well as poor prognosis. Notwithstanding the potential limitations of cellular models in mimicking cancer cell dormancy, it was thought that the authors provided sufficient support for their model that netrin signaling drives survival of non-proliferating ovarian cancer cells and their dissemination. Collectively, it was thought that these findings hold a promise to significantly contribute to the understanding of the molecular mechanisms of cancer cell dormancy and in the long term may provide a molecular basis to address this emerging major issue in the clinical practice.

Thanks for the kind words about the importance of our work in the broader challenges of cancer treatment.

Weaknesses:

Several issues were observed regarding methodology and data interpretation. The major concerns were related to the reliability of modelling cancer cell dormancy. To this end, it was relatively hard to appreciate how the employed spheroid model allows to distinguish between dormant and e.g., quiescent or even senescent cells. This was in contrast to solid

evidence that netrin signaling stimulates abdominal dissemination of ovarian cancer cells in the mouse xenograft and their survival in organoid culture. Moreover, the role of ERK in mediating the effects of netrin signaling in the context of the survival of non-proliferative ovarian cancer cells was found to be somewhat underdeveloped.

Experiments previously published in citation 7 show that growth arrest in patient ascites derived spheroids is fully reversible and that argued against non-proliferative spheroids being a form of senescence and moved this work into the dormancy field. We have added extensive new support for our model systems and data to address the counterintuitive aspects of MEK-ERK signaling in survival instead of proliferation.

Reviewer #1 Recommendations for Authors

(1) A better characterization of the spheroid model may be warranted, including staining for the markers of quiescence and senescence (including combining these markers with staining for the components of the netrin pathway)

See Figure 1A and page 6, lines 126-36 where we have added blots for Ki67 and p130 to better emphasize the arrested proliferative state of cells in our screening conditions. We have also added these same controls for patient ascites-derived spheroids in Figure 4 and described on page 9, lines 203-7. One realization from this CRISPR screen, and others in our lab, is that it identifies functionally important aspects of cell physiology and not necessarily ones that are easily explored using commercially available antibodies. Netrin-1 and -3 staining of patient derived spheroids in Fig. 4, as well as cell line spheroids stained in Fig. 4 Supplement 1 further support the relevance of this pathway in dormant cancer cells because Netrins are expressed in the right place at the right time. The Netrin-1 stimulation experiments in Fig. 5C were originally carried out to probe HGSOc cells for functionality of Netrin receptors since we couldn't reliably detected them by blotting or staining with available antibodies. This demonstrates that this pathway is active in the various HGSOc cell lines we've used and specifically, using OVCAR8 cells, we show it is only active in suspension culture conditions.

(2) In figure 1A it appears that total p38 levels are reduced in some cell lines in spheroid vs. adherent culture. The authors should comment on this.

These blots have been updated to be more clear. Overall p38 levels may be reduced in some cell lines and when compared with activation levels of phosphorylated p38 it suggests the fraction of activated p38 is higher. OVCAR8 cells may be an exception where the overall activity level remains approximately the same.

(3) The authors should perhaps provide a clearer rationale for choosing to focus on the netrin signaling vs. e.g., GPCR signaling, and consider more explicit defining of "primary" vs. "tertiary" categories in Reactome gene set analysis.

We've updated Fig. 1E and the text on page 7, lines 161-5 to illustrate which gene categories identified in the screen belong to which tiers of Reactome categories. It better visualizes why we have investigated the Axon guidance pathway that includes Netrin because it is a highly specific signaling pathway that scores similarly to the broader and less specific categories at the very top of the list. As an aside, the GPCR signaling and GPCR downstream signaling have proven to be fairly intractable categories. As best we can tell the GPCR downstream signaling category is full of MAPK family members and likely represents some redundancy with MAPK further down.

(4) In figure 3A-C, including factors whose expression did not appear to change between adherent and suspension conditions may be warranted as the internal control. Figure

| *3D-F may benefit from some sort of quantification.*

The mRNA expression levels are normalized to GAPDH as an internal control. We have updated this figure and re-plotted it as fold change relative to adherent culture cells with statistical comparisons to indicate which are significantly upregulated in suspension culture.

The IHC experiments are now in Fig. 4D-F and show positive staining for Netrin-1 and -3. Netrin-3 is easiest to see, while Netrin-1 is trickier because the difference with the no primary antibody control isn't intensity, but the tint of the DAB stain. We had to counter stain the patient spheroids with Hematoxylin in order for the slide scanner to find the best focal plane and make image registration between sections possible. This unfortunately makes the Netrin-1 staining rather subtle. For cell line spheroids in the Fig. 4, Supplement 1 we didn't need the slide scanner and show negative controls without counter stain that are much more convincing of Netrin-1 detection and reassure us that our staining detects the intended target. We've updated the labels in Fig. 4 and Fig. 4, Supplement 1 for this to be more intuitive. Unfortunately, relying on the tint of the DAB stain leaves this as a qualitative experiment.

- In figure 4C-E the authors show that Netrin-1 stimulation induces ERK phosphorylation whereby it is argued that this is a "low-level" stimulation of ERK signaling required for the survival of ovarian cells in the suspension. This is however hard to appreciate, and it was thought that having adherent cells in parallel would be helpful to wage whether this indeed is a "low level" ERK activity. Moreover, the authors should likely include downstream substrates of ERK (e.g., RSKs) as well as p38 in these experiments. The control experiments for the effects of PD184352 on ERK phosphorylation also appear to be warranted. Finally, performing the experiments with PD184352 in the presence of Netrin-1 stimulation would also be advantageous.

We have added a new Netrin-1 stimulation experiment in Fig. 4D (described on page 11, line 244-52) that shows that Netrins can only activate very low levels of ERK phosphorylation in suspension when proliferation is arrested. Netrin-1 stimulation of quiescent adherent cells where stimulation of proliferation is possible shows that Netrins are unable to activate ERK phosphorylation in this condition. In contrast, we also stimulate quiescent adherent OVCAR8 cells with an equal concentration of EGF (a known mitogen) to offer high level ERK phosphorylation as a side by side comparison. I think that this offers clear evidence that Netrin signaling is inconsistent with inducing cell proliferation. We've also updated citations in the introduction to include citation 26 that offers a previously reported paradigm of Netrin-ERK signaling in axon outgrowth that is a non-cancer, non-proliferative context to remind readers that Netrins utilize MEK-ERK differently.

We highlight Netrin-MEK-ERK signaling as key to survival for a number of reasons. First, Netrin signaling in this paradigm does not fit the dependence receptor paradigm where loss of Netrin receptors protect against cell death. Fig. 5B rules this out as receptor loss never offers a survival advantage, but clearly receptor deletions compromise survival in suspension culture. Second, positive Netrin signaling is known to support survival by inactivating phosphorylation of DAPK1. We've added this experiment as Fig. 5 Supplement 1D and show that loss of Netrin receptors doesn't reduce DAPK1 phosphorylation in a time course of suspension culture. Consequently, we conclude this isn't the survival signal either. Since MEK and ERK family members scored in our screen, we investigated their role in survival. We now show two different MEK inhibitors with different inhibitory mechanisms to confirm that MEK inhibition induces cell death. In addition to the previous PD184352 inhibitor in our first submission, we've added Trametinib as well and this is shown in Fig. 5G. Since it is surprising the MEK inhibition can kill instead of just arrest proliferation, we've also added another cell death assay in which we show trypan blue dye exclusion as a second look at survival. This is now Fig. 5H. Lastly, we include Trametinib inhibition of ERK phosphorylation in these assays

in Fig. 5I. While we leave open what takes place downstream of ERK, our model in Fig. 5J offers a very detailed look at the components upstream.

- Does inhibition of ERK prevent the abdominal spread of ovarian cancer cells? The authors may feel that this is out of the scope of the study, which I would agree with, but then the claims regarding ERK being the major mediator of the effects of netrin signaling should be perhaps slightly toned down.

We agree that loss of function xenograft experiments will enhance our discovery of Netrin's role in dormancy and metastasis. We have added a new Fig. 6 that uses xenografts with Netrin receptor deficient OVCAR8 cells (UNC5 4KO). It demonstrates that two weeks following IP engraftment we can isolate spheroids from abdominal washes and that cells have entered a state of reduced proliferation as determined by lowered Ki67 expression as well as other proliferation inducing genes. In the case of UNC5 4KO cells, there is significant attrition of these cells as determined by recovering spheroids in adherent culture (Fig.6C) and by Alu PCR to detect human cells in abdominal washes (Fig. 6D). Lastly, xenografts of UNC5 4KO cells cause much less aggressive disease and significantly extend survival of these mice (Fig. 6E,F). Not exactly the experiment that the reviewer is asking for, but a clear indication that Netrin signaling supports survival in xenograft model of dormancy.

- Notwithstanding that this could be deduced from figures 6D and F, it would be helpful if the number of mice used in each experimental group is clearly annotated in the corresponding figure legends. Moreover, indicating the precise statistical tests that were used in the figures would be helpful (e.g., specifying whether anova is one-way, two-way, or?)

We have added labels to what is now Fig. 8B to indicate the number of animals used for each genotype of cells. We have also updated figure legends to include more details of statistical tests used in each instance.

<https://doi.org/10.7554/eLife.91766.2.sa2>

Annexe 3 : “From netrin-1-targeted SPECT/CT to internal radiotherapy for management of advanced solid tumors”

David Kryza*, Jennifer Wischhusen*, Mathieu Richaud*, Maëva Hervieu, Jacqueline Sibi Boumedine, Jean-Guy Delcros, Sophie Besse, Thomas Baudier, Pierre-Alexandre Laval, Silvia Breusa, Erwan Boutault, Hugo Clermidy, Nicolas Rama, Benjamin Ducarouge, Mojgan Devouassoux-Shisheboran, Jean-Michel Chezal, Anne-Laure Giraudet, Thomas Walter, Patrick Mehlen, David Sarrut, Benjamin Gibert

***EMBO Molecular Medicine* 4, e16732 (2023)**

La radiothérapie interne vectorisée (RIV) est une technologie révolutionnaire en pleine expansion pour le traitement des cancers métastatiques, notamment les lymphomes, les leucémies ainsi que certains cancers solides comme les tumeurs neuroendocrines. La RIV repose sur l'utilisation de vecteurs pour délivrer des radionucléides aux cellules tumorales. Ces vecteurs se fixent à des cibles spécifiques, le plus souvent situées à la surface des cellules cancéreuses, permettant au radionucléide de tuer les cellules par irradiation. De nos jours, la révolution réside dans le potentiel remarquable qu'offre le développement de nouveaux isotopes radioactifs : les isotopes à rayonnement bêta tels que le Lutécium-177 (^{177}Lu), l'Iode-131 (^{131}I) ou l'Yttrium-90 (^{90}Y), et plus récemment les isotopes à rayonnement alpha, dont l'Actinium-225 (^{225}Ac), le Radium-223 (^{223}Ra) et le Bismuth-213 (^{213}Bi). D'autres radionucléides à rayonnement gamma, tels que l'Indium-111 (^{111}In), peuvent également être utilisés à des fins diagnostiques (scintigraphie, tomographie), permettant aux cliniciens de visualiser la distribution de la tumeur et des métastases.

Dans cette étude de preuve de concept, nous rapportons que la Nétrine-1 constitue une cible inattendue pour la radiothérapie interne vectorisée. Bien qu'elle soit communément considérée comme un ligand diffusible, nous démontrons ici que la Nétrine-1 est en réalité peu diffusible et concentrée dans la matrice extracellulaire des cellules tumorales *via* des interactions avec les composants de la matrice. Comme mentionné précédemment, l'anticorps NP137 est actuellement en évaluation clinique de phase 2 pour le traitement des cancers avancés. Une

question importante demeure quant à la sélection des patients, en particulier ceux qui n'ont pas été testés pour l'expression de la cible thérapeutique. Afin de répondre à cette problématique, nous avons mis au point un test compagnon d'imagerie en temps réel non invasif en conjuguant l'anticorps NP137 complet, ou des fragments Fab et F(ab')₂, à un chélateur métallique appelé NODAGA, permettant le marquage avec l'¹¹¹In. Bien que les trois molécules puissent se lier fortement à la Nétrine-1, le composé formé à partir de la forme complète de l'IgG1 a montré une meilleure incorporation dans les tumeurs (20-25%) et a permis une détection spécifique des tumeurs positives à la Nétrine-1 avec un excellent rapport signal sur bruit en utilisant l'imagerie par tomographie par émission de photons uniques couplée à un scanner (SPECT/CT) dans différents modèles murins de cancers du sein.

Le NP137 a montré une efficacité antitumorale prometteuse dans divers types cellulaires humains. Cependant, certaines lignées cancéreuses exprimant la Nétrine-1 restent résistantes à ce traitement en monothérapie. Compte-tenu de la forte incorporation de l'anticorps dans les tumeurs, nous avons développé une molécule thérapeutique innovante en fusionnant l'anticorps au Lutécium-177 (NP137-DOTA-¹⁷⁷Lu). Nous démontrons ici, à l'aide de modèles murins de xénogreffes et d'un modèle murin génétiquement modifié, qu'une unique injection systémique de NP137-DOTA-¹⁷⁷Lu induit une réponse antitumorale significative et prolonge la survie des souris.

En conclusion, notre étude fournit des données importantes de preuve de concept sur l'utilisation polyvalente de l'anticorps NP137, non seulement à des fins diagnostiques mais aussi thérapeutiques, et suggère la possibilité immédiate de transférer ces conjugués radioactifs chez l'homme.













Dans cet article, j'ai principalement contribué à la réalisation d'expériences *in vitro* ainsi qu'au suivi de la croissance tumorale afin d'évaluer l'efficacité du composé NP137-DOTA-¹⁷⁷Lu.

Devenir du projet : Ce travail a été breveté et licencié à la société de biotechnologie NETRIS Pharma. Depuis le 15 juin 2022, une collaboration a été établie entre l'entreprise Orano, spécialisée dans les combustibles nucléaires, NETRIS Pharma, le CNRS et le Centre Léon Bérard. Ce partenariat vise à industrialiser le développement de nouveaux radioisotopes émetteurs alpha et Auger que l'entreprise Orano est la seule à pouvoir produire, offrant ainsi de nouvelles perspectives thérapeutiques aux patients en situation de besoin critique. En 2023, ce

projet a reçu un financement Chaire Industrielle de l'Agence Nationale de la Recherche (ANR), financé à 50% par l'entreprise Orano.

SOURCE
DATATRANSPARENT
PROCESSOPEN
ACCESS

From netrin-1-targeted SPECT/CT to internal radiotherapy for management of advanced solid tumors

David Kryza^{1,2,*†} , Jennifer Wischhusen^{3,†}, Mathieu Richaud^{3,4,†} , Maëva Hervieu^{3,4}, Jacqueline Sidi Boumedine^{1,4}, Jean-Guy Delcros⁵ , Sophie Besse⁶, Thomas Baudier⁷ , Pierre-Alexandre Laval³, Silvia Breusa^{1,3,4} , Erwan Boutault⁶, Hugo Clermidy³ , Nicolas Rama³ , Benjamin Ducarouge⁸ , Mojgan Devouassoux-Shisheboran⁹, Jean-Michel Chezal⁶ , Anne-Laure Giraudet², Thomas Walter^{3,4,10}, Patrick Mehlen^{3,**} , David Sarrut^{7,***} , Benjamin Gibert^{3,4,****} 

Abstract

Targeted radionuclide therapy is a revolutionary tool for the treatment of highly spread metastatic cancers. Most current approaches rely on the use of vectors to deliver radionuclides to tumor cells, targeting membrane-bound cancer-specific moieties. Here, we report the embryonic navigation cue netrin-1 as an unanticipated target for vectorized radiotherapy. While netrin-1, known to be re-expressed in tumoral cells to promote cancer progression, is usually characterized as a diffusible ligand, we demonstrate here that netrin-1 is actually poorly diffusible and bound to the extracellular matrix. A therapeutic anti-netrin-1 monoclonal antibody (NP137) has been preclinically developed and was tested in various clinical trials showing an excellent safety profile. In order to provide a companion test detecting netrin-1 in solid tumors and allowing the selection of therapy-eligible patients, we used the clinical-grade NP137 agent and developed an indium-111-NODAGA-NP137 single photon emission computed tomography (SPECT) contrast agent. NP137-¹¹¹In provided specific detection of netrin-1-positive tumors with an excellent signal-to-noise ratio using SPECT/CT imaging in different mouse models. The high specificity and strong affinity of NP137 paved the way for the generation of lutetium-177-DOTA-

NP137, a novel vectorized radiotherapy, which specifically accumulated in netrin-1-positive tumors. We demonstrate here, using tumor cell-engrafted mouse models and a genetically engineered mouse model, that a single systemic injection of NP137-¹⁷⁷Lu provides important antitumor effects and prolonged mouse survival. Together, these data support the view that NP137-¹¹¹In and NP137-¹⁷⁷Lu may represent original and unexplored imaging and therapeutic tools against advanced solid cancers.

Keywords cancer; extracellular matrix; netrin; radioimmunotherapy; targeted therapy

Subject Categories Cancer; Pharmacology & Drug Discovery

DOI 10.15252/emmm.202216732 | Received 6 September 2022 | Revised 8 February 2023 | Accepted 10 February 2023 | Published online 6 March 2023

EMBO Mol Med (2023) 15: e16732

Introduction

Netrin-1 is known to be crucial during embryonic development and more particularly in the establishment of the central nervous system, through its role in neuronal navigation as exemplified in

1 Imthernat, LAGEPP, CNRS UMR 5007, Université de Lyon, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

2 Lumen Nuclear Medicine group, Hospices Civils de Lyon et Centre Léon Bérard, Lyon, France

3 Apoptosis, Cancer and Development Laboratory- Equipe labellisée "La Ligue", LabEx DEVWeCAN, Institut Convergence PLASCAN, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM U1052-CNRS 5286, Université de Lyon1, Lyon, France

4 Gastroenterology and technologies for health, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM U1052-CNRS5286, Université Lyon 1, Lyon, France

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

6 Université Clermont Auvergne, Inserm, Imagerie Moléculaire et Stratégies Théranostiques, Clermont-Ferrand, France

7 CREATIS, INSA Lyon, INSERM U1206 – CNRS UMR 5220, Université de Lyon, Lyon, France

8 Netris Pharma, Lyon, France

9 Hospices Civils de Lyon, Department of Pathology, Lyon, France

10 Hospices Civils de Lyon, Hôpital Edouard Herriot, Service de Gastroentérologie et d'Oncologie Digestive, Lyon Cedex 03, France

*Corresponding author. Tel: +33 469856006; E-mail: david.kryza@univ-lyon1.fr

**Corresponding author. Tel: +33 478785128; E-mail: patrick.mehlen@lyon.unicancer.fr

***Corresponding author. Tel: +33 478785151; E-mail: david.sarrut@creatis.insa-lyon.fr

****Corresponding author. Tel: +33 469856266; E-mail: benjamin.gibert@lyon.unicancer.fr

†These authors contributed equally to this work

commissural axon guidance (Serafini *et al*, 1996; Belle *et al*, 2014). The classically admitted view of its role was that it attracts/repulses neurons/axons following its secretion through the generation of a gradient in the surrounding environment. This has recently been questioned as netrin-1 seems to be less diffusible than initially described but rather actively transported during embryonic development (Dominici *et al*, 2017). Its signaling is transduced by dependence receptors (DRs) like deleted in colorectal carcinoma (DCC), members of the uncoordinated-5 (UNC-5) family, and neogenin (Fazeli *et al*, 1997; Mehlen *et al*, 2011; Renders *et al*, 2021). Binding of netrin-1 to these receptors impedes cell death and explains its broad physiological and pathological implications (van Gils *et al*, 2012; Ramkhalawon *et al*, 2014; Ozmadenci *et al*, 2015; Bone-schansker *et al*, 2016; Brisset *et al*, 2021).

In particular, netrin-1 was shown to be upregulated in many types of cancers, including breast cancer, non-small-cell lung cancer, and medulloblastoma (Fitamant *et al*, 2008; Delloye-Bourgeois *et al*, 2009; Akino *et al*, 2014). This overexpression in tumor cells is one of the survival mechanisms proposed, whereby increased expression of netrin-1 blocks cell death induced by DRs (Mehlen *et al*, 2011; Gibert & Mehlen, 2015), and seems to be enhanced following chemotherapy (Paradisi *et al*, 2013). Targeting this DR/ligand interaction has thus appeared as an attractive therapeutic strategy in oncology (Paradisi *et al*, 2013; Gibert & Mehlen, 2015; Grandin *et al*, 2016a,b), with several molecules under development to block netrin-1. Consistently, a human monoclonal anti-netrin-1 antibody, called NP137, blocking UNC5B/netrin-1 interaction, is currently assessed in several clinical Phase II trials to evaluate its anticancer activity in monotherapy or in combination with standards of care such as chemotherapy or immune checkpoint inhibitors. Preliminary results of clinical activity as a single agent are encouraging (Grandin *et al*, 2016b; Cassier *et al*, 2019). In addition, netrin-1 blockage seems to be effective in a subset of patients only requiring a simple test to identify eligible patients, that is, those with detectable netrin-1 levels. Conventional approaches to identify patients likely to respond to cancer treatments are largely based on invasive primary tissue biopsy collection and histological staining and analysis, and overlook specific features of metastases, such as initial treatment resistance. Indeed, immunohistochemistry (IHC) has been the reference for the characterization of target expression in cancer for many years. However, this strategy has been called into question by recent data obtained with immune checkpoint inhibitors, as there is a strong discrepancy between target expression and response within the patient. Thus, patients responding to the PDL-1 antibody could be negative for the expression of PDL-1 in IHC and *vice versa*. It can be hypothesized that target expression is not stable over time; for instance, since IHC analyses are made with paraffin blocks taken from the primary tumor at diagnosis sometimes months or years before clinical trials. The expression of the target may then differ in metastases. New diagnostic strategies are therefore needed to analyze target expression in real time on a whole-body scale to highlight all the variations in protein expression within tumors and metastases.

In an attempt to develop a less invasive means of detection/diagnosis of netrin-1-expressing patients eligible for anti-netrin-1 treatment, we developed a radiolabeling-based methodology to visualize netrin-1 accumulation *in vivo* by SPECT/CT imaging. We then demonstrated netrin-1 accumulation in the tumor cell extracellular matrix rather than its diffusion in the microenvironment and

detected a strong accumulation of radioactivity within tumors. We then created a new radiolabeled NP137 compound aimed at internally delivering radiopharmaceutical therapy (RPT), able to selectively kill netrin-1-expressing cells with radioactivity through the highly specific accumulation of the NP137 agent. To achieve this, we radiolabeled NP137 with lutetium-177 (¹⁷⁷Lu) and observed tumor cell death with high specificity in a number of xenografts and genetic mouse models. This technology based on coupled peptides and antibody drug conjugates is already used in the clinic (Strosberg *et al*, 2017; Sartor *et al*, 2021) and many developments are ongoing to target both cancer cells and the tumor microenvironment that surrounds them, such as activated platelets or cancer-associated fibroblasts (CAFs) (Dal Corso *et al*, 2017; Lindner *et al*, 2019; Yap *et al*, 2019; Fabre *et al*, 2020).

Taken together, these data demonstrate that our radiolabeled tools can provide very effective targeting of tumor cells and are highly relevant for a rapid transfer to the clinic.

Results

Netrin-1 is a poorly diffusible matrix-binding protein

In order to follow netrin-1 by radio-imaging *in vivo*, we first had to precisely localize the protein. Indeed, recent studies suggested that netrin-1 may not be as diffusible as originally thought during embryonic development (Serafini *et al*, 1996; Dominici *et al*, 2017). To our knowledge, no one has addressed this issue in pathological conditions and more specifically in cancer. IHC analysis of netrin-1 levels in human tumors showed that the protein was present in the basement membrane and in the intercellular space of tumor cells, indicative of its accumulation in the extracellular matrix (Fig 1A and B). To further investigate the level of netrin-1 diffusion, we conducted immunoblots of cells expressing netrin-1 (4T1 and EMT6 cell lines) or not (67NR) collected from plastic dishes with or without SDS, capable of solubilizing matrix proteins. Netrin-1 could be clearly measured in detergent conditions, in which it is detached from the matrix, compared with control cells, indicating that it may bind to the matrix (Fig 1C and D). We thus used heparin treatment, a procedure routinely used to separate matrix and sugar residues from cells growing in plastic plates (Serafini *et al*, 1994). While no netrin-1 was detected in the conditioned medium from netrin-1-expressing 4T1/EMT6 cells in non-heparin-treated condition, when heparin was added, netrin-1 was detected (Fig 1E). Together, these data support the view that netrin-1 is only poorly diffusible and binds to the matrix. In order to study the molecular mechanisms and protein interactions necessary for the binding of netrin-1 to the matrix, we sought to identify potential molecular partners of netrin-1 within the matrix components, by conducting a biolayer interferometry (BLI) screen (Fig 1F). Human fibronectin was used as a negative control. Of interest, we identified that netrin-1 strongly bound to the matrix-forming proteins laminin-1 ($K_d = 29.5$ nM), lumican ($K_d = 15.5$ nM), fibronectin leucine-rich transmembrane protein (FLRT1) ($K_d = 15.5$ nM), integrin $\alpha 6\beta 4$ ($K_d = 0.96$ nM), glypican-1 ($K_d = 15.6$ nM), and vitronectin ($K_d = 6.85$ nM; Fig 1F and G).

Together, these results argue in favor of netrin-1 sequestration by the matrix rather than its diffusion in the cell microenvironment. Netrin-1 being immobilized in the extracellular matrix of tumor

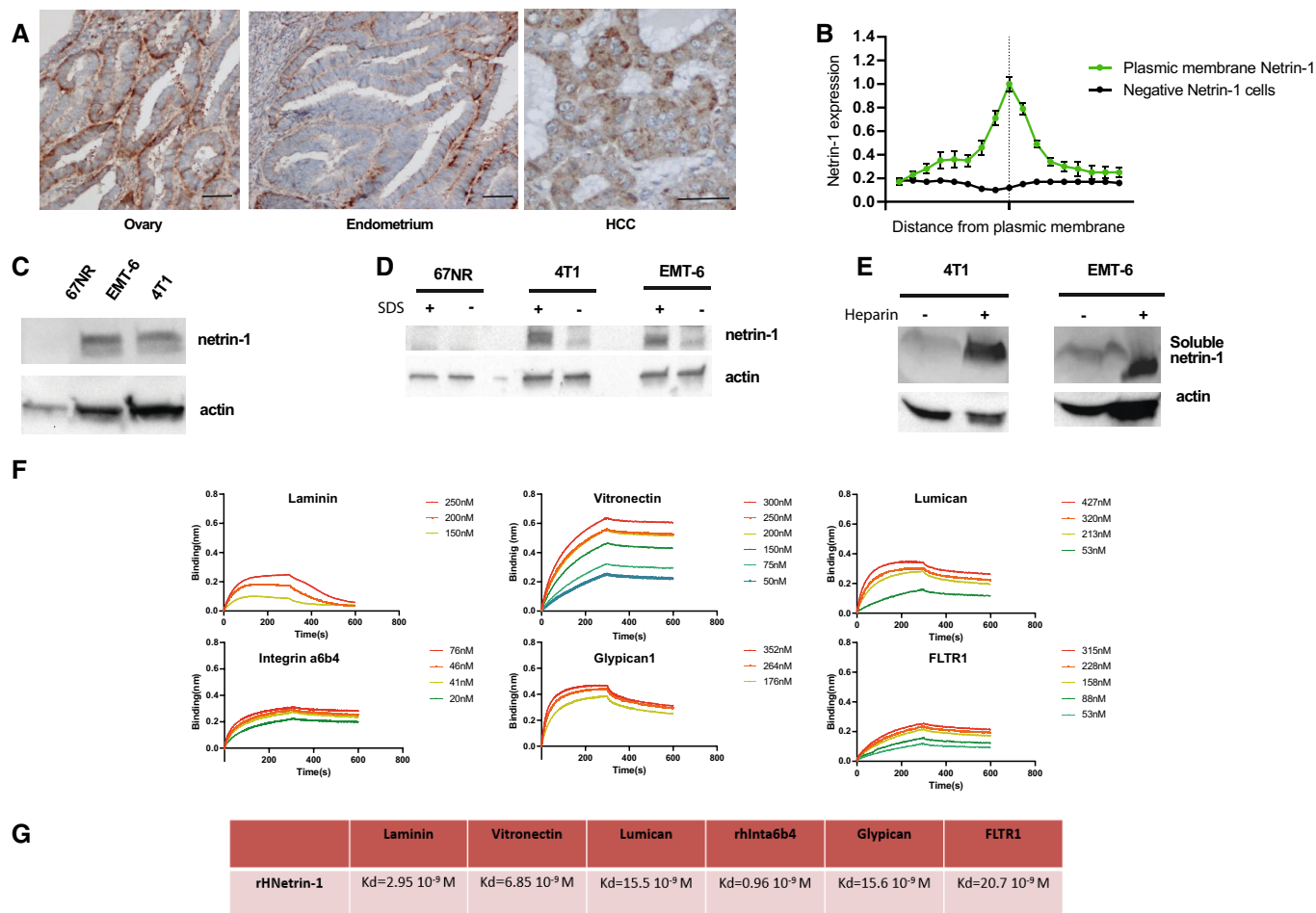


Figure 1. Netrin-1 binds to and is retained within the extracellular matrix (ECM).

- A Representative bright field micrographs of netrin-1 immunohistochemistry in formalin-fixed paraffin-embedded human ovarian, endometrial, and hepatocellular carcinoma (HCC) tumor sections. Scale bar 50 μ m.
- B Quantification by immunoblots of netrin-1 in the ECM of cancer cells of human tumors ($n = 3$, error bars are s.d.). The vertical line corresponds to the intercellular zone.
- C Selection of models expressing netrin-1 by immunoblot.
- D Immunoblots quantification of netrin-1 in samples harvested with or without SDS lysis buffer.
- E Immunoblots of netrin-1 in concentrated supernatants from cells treated or not with heparin.
- F Analysis of h-netrin-1 (human recombinant netrin-1) binding to ECM components: mouse laminin-1 (m-Laminin-1), recombinant human vitronectin, recombinant human lumican, recombinant human integrin α 6 β 4, recombinant human glypican-1, and recombinant human FLTR1 by biolayer interferometry assays.
- G K_d calculation after biolayer interferometry analysis of the experiment presented in (F).

Source data are available online for this figure.

cells, we hypothesized that netrin-1 could be detected by *in vivo* molecular imaging. Thus, we aimed at developing a netrin-1-targeted radiotracer for nuclear imaging.

Characterization of a new companion test for real-time netrin-1 detection

Personalized medicine approaches rely on biomarker assessment to guide decision-making for effective cancer patient management. Accordingly, we assumed that netrin-1 protein levels would be key to selecting patients eligible for anti-netrin-1 treatment. To develop a real-time noninvasive companion test to specifically monitor netrin-1 expression, we prepared novel radiotracers by conjugating

NP137 or fragments of it (Fab or F(ab')₂) to metal chelators (DOTA or NODAGA; Fig 2A–C), which in turn allowed for loading with radioactive indium-111 (¹¹¹In, half-life of 67 h), routinely used in nuclear imaging and detectable by SPECT imaging (Ritt, 2022). The three molecules ¹¹¹In-NP137, ¹¹¹In-NP137-Fab, and ¹¹¹In-NP137-F(ab')₂ were designed to assess their diffusion and accumulation properties *in vivo*. The full-size ¹¹¹In-NP137 was presumed to have a longer *in vivo* half-life, ¹¹¹In-NODAGA-NP137-Fab to penetrate the tumor more rapidly, and ¹¹¹In-NODAGA-NP137-F(ab')₂ to penetrate faster than the full-size agent and with better retention than the Fab construct due to better affinity and avidity. We first verified by BLI that the conjugation of the metal chelator did not disturb the ability of NP137, NP137-F(ab')₂, and NP137-Fab to bind netrin-1 and to

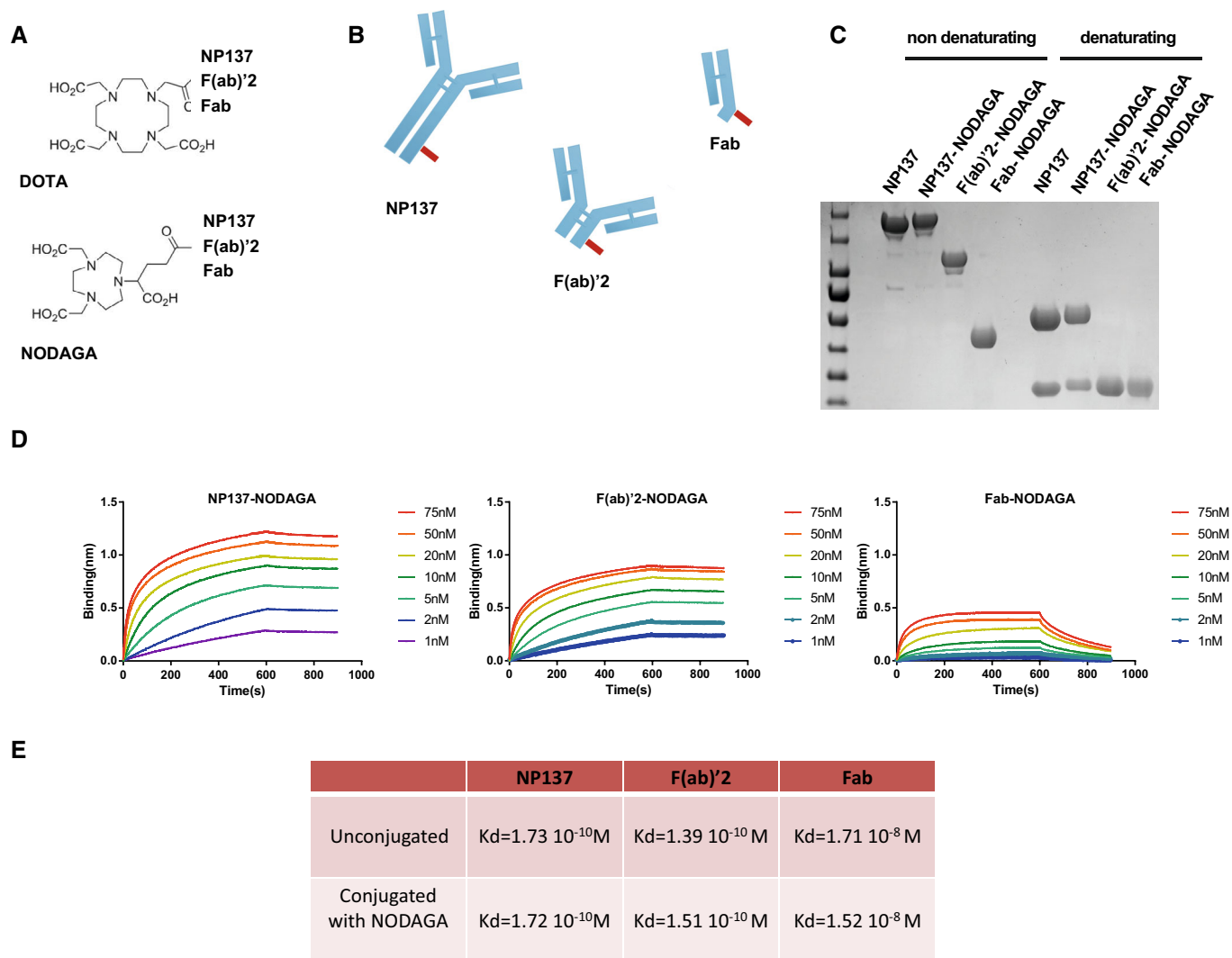


Figure 2. Characterization of conjugated NP137 fragments.

A Chemical representation of DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid) and NODAGA (1,4,7-triazacyclononane, 1-glutaric acid-4,7 acetic acid) immunoconjugates.

B Representation of full anti-netrin-1 (NP137), F(ab')₂, and Fab conjugated to NODAGA or DOTA chelators (in red).

C NP137 fragments were produced by enzymatic cleavage and subjected to electrophoresis in denaturing or non-denaturing conditions.

D Bi-layer interferometry analysis of netrin-1/NP137 and derivatives after NODAGA bioconjugation. Numbers indicate the concentration in nM of NP137 and derivatives.

E K_d calculation after bi-layer interferometry analysis of the experiments presented in d and compared with K_d of nonmodified NP137.

Source data are available online for this figure.

inhibit the binding of netrin-1 to its receptors (Fig 2D). We observed that the chelator did not alter the affinity of the full-size antibody or its fragments, as evidenced by a K_d in the nanomolar range (Figs 2D and E, and EV1A and B).

Next, to analyze the capacity of these molecules to detect netrin-1 *in vivo*, we engrafted netrin-1-positive 4T1 cells and netrin-1-negative 67NR cells in syngeneic mice. Engrafted animals were injected with radiolabeled immunoconjugates, and radioactivity uptake was monitored by SPECT/CT imaging. A rapid ¹¹¹In-NODAGA-NP137 uptake was detectable in 4T1 tumors, whereas that of ¹¹¹In-NODAGA-NP137-F(ab')₂ was slower, and that of ¹¹¹In-NODAGA-Fab negligible (Figs 3A and EV2A and B). Interestingly,

no enhancement of radioactive signal was detected in 67NR tumors, indicating that uptake was specific to netrin-1-expressing tumors (Figs 3B and EV2C and D). The incorporation ratio of radioactivity in 67NR versus 4T1 tumor cells was determined over time, and an accumulation of 14.1% of total injected radioactivity was measured in netrin-1-positive tumors at 48 h compared with 1.97% in netrin-1-negative tumors ($P < 0.001$; Fig 3C). To detect possible nonspecific binding of NP137, we quantified indium-111 uptake within organs, following mouse sacrifice and organ removal. We observed a peak in the incorporation of 28% of the injected dose/g of organ 72 h post injection in netrin-1-positive tumors, other tissues displaying minimal radioactive signal enhancement, highlighting

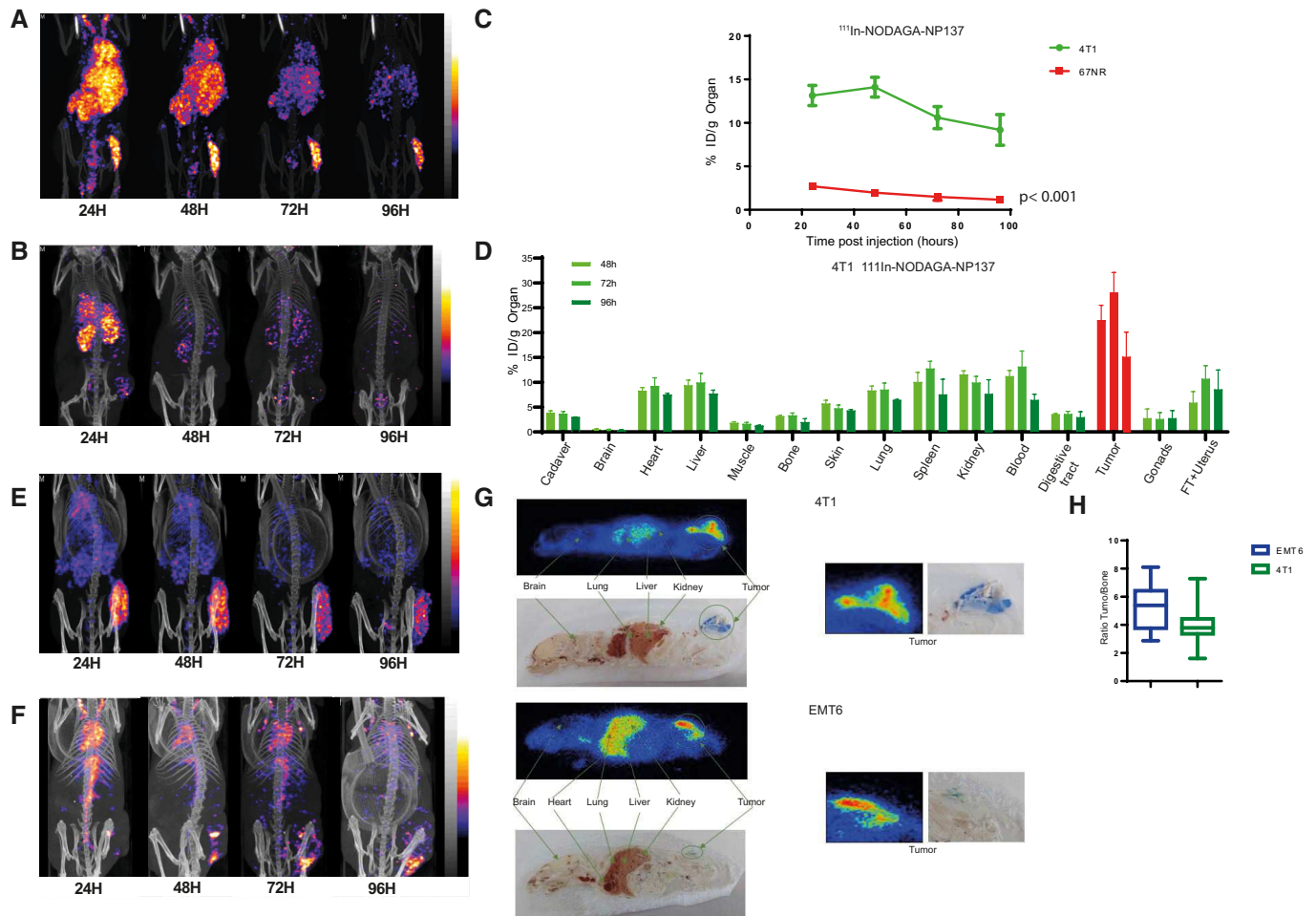


Figure 3. A new SPECT/CT companion test for netrin-1 detection.

- A** Maximum Intensity Projection of Tomographic scintigraphy and X-ray CT of the whole body of a Balb/cj mouse bearing a 4T1 (netrin-1-positive) tumor, acquired 24, 48, 72, and 96 h after IV injection of NP137-NODAGA-¹¹¹In.
- B** Maximum Intensity Projection of Tomographic scintigraphy and X-ray CT of the whole body of a Balb/c mouse bearing a 67NR (netrin-1-negative) tumor, acquired 24, 48, 72, and 96 h after IV injection of NP137-NODAGA-¹¹¹In.
- C** Tumor biodistribution ratio of NP137-NODAGA-¹¹¹In in Balb/cj mice bearing 4T1 xenograft versus 67NR xenografts at 24 h (4 mice), 48 h (4 mice), 72 h (4 mice) and 96 h (4 mice); Two-way ANOVA; Error bars indicate s.d.
- D** Biodistribution properties of NP137-NODAGA-¹¹¹In in a Balb/cj mouse bearing 4T1 xenografts at 48 h (4 mice), 72 h (4 mice), and 96 h (3 mice). Radioactivity incorporation was quantified by the percentage of the injected dose *per* gram of organ. Error bars indicate s.d.
- E** Maximum Intensity Projection of Tomographic scintigraphy and X-ray CT of the whole body of a Balb/cj mouse bearing an EMT6 (netrin-1-positive) tumor, acquired 24, 48, 72, and 96 h after IV injection of NP137-NODAGA-¹¹¹In.
- F** Maximum Intensity Projection of Tomographic scintigraphy and X-ray CT of the whole body of a NMRI nude mouse bearing a H358 (netrin-1-positive) tumor, acquired at 24, 48, 72, and 96 h after IV injection of NP137-NODAGA-¹¹¹In.
- G** Whole-body autoradiography of NP137-NODAGA-¹¹¹In in Balb/cj mice bearing a 4T1 (top) or an EMT6 (bottom) tumor using a beta imager system.
- H** Analysis of the autoradiography ratio of NP137-NODAGA-¹¹¹In in tumor versus bone in Balb/cj mice bearing EMT6 ($n = 14$ relative values) or 4T1 ($n = 24$ relative values) tumors. Whiskers indicate min to max, Central band of the box indicates the median, bottom of the box indicates Q1, and top of the box indicates Q3.

Source data are available online for this figure.

the specificity of ¹¹¹In-NODAGA-NP137 (Fig 3D). Taken together, these data demonstrate that tumoral indium-111 accumulation is more efficient with the full-size antibody compared with the Fab or F(ab')₂ constructs (Figs 3C and EV2E and F).

Finally, we confirmed the accumulation of NP137-¹¹¹In in another mouse tumor model, EMT6, and in a human xenograft model H358 both expressing netrin-1 at different levels with tumoral uptakes in both models (Figs 3E and F, and EV3A–E). The specific

accumulation of NP137 within tumors was further assessed by *ex vivo* autoradiography showing peaks of signal within 4T1 and EMT6 tumor models and corroborating the *in vivo* imaging results (Fig 3G). To verify the level of toxicity of NP137-¹¹¹In compound, we also analyzed the ratio of radioactivity measured between the tumor and bone, which is the niche of hematopoiesis and a prime location for the sequestration of drugs in patients, and observed a 6- and 4-fold higher radioactivity capture in EMT6 and 4T1 tumors,

respectively, than in the bone suggesting minimal off-target accumulation (Fig 3H).

NP137-¹⁷⁷Lu as a new theranostic compound to target aggressive tumors

Based on our findings on ¹¹¹In-radiolabeled NP137 uptake by tumors, we wondered whether the antibody could be coupled to a therapeutic agent. Indeed, even though NP137 has shown encouraging antitumoral results in clinical settings, imaging data shown here supported the use of NP137 as a potential vector to deliver radiotherapy. Given that the incorporation of the antibody into these tumors was rapid, specific, and that it accumulated in the extracellular matrix (ECM) of these cells, we developed a radiolabeled molecule comprising the anti-netrin-1 antibody NP137 fused to the radionuclide lutetium-177. NP137-DOTA-¹⁷⁷Lu (or thereafter NP137-¹⁷⁷Lu), that emits beta radiation (half-life of 6.7 days), was shown to damage/kill cancer cells in prostate and neuroendocrine tumors (Tagawa *et al*, 2013; Strosberg *et al*, 2017). We observed that ¹⁷⁷Lu binding to the anti-netrin-1 mAb does not alter the stability of the antibody via a radiolysis phenomenon. NP137-¹⁷⁷Lu was stable for over 7 days in a human plasma sample without the release of potentially toxic metal ions (Fig EV4A). To analyze the tumor growth inhibitory capacity of this compound, we treated mice engrafted with 4T1 and EMT6 tumors, using a single dose of NP137-DOTA, as a control, or NP137-¹⁷⁷Lu. Single injection of NP137-¹⁷⁷Lu (< 10 MBq/mouse) significantly decreased tumor growth associated with a two-fold increase in mouse disease-free survival ($P < 0.001$; Fig 4A and B). Comparison of the chelators DOTA or NODAGA for loading of lutetium-177 and their effect on NP137-¹⁷⁷Lu-mediated tumor growth inhibition and survival did not show any difference suggesting that both chelators had an equal performance (Fig EV4B and C). Therapeutic efficacy of NP137-¹⁷⁷Lu was further assessed in the human lung cancer xenograft model H358 where, once again, the treatment significantly reduced the rate of tumor growth corroborating a clear antitumoral effect ($P < 0.001$; Fig 4C). The reduction in tumor growth was shown to be mediated by an increase in tumor cell apoptosis, as detected by caspase-3 cleavage, and a decrease in tumor proliferation, as detected by Ki67 staining (Fig 4D and E).

Radiolabeled NP137 as new diagnostic tools for early tumor detection and treatment of a transgenic cancer model

Xenografts and patient-derived xenografts (PDXs) are highly important models for studying human disease, but they are limited in their capacity to reflect the pathophysiological conditions linked to tumor development and its microenvironment, including the vascularization and the immune microenvironment. In order to assess the value of radiolabeled NP137 in detecting and treating tumors in an *in vivo* setting reflecting human tumor development, we tested our radiotracers in the transgenic model of spontaneously developing luminal mammary cancer MMTV-NeuT (Guy *et al*, 1992), which expressed netrin-1 as illustrated by immunoblotting (Fig 5A and B). SPECT/CT imaging using NP137-¹¹¹In of *in situ* lesions showed a strong staining in fat pad tissues in all 10 mammary glands with incorporation peaking 48 h post injection (Fig 5C and D). A large tumor uptake close to 10% of ID/tumor at 96 h postinjection was measured in all tumors highlighting the sensitivity of the nuclear

medicine contrast agent for netrin-1-positive tumors. The MMTV-NeuT model is known to develop a number of mammary tumor foci in all mammary fat pads and it is very interesting to note that some tumors were visible even before their detection by mammary palpation, advocating for the use of NP137-¹¹¹In as a potential tool for early cancer detection and to monitor the appearance of metastatic lesions derived from netrin-1-overexpressing primary tumors (Fig 5D and E). As this model nicely mimics human disease, we therefore performed similar experiments for targeted radionuclide therapy with NP137-¹⁷⁷Lu in this transgenic mouse model that resulted in an increase in the overall survival, highlighting the strong antitumoral effect of the NP137-¹⁷⁷Lu radioimmunoconjugate ($P < 0.001$; Fig 5F). Taken together, the use of radiolabeled NP137 for theranostic purpose proved feasible. Netrin-1-positive tumors could be reliably identified and then subjected to targeted radiotherapy slowing down tumor growth and prolonging survival.

Discussion

Radiolabeling is a very promising tool to trace, visualize, and detect a protein that is secreted, albeit trapped in the ECM as shown in the present proof-of-concept study for the axon guidance cue netrin-1. However, other tumor-specific matrix-embedded proteins could probably be detected by similar strategies as long as these specific proteins—for example, axon guidance ligands, morphogens, and cellular secreted ligands—are specifically re-expressed in cancer settings.

Here, we demonstrated that netrin-1 was not freely diffusible in the cell microenvironment but adheres to the ECM. Indeed, netrin-1 was initially described for its role in neural development as a secreted molecule that generates a diffusible gradient in the surrounding microenvironment (Serafini *et al*, 1996; Kennedy, 2006). This dogma was recently questioned, as netrin-1 was shown to be actively transported during brain formation (Dominici *et al*, 2017; Varadarajan *et al*, 2017), and is corroborated by our results demonstrating that netrin-1 is retained in the ECM by interacting with matrix proteins. We not only clearly observed its radiolabeled accumulation in the tumor (and probably ECM) but were also unable to detect netrin-1 in the serum of patients and mice (by ELISA or mass spectrometry). Further studies are required to understand the transport/dissemination of netrin-1 in order to provide a complete and more dynamic picture of the mechanisms in which it is involved, such as inflammation (Barnault *et al*, 2022).

Based on this lack of diffusibility, we elaborated a new companion test for the *in vivo* detection of netrin-1. Netrin-1 has been characterized as a therapeutic target in several types of cancers currently evaluated in several clinical phase Ia/b and II trials (NCT04652076; NCT05605496; NCT05546853; NCT05546879; Cassier *et al*, 2019). However, because of the lack of a conventional test (*i.e.*, serum detection with ELISA, mass spectrometry, and robustness of pathological analyses quantifying netrin-1 expression in FFPE samples), there is a need for an innovative, simple, and robust companion test to detect netrin-1 expression in tumors. Having identified netrin-1 as being immobilized and accessible in the ECM of tumor cells, we elaborated a new companion test for noninvasive *in vivo* imaging by a nuclear medicine SPECT/CT approach. Previously, an alternative imaging approach for netrin-1 was explored using netrin-1-targeted microbubbles for ultrasound molecular imaging (Wischhusen

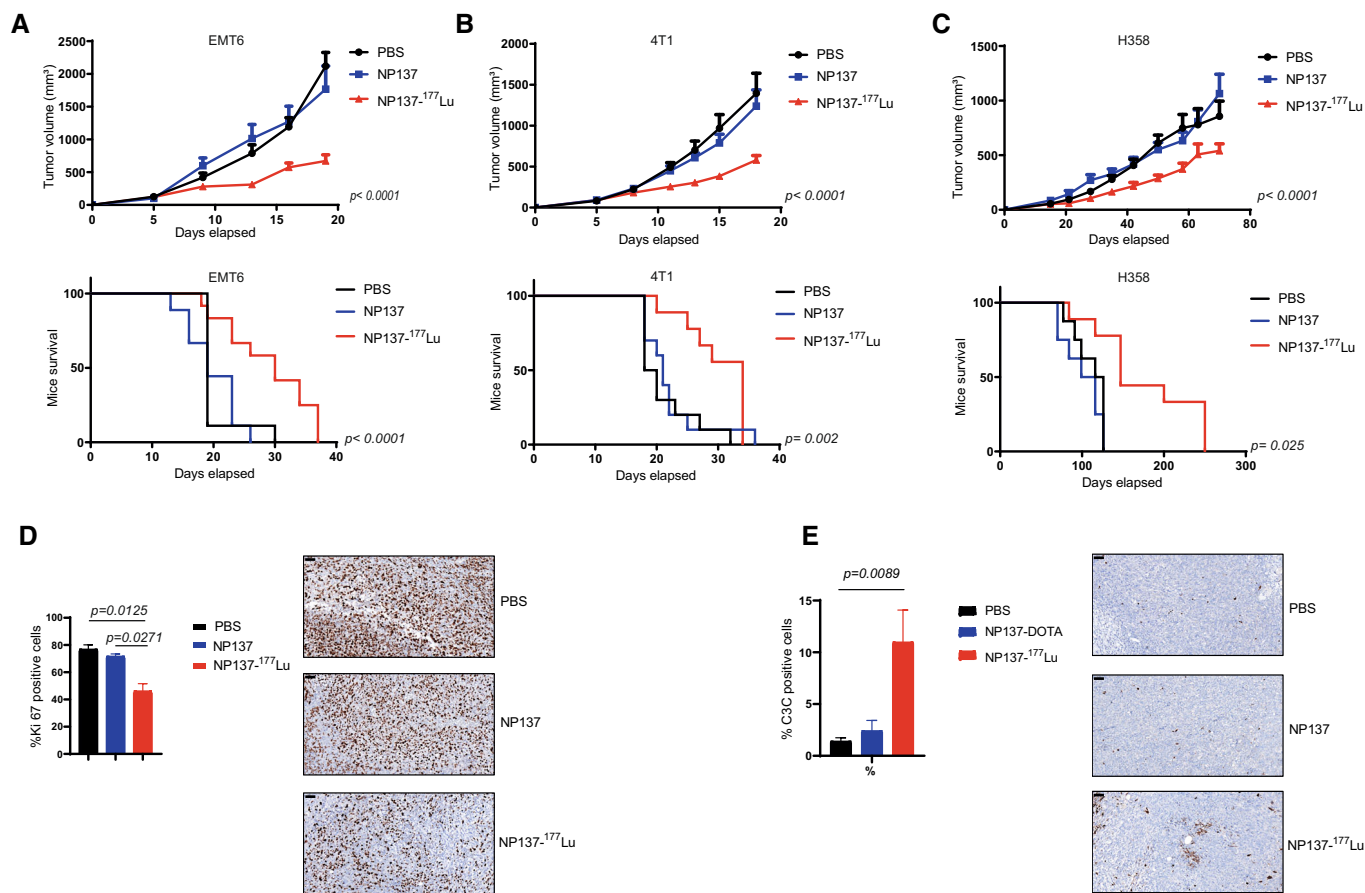


Figure 4. A new radiolabeled NP137-based anticancer therapy.

- A** (Top) Balb/c mice were engrafted with EMT6 cells by subcutaneous injection of 1 million cells. After 5 days, animals were treated by IV injection of PBS, DOTA-NP137, or NP137-¹⁷⁷Lu. $n = 9$ animals/group for PBS and DOTA-NP137; $n = 12$ animals/group for NP137-¹⁷⁷Lu; $P < 0.001$ between PBS and NP137-¹⁷⁷Lu and between DOTA-NP137 and NP137-¹⁷⁷Lu (Two-way ANOVA) between PBS and NP137-¹⁷⁷Lu and between DOTA-NP137 and NP137-¹⁷⁷Lu. Error bars indicate s.e.m. (Bottom) NP137-¹⁷⁷Lu survival of mice engrafted with EMT6 cells. Kaplan–Meier survival curves of mice treated or not with DOTA-NP137. Mantel–Cox test; $n = 9$ animals/group for PBS and DOTA-NP137; $n = 12$ animals/group considered as dead at a tumor volume of 2,000 mm³ for NP137-¹⁷⁷Lu; $P < 0.001$ between PBS and NP137-¹⁷⁷Lu and between DOTA-NP137 and NP137-¹⁷⁷Lu.
- B** (Top) Balb/c mice were engrafted with 4T1 cells by subcutaneous injection of 1 million cells. After 8 days, animals received IV injections of PBS, DOTA-NP137, or NP137-¹⁷⁷Lu; $n = 10$ animals/group for PBS and DOTA-NP137; $n = 9$ animals/group for NP137-¹⁷⁷Lu; $P < 0.001$ between PBS and NP137-¹⁷⁷Lu and between DOTA-NP137 and NP137-¹⁷⁷Lu (Two-way ANOVA). Error bars indicate s.e.m. (Bottom) NP137-¹⁷⁷Lu survival of mice engrafted with 4T1 cells. Kaplan–Meier survival curves of mice treated or not with DOTA-NP137. Mantel–Cox test; $n = 10$ animals/group for PBS and DOTA-NP137; $n = 9$ animals/group considered as dead at a tumor volume of 2,000 mm³ for NP137-¹⁷⁷Lu; $P = 0.002$ between PBS and NP137-¹⁷⁷Lu and between DOTA-NP137 and NP137-¹⁷⁷Lu.
- C** (Top) NMR nude mice were engrafted with H358 cells by subcutaneous injection of 5 million cells and considered as dead when tumor volume reached 2,000 mm³. After 15 days, animals were treated by IV injection of PBS, DOTA-NP137, or NP137-¹⁷⁷Lu; $n = 8$ animals/group for PBS and DOTA-NP137; $n = 9$ animals/group for NP137-¹⁷⁷Lu; $P < 0.001$ between PBS and NP137-¹⁷⁷Lu and between DOTA-NP137 and NP137-¹⁷⁷Lu (2-way ANOVA) between PBS and NP137-¹⁷⁷Lu and between DOTA-NP137 and NP137-¹⁷⁷Lu. Error bars indicate s.e.m. (Bottom) NP137-¹⁷⁷Lu survival of mice engrafted with H358 cells. Kaplan–Meier survival curves of mice treated or not with DOTA-NP137. Mantel–Cox test; $n = 8$ animals/group for PBS and DOTA-NP137; $n = 9$ animals/group for NP137-¹⁷⁷Lu; $P = 0.025$ between PBS and NP137-¹⁷⁷Lu and between DOTA-NP137 and NP137-¹⁷⁷Lu.
- D** (Left) Quantification of Ki67 expression in EMT6 tumors harvested in Balb/c mice 7 days post injection of PBS, DOTA-NP137, or NP137-¹⁷⁷Lu. (Right) Representative bright field micrographs of Ki67 immunohistochemistry in formalin-fixed paraffin-embedded EMT6 tumors harvested in Balb/c mice 7 days post injection of PBS, DOTA-NP137, or NP137-¹⁷⁷Lu; $n = 4$ mice per groups; One-way ANOVA. Error bars indicate s.e.m. Scale bar: 50 μ m.
- E** (Left) Quantification of cleaved caspase-3 expression in EMT6 tumors harvested in Balb/c mice 7 days post injection of PBS, DOTA-NP137, or NP137-¹⁷⁷Lu. (Right) Representative bright field micrographs of cleaved caspase-3 immunohistochemistry in formalin-fixed paraffin-embedded EMT6 tumor harvested in Balb/c mice 7 days post injection of PBS, DOTA-NP137, or NP137-¹⁷⁷Lu; $n = 4$ mice per groups; One-way ANOVA. Error bars indicate s.e.m. Scale bar: 50 μ m.

Source data are available online for this figure.

et al, 2018). However, ultrasound molecular imaging is still in its infancy, and targeted microbubble contrast agents are not readily available for clinical translation, while 3D reconstructed SPECT/CT images are already the standard practice for patient care and can be

used to visually identify uptake and perform image-based quantification, as in current ¹⁷⁷Lu-based therapies (peptide receptor or PSMA; Strosberg et al, 2017; Sartor et al, 2021). Therefore, we selected SPECT/CT imaging as a novel imaging modality, which

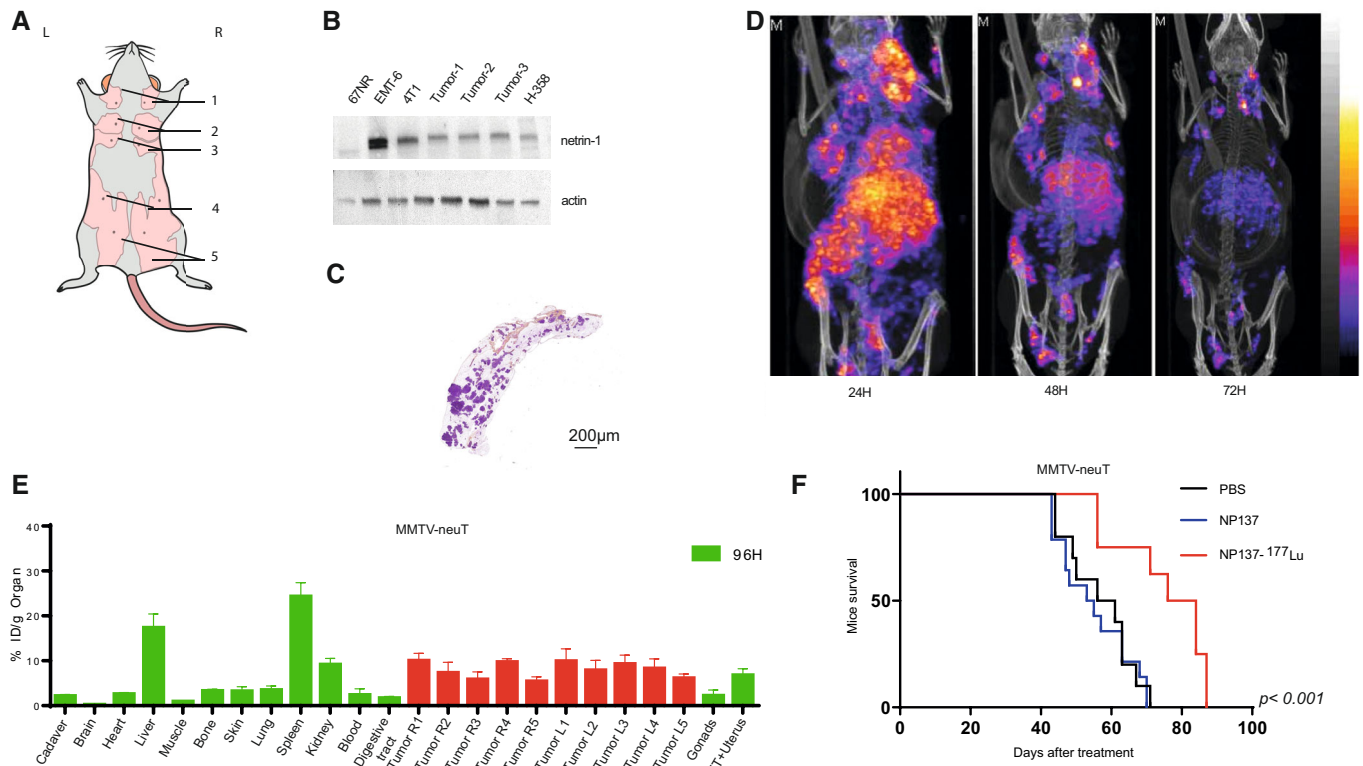


Figure 5. Detection of early tumor lesions and treatment of physiological tumors.

- A Schematic representation and location of the 10 mammary glands in mice.
- B Detection of netrin-1 expression in the MMTV/neuT model by immunoblots (Tumor 1 to 3).
- C H&S immunohistochemistry in formalin-fixed paraffin-embedded mammary glands of MMTV/neuT mice. Scale bar represents 200 μ m.
- D Maximum Intensity Projection of Tomographic scintigraphy and X-ray CT of the whole body of a transgenic MMTV/neuT mouse to develop mammary tumors, acquired 24, 48, and 72 h after injection of NP137-NODAGA-¹¹¹In.
- E Biodistribution properties of NP137-NODAGA-¹¹¹In in MMTV/neuT mice at 96 h (3 mice) and measured for all organs. Radioactivity incorporation was quantified by the percentage of the injected dose *per* gram of organ. Error bars indicate s.d.
- F NP137-¹⁷⁷Lu enhances MMTV/neuT mouse survival. Mice were treated at 3.5 months with PBS, DOTA-NP137, or NP137-¹⁷⁷Lu. Kaplan-Meier survival curves of mice treated or not with NP137 and considered as dead when cumulative tumors volume reached 2,000 mm³. Mantel-Cox test; $n = 10$ animals/group for PBS; $n = 14$ animals/group for DOTA-NP137; $n = 8$ animals/group for NP137-¹⁷⁷Lu; $P < 0.001$ between PBS and NP137-¹⁷⁷Lu and between DOTA-NP137 and NP137-¹⁷⁷Lu.

Source data are available online for this figure.

also provided us with the perspective of moving forward to targeted radiotherapy. To identify the best molecule for SPECT imaging, we designed three different agents based on the clinically used NP137 antibody: a complete NP137-IgG1, NP137-F(ab')₂, and NP137-Fab. Even though all three molecules bound strongly to netrin-1, a significant difference in their *in vivo* accumulation within tumors was observed; notably, a higher penetration of NP137-IgG1 and NP137-F(ab')₂. This difference was likely due to the half-life and stability of the molecules when injected into the bloodstream. The complete NP137-IgG1 form displayed the best accumulation within tumors and the most promising results for transfer to the clinic as a companion test for the ongoing clinical trial to perform therapy response prediction to NP137 and monitor netrin-1 expression during therapy. This tumor uptake is globally linked also to netrin-1 protein levels, the antibody is not retained by 67NR tumors that do not express the target, whereas it is concentrated in the 3 tumor lines tested, that express netrin-1 at different levels. Other parameters will have to be analyzed in future studies; tumor uptake is higher in 4T1 than in EMT6, which expresses more netrin-1 *in vitro*. We can

assume that the composition of the extracellular matrix plays a role in the retention and diffusion of netrin-1. Other parameters also influence the binding of radiolabeled antibodies, such as the tumor microenvironment, and perfusion by blood and lymphatic vessels. It has also been described that the genetic background of animal models, in particular in immunodeficient animals, severely modifies tumor uptake, probably because the lack of circulating antibodies in these animals causes an injected antibody to be taken up by Fc receptors, and therefore strongly lowers its half-life, diffusion and thus tumor incorporation (Sharma *et al*, 2018). This hypothesis may explain why we see less uptake of NP137-¹¹¹In in the human H358 model. Based on our results, we can state that there is a minimal off-target signal with NP137-¹¹¹In in our preclinical models, as evidenced by the low tumor incorporation in the netrin-1-negative tumor model 67NR and in other organs. These results are in line with the fact that netrin-1 is not widely expressed in adult noncerebral tissues and a knockdown of netrin-1 in adult mice does not show any drastic phenotype. Instead, netrin-1 seems specifically re-expressed in tumoral tissues. The axonal guidance cue netrin-1 is expressed in the adult central

nervous system. However, selecting the full-length antibody may have prevented penetration through the blood–brain barrier as there was no radioactivity detected in the brains of the animal models employed, suggesting a prevention of brain toxicity. More generally, targeting of proteins expressed by developmental genes that are re-expressed during tumor formation seems to be key to improving the specificity and reliability of tumor imaging.

Based on the strong tumor incorporation of anti-netrin-1 mAb in netrin-1-positive tumors, we designed a new molecule, in which we fused NP137-DOTA with lutetium-177 to form NP137-¹⁷⁷Lu. Lutetium-177 is a β^- emitter able to deliver a strong dose of radiation in a range of 1.8 mm within the tumor tissue (Strosberg et al, 2017; Sartor et al, 2021). Upon the specific accumulation of NP137-¹⁷⁷Lu in the netrin-1-positive tumor models, we noted a significant decrease in tumor growth, which was correlated with better survival of tumor-bearing mice and confirmed that our strategy based on localized delivery of radiation to netrin-1-positive tumors in living animals was effective for tumor treatment. Of interest, in some of the models used here, for example, the EMT6-engrafted model, NP137 as a single agent failed to show antitumor activity while a single NP137-¹⁷⁷Lu injection was associated with tumor growth-inhibiting effects. The phase I and now ongoing phase II clinical trials of NP137 showed an excellent safety profile of NP137 and basically no toxicity related to target inhibition. Studies have shown that ¹⁷⁷Lu-based radiopharmaceuticals also have generally low side effects compatible with clinical development. Therefore, the combination of NP137 and ¹⁷⁷Lu to generate the radiotherapeutic compound NP137-¹⁷⁷Lu provides an optimal treatment approach with high potential for clinical translation for use in patients with refractory tumors. Although our study showed no clear difference between DOTA and NODAGA, the choice of a single chelator will be important for faster clinical development to perform the imaging and therapy phases with the same NP137-DOTA/NODAGA GMP batch.

Our study therefore provides important proof-of-concept data on the multifaceted use of NP137 not only for diagnostic but also therapeutic purpose and the immediate possibility to transfer ¹¹¹In- and ¹⁷⁷Lu-radiolabeled NP137 to humans.

Materials and Methods

Human tumor samples

The usage of all patient tumor samples was conducted according to the rules of WMA Declaration of Helsinki. The Belmont Report and the Ethic Committee of the Medical Board (CHU Lyon) agreed to these investigations. Informed consent was obtained from all patients. The collection of samples has been performed on primary tumors from patients treated at the Hospices civils de Lyon and specimens are conserved in the pathology department.

Tumor cell lines

4T1 and 67NR murine mammary carcinoma cells and human pulmonary adenocarcinoma H358 cells were obtained from ATCC and cultured in RPMI-1640 (ATCC) medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco) and antibiotics (streptomycin and

penicillin). EMT6 murine mammary carcinoma cells were obtained from ATCC and cultured in Eagle Minimum Essential Medium (EMEM, ATCC) supplemented with 10% FBS and antibiotics (streptomycin and penicillin). The cells were maintained in culture at 37°C under a humidified atmosphere composed of 20% O₂ and 5% CO₂ as previously described (Gibert et al, 2014).

The cells have been tested for mycoplasma infections for use in mice but were not authenticated prior to the submission of the article.

Western blots

Confluent cells were washed with cold PBS and lysed in lysis buffer (Tris 10 mM pH 7.6; SDS 5%; glycerol 10%; Triton X-100 1%, DTT 100 mM). After sonication, proteins were assayed using the Pierce 660 nm protein assay reagent (Thermo Fisher Scientific), run on 4–15% SDS–polyacrylamide gels (Bio-Rad), and transferred to nitrocellulose membranes using the Trans-Blot Turbo Transfer (Bio-Rad). The membranes were blocked for 1 h at room temperature with 5% fat-free milk powder for primary and with 5% bovine serum albumin (BSA). Staining was performed overnight with a primary antibody: netrin-1 antibody (1/1000 dilution; Ab126729, Abcam); actin antibody (1/2500 dilution Sigma, A3854). After washing, the membranes were incubated with a secondary rabbit anti-goat antibody coupled with horse radish peroxidase (HRP) for 1 h at room temperature. The West Dura (Pierce) chemiluminescence system was used to intensify the signal. Imaging was performed using Chemidoc Touch (Bio-Rad).

For the binding of netrin-1 in cellular matrix, 1×10^6 cells were plated in a 100 mm³ culture dish. 24 h after, cells were treated with 200 μ g/ml of heparin sodium salt from porcine intestinal mucosa (H3147-100KU, Sigma) diluted in 4 ml of medium without FBS. After one night of incubation, the supernatant was collected. Centrifuge filters were used to concentrate the protein in the collected supernatant. Pierce 660 nm protein assay reagent (22660, Thermo Fisher Scientific) was then used to determine the concentration of protein, 30 μ g of proteins was loaded on immunoblots.

In vivo preclinical models

The human monoclonal antibody NP137 (anti-netrin-1) was kindly provided by Netris Pharma (Lyon, France). Female Balbc/J mice, 8 weeks old, were obtained from Janvier Laboratories (Le Genest-Saint-Isle, France). All syngeneic breast cancer cells, 1×10^6 of EMT6, 5×10^5 of 4T1, and 1×10^6 of 67-NR, were subcutaneously transplanted into the dorsal flank of 8-week-old female Balbc/J mice. The mice were maintained under specific pathogen-free conditions (Anican, Lyon, France, and Imthemat facility, HCL Lyon, France) and stored in sterilized cages with filter lids. Their care and accommodation were in accordance with European and French institutional guidelines as defined by the local CECCAP Ethics Committee (CECCAPP_CLB_2020_024; Jiang et al, 2021). The human cell lines H358 (1×10^6 cells) were grafted into 8-week-old female NMRI immunocompromised mice and maintained under the same conditions.

Tumor volumes were assessed by measuring two perpendicular tumor diameters with a caliper three times a week. Individual tumor volumes were calculated as follows: $V = (a \cdot b^2)/2$; a being the largest diameter, b the smallest. When tumors reached a volume of

200–400 mm³, mice were randomly separated into groups of animals and treated with either ¹¹¹In-NODAGA-NP137, ¹¹¹In-NODAGA-NP137-Fab, ¹¹¹In-NODAGA-NP137-F(ab')₂, or ¹¹¹In-DOTA-NP137 (see [Materials and Methods](#) below for their production) and subjected to live imaging. For all experiments, mice were anesthetized using a gas protocol (isoflurane/oxygen [2.5%/2.5%]).

Anticancer treatments with either PBS, NP137-DOTA, or NP137-DOTA-¹⁷⁷Lu (called hereafter NP137-¹⁷⁷Lu) were conducted in one single injection (when tumors reached 50–100 mm³) with 7–10 MBq/mouse of lutetium-177. Tumor growth was monitored until tumor volume reached 2,000 mm³, which was the endpoint of the protocol for sacrifice and *ex vivo* analysis. The animals were at this stage considered dead in all the Kaplan–Meier survival analyses.

For immunohistochemistry (IHC) analysis, tumors were collected 10 days after treatment, embedded in paraffin, and sectioned into 10 μm slices. Tumor histology was studied after hematoxylin-phloxinB-saffron, Ki67, and cleaved caspase-3 staining of tumor slides at the Pathology-Research Platform (CRCL-France).

MMTV-NeuT mice were generated in the facilities of Anican (Lyon), France. Females spontaneously developed numerous tumor foci in the mammary glands (Guy *et al*, 1992). Imaging was performed under the same conditions as above. For the therapy part, mice were treated with either PBS, control antibody, or NP137-¹⁷⁷Lu 3 months after birth. Survival was determined when the cut-off point of 2,000 mm³ of cumulative tumor volume was reached.

Conjugation

1 ml of the anti-netrin-1 antibody, NP137 (10 mg/ml), was transferred to an Amicon Ultra-15 50 k (UFC905096). Diafiltration against 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0) treated with 1.2 g/l of Chelex 100 was then performed. This step was repeated seven times using 10 ml of 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0) solution with a 25 min centrifugation at 4,900 rpm between each wash. NP137 concentration was then calculated with a nanodrop. The concentration of the antibody was adjusted in order to reach 50 μM. Stock solution of DOTA-NHS ester or NODAGA (1,4,7-triazacyclononane, 1-glutaric acid-44,7 acetic acid)-NHS ester (Chematech (C084)) was dissolved in ultrapure water at a concentration of 10 mg/ml (= 13.13 mM). 50 μM of NP137 was combined with required DOTA-NHS or NODAGA-NHS solution at a ratio of 1:25. Reactions were conducted at room temperature for 4 h and transferred to 4°C for continuous end-over-end mixing overnight. Diafiltration against PBS (Chelex) was then performed. This step was repeated seven times using 10 ml of PBS (Chelex) with a 25 min centrifugation at 4,900 rpm between each wash. DOTA/NODAGA-NP137 concentration was calculated with a nanodrop.

Generation of Fab and F(ab')₂ fragments and synthesis of DOTA and NODAGA-immunoconjugates

Proteolytic fragments of NP137 were generated using Pierce™ Fab and F(ab')₂ Preparation kits according to the manufacturer's instructions (ref 44985 and 44988, Thermofisher, France). For conjugation of DOTA or NODAGA to surface lysine residues, NP137 and its fragments were conjugated at a molar ratio of 25:1 chelate:antibody with DOTA-NHS-ester or NODAGA-NHS ester (Chematech, Dijon, France) in metal-free buffers prepared using Chelex-100 resin (Bio-

Rad, 142-1253). Briefly, 50 μM antibodies were exchanged by diafiltration against 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0), then mixed with 1.25 mM DOTA-NHS-ester or NODAGA-NHS-ester for 4 h at 25°C on a rotator. The reaction was placed at 4°C for continuous end-over-end mixing overnight. Excess chelator was removed by diafiltration against PBS. Immunoconjugates were stored at 4°C.

Radiolabeling

NODAGA-NP137, NODAGA-NP137-Fab, or NODAGA-NP137-F(ab')₂ (40–70 μl, 5 mg/ml) were radiolabeled by adding 400 μl of acetate buffer 0.1 M pH 5.5 and 40–400 MBq of high purity ¹¹¹InCl₃ in hydrochloric acid solution (Curium, Petten, The Netherlands). The mixture was incubated for 30 min at 37°C. The reaction was stopped with 100 μl of a 1 mM aqueous solution of DTPA. Free ¹¹¹In was removed using a PD-10 column (GE Healthcare, GE17-0851-01). The column was first washed with 15 ml of 0.1 M pH 5.5 acetate buffer, the labeled mixture was then loaded onto the column and eluted with acetate buffer. ¹¹¹In-NODAGA-NP137, ¹¹¹In-NODAGA-NP137-Fab or ¹¹¹In-NODAGA-NP137-F(ab')₂ were first eluted. The radiochemical purity (RCP) of each 0.5 ml fraction was evaluated using ITLC-SG (Biodex, Tec-control black) and 50 mM citrate buffer (pH 5.5) as the mobile phase and was assayed with a gamma isotope TLC analyzer (Scan-Ram, Lablogic, Villebon-sur-Yvette, France). Radiolabeled NP137 remained at the origin while unbound ¹¹¹In³⁺ or ¹¹¹In-DTPA complex migrated with an Rf of 0.9–1. The fractions with the highest radiochemical purity (RCP) were pooled.

For stability testing, an aliquot of radiolabeled ¹¹¹In-NODAGA-NP137, ¹¹¹In-NODAGA-NP137-Fab or ¹¹¹In-NODAGA-NP137-F(ab')₂ was incubated at 37°C in 2 ml PBS (pH 7.4) and the RCP was evaluated using ITLC-SG and 0.1 M citrate buffer pH 5.5 as the mobile phase.

¹⁷⁷Lu-radiolabeled DOTA was obtained according to the procedure described above starting from ¹⁷⁷LuCl₃ in hydrochloric acid (Endolucin®, ITM, Germany).

Biodistribution studies

1–10 MBq of radiolabeled ¹¹¹In-NODAGA-NP137, ¹¹¹In-NODAGA-NP137-Fab, ¹¹¹In-NODAGA-NP137-F(ab')₂ or ¹¹¹In DOTA-NP137, in a maximum volume of 100 μl were injected intravenously (IV) into tumor-bearing mice (*n* = 3 or 4 for each group). Mice were then sacrificed at defined times: 4, 24, 48, 72, and 96 h after injection by cervical dislocation. Tissues of interest (blood, heart, lungs, gonads, bones, spleen, kidneys, muscle, digestive tract, brain, and skin) were removed, weighed and the radioactivity was counted for 5 min in a gamma scintillation counter (Wizard® gamma counter, Perkin Elmer, USA). Urine and feces were collected in an individual metabolic cage for housing and counting. Tissue distribution was expressed as a percentage of the injected dose *per* gram (%ID/g). Renal and hepatobiliary eliminations were expressed as cumulative radioactivity under the total activity injected.

Imaging

Image acquisition was performed using a Nano-SPECT/CT system for small animals (Bioscan, Washington, DC, USA). This system consists of four detectors (215 × 230 mm² NaI, 33 PMTs) equipped with interchangeable multi-pinhole collimators. SPECT/CT

acquisitions were performed after IV injection of 10–15 MBq of radiolabeled molecules at different times: 24, 48, 72, and 96 h. CT (55 kVp tube voltage, 500 ms exposure time, and 180 projections) and SPECT/CT acquisitions were done in tumor-bearing anesthetized mice in a pron position, placed on a temperature-controlled bed (Minerve, Esternay, France), in order to maintain body temperature (set at 37°C). Image acquisition was performed for 40 min with two 15% windows centered on the two peaks 171 and 245 keV of ^{111}In . All images were reconstructed and analyzed using the InVivoScope software (Bioscan, Washington, DC, USA).

BioLayer interferometry

The affinity of the antibody fragments for netrin-1 was determined by biolayer interferometry using the OctetRed96 system (FortéBio) at 30°C with constant shaking at 1,000 rpm in PBS, 0.02% Tween-20, 0.1% BSA (binding buffer or BB). Briefly, recombinant human netrin-1 (R&D)-coated HIS1K biosensors were incubated with different concentrations of antibody or fragments, and the association was observed for 5 min. Biosensors were then incubated further in BB for 5 min to observe dissociation of the complex. Binding kinetics were evaluated with ForteBio Octet RED Evaluation software 6.1 using a 1:1 binding model to derive K_{on} , K_{off} , and K_{d} values.

For netrin-1 binding within matrix proteins, all interactions were analyzed at 30°C with constant shaking at 1,000 rpm in BB. Netrin-1-coated-HIS1K biosensors were incubated with an increasing concentration series of m-Laminin-I (3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 nM) and binding was observed for 5 min at 30°C. Netrin-1-coated-AHC biosensors were incubated with an increasing concentration series of hIntegrin, hGlypican-1, hFibronectin, hVitronectin, hLumican, and hFLRT-1 (3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 nM) and binding was observed for 5 min at 30°C. Biosensors were then incubated further in BB for 5 min to observe dissociation of the complex.

Autoradiography

NP137- ^{111}In uptake in tumors was analyzed by autoradiography in Balbc/j mice bearing 4T1 and EMT6 xenografts. 72 h after intravenous injection of NP137- ^{111}In (7.67 ± 3.03 MBq), mice (EMT6 mice $n = 3$, 4T1 mice $n = 5$) were sacrificed using CO_2 chambers. Whole bodies were immediately frozen in liquid nitrogen. Sections (40 μm) were cut at 100- μm intervals; sagittal slices were exposed after drying to a Biospace β Imager (Biospace Mesures, Paris, France) for 6 h. Autoradiography imaging was performed at “*In Vivo* Imaging in Auvergne” (IVIA) facility (<https://doi.org/10.18145/ivia>).

Stability assays

For stability testing, an aliquot of the purified NP137- ^{177}Lu was incubated at 37°C in 2 ml PBS (pH 7.4). RCP was evaluated using ITLC-SG (Biodex, Tec-control black) and citrate buffer 100 mM (pH 5.5) as the mobile phase. NP137- ^{177}Lu remained at the origin whereas unbound $^{177}\text{Lu}^{3+}$ migrated with an Rf of 0.9–1.

Statistical analyses

Randomization was done for the animals to homogenize the groups around 100 mm^3 of tumor volume for the NP137- ^{177}Lu treatments.

The paper explained

Problem

In oncology, despite their name, targeted therapies are often given without patient prescreening. Immunohistochemistry, the gold standard for tumor diagnosis, is largely conducted on the primary tumor, and this diagnosis may vary or evolve once metastases appear at a much later stage, including when no primary tumor is present anymore. Near-real-time diagnostic approaches are therefore urgently needed.

Results

Using netrin-1 and its blocking antibody as a proof-of-concept for tumor therapy, we were able to visualize this tumor cell-specific protein by nuclear imaging. We used this finding to design a near-real-time companion test for netrin-1 therapy. Tumor incorporation of anti-netrin-1 antibody being highly efficient, we created a second therapeutic molecule by fusing this antibody to Lutetium 177, a radioelement capable of destroying cancer cells upon exposure. Mechanistically, we demonstrated that netrin-1, although secreted, is not as diffusible as previously described but remains trapped in the extracellular matrix and microenvironment of cancer cells, justifying its potential as a target for vectorized radiotherapy.

Impact

Netrin-1 and more generally matrix-embedded proteins are promising targets for both molecular imaging and radioimmunotherapy.

There were no exclusion criteria, except absence of tumors. The experiments were not blinded.

All statistical analyses were performed using the GraphPad Prism software (San Diego, California). Statistical (non/parametric) tests: Mann–Whitney (*U*-test), ANOVA, or unpaired Student *T*-test were specified within the text. Survival curves were produced according to the Kaplan–Meier method. Data were analyzed with a Mantel–Cox test. *n* defines the total number of replicates. All statistical tests were two-sided and are specified in the text of the manuscript or in figure legends.

Data availability

This study includes no data deposited in external repositories.

Expanded View for this article is available [online](#).

Acknowledgements

We thank B. Manship for proofreading the manuscript. This work was supported by institutional grants from Cancéropole Clara Oncostarter and PDC-Clara grants (BG, DK), INCa/DGOS-PRT-K 2019 (DK, PM, BG), ANR-JCJC (BG), ANR Chaire Industrielle (BG), SIRIC LYRICAN (INCa-DGOS-Inserm_12563 [for BG, DK, DS], la Ligue contre le cancer [PM], INCA [PM, BG, DK], and Institut Convergence Plascan [PM]).

Author contributions

Patrick Mehlen: Supervision; writing – original draft; writing – review and editing. **David Kryza:** Formal analysis; supervision; funding acquisition; investigation; project administration. **Jennifer Wischhusen:** Conceptualization; data curation; formal analysis; investigation; writing – original draft; writing – review and editing. **Mathieu Richaud:** Data curation;

formal analysis; investigation. **Maëva Hervieu:** Data curation; formal analysis; investigation. **Jacqueline Sidi Boumedine:** Resources; data curation; formal analysis; methodology. **Jean-Guy Delcros:** Data curation; formal analysis. **Sophie Besse:** Formal analysis; investigation. **Thomas Baudier:** Data curation; funding acquisition. **Pierre-Alexandre Laval:** Data curation; funding acquisition; investigation. **Silvia Breusa:** Data curation; investigation. **Erwan Boutault:** Data curation; investigation; methodology. **Hugo Clermidy:** Data curation; formal analysis. **Nicolas Rama:** Formal analysis; investigation. **Benjamin Ducarouge:** Data curation; investigation. **Mojgan Devouassoux-Shisheboran:** Resources; investigation. **Jean-Michel Chezal:** Conceptualization; supervision; investigation. **Anne-Laure Giraudet:** Methodology. **Thomas Walter:** Methodology. **David Sarrut:** Conceptualization; data curation; formal analysis; investigation; methodology; project administration. **Benjamin Gibert:** Conceptualization; supervision; funding acquisition; writing – original draft; project administration; writing – review and editing.

Disclosure and competing interests statement

BD and PM declare to have a conflict of interest as, respectively, employee (BD) and shareholder (PM) of Netris Pharma.

References

- Akino T, Han X, Nakayama H, McNeish B, Zurakowski D, Mammoto A, Klagsbrun M, Smith E (2014) Netrin-1 promotes medulloblastoma cell invasiveness and angiogenesis, and demonstrates elevated expression in tumor tissue and urine of patients with pediatric medulloblastoma. *Cancer Res* 74: 3716–3726
- Barnault R, Verzeroli C, Fournier C, Michelet M, Redavid AR, Chicherova I, Plissonnier M, Adrait A, Khomich O, Chapus F *et al* (2022) Hepatic inflammation elicits production of proinflammatory netrin-1 through exclusive activation of translation. *Hepatology* 76: 1345–1359
- Belle M, Godefroy D, Dominici C, Heitz-Marchaland C, Zelina P, Hellal F, Bradke F, Chédotal A (2014) A simple method for 3D analysis of immunolabeled axonal tracts in a transparent nervous system. *Cell Rep* 9: 1191–1201
- Boneschanski L, Nakayama H, Eisenga M, Wedel J, Klagsbrun M, Irimia D, Briscoe DM (2016) Netrin-1 augments chemokinesis in CD4+ T cells *in vitro* and elicits a proinflammatory response *in vivo*. *J Immunol* 197: 1389–1398
- Brisset M, Grandin M, Bernet A, Mehlen P, Hollande F (2021) Dependence receptors: new targets for cancer therapy. *EMBO Mol Med* 13: e14495
- Cassier P, Eberst L, Garin G, Courbebaisse Y, Terret C, Robert M, Frenel J-S, Depil S, Delord J-P, Perol D *et al* (2019) 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* 30: v159
- Dal Corso A, Gébleux R, Murer P, Soltermann A, Neri D (2017) A non-internalizing antibody-drug conjugate based on an anthracycline payload displays potent therapeutic activity *in vivo*. *J Control Release* 264: 211–218
- Delloye-Bourgeois C, Fitamant J, Paradisi A, Cappellen D, Douc-Rasy S, Raquin M-A, Stupack D, Nakagawara A, Rousseau R, Combaret V *et al* (2009) Netrin-1 acts as a survival factor for aggressive neuroblastoma. *J Exp Med* 206: 833–847
- Dominici C, Moreno-Bravo JA, Puiggros SR, Rappeneau Q, Rama N, Vieugue P, Bernet A, Mehlen P, Chédotal A (2017) Floor-plate-derived netrin-1 is dispensable for commissural axon guidance. *Nature* 545: 350–354
- Fabre M, Ferrer C, Domínguez-Hormaeche S, Bockorny B, Murias L, Seifert O, Eisler SA, Kontermann RE, Pfizenmaier K, Lee SY *et al* (2020) OMTX705, a novel FAP-targeting ADC demonstrates activity in chemotherapy and pembrolizumab-resistant solid tumor models. *Clin Cancer Res* 26: 3420–3430
- Fazeli A, Dickinson SL, Hermiston ML, Tighe RV, Steen RG, Small CG, Stoeckli ET, Keino-Masu K, Masu M, Rayburn H *et al* (1997) Phenotype of mice lacking functional deleted in colorectal cancer (dcc) gene. *Nature* 386: 796–804
- Fitamant J, Guenebeaud C, Coissieux M-M, Guix C, Treilleux I, Scoazec J-Y, Bachelot T, Bernet A, Mehlen P (2008) Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 4850–4855
- Gibert B, Mehlen P (2015) Dependence receptors and cancer: addiction to trophic ligands. *Cancer Res* 75: 5171–5175
- Gibert B, Delloye-Bourgeois C, Gattolliat C-H, Meurette O, Le Guernevel S, Fombonne J, Ducarouge B, Laval F, Bouhallier F, Creveaux M *et al* (2014) Regulation by miR181 family of the dependence receptor CDON tumor suppressive activity in neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst* 106: dju318
- van Gils JM, Derby MC, Fernandes LR, Ramkhalawan B, Ray TD, Rayner KJ, Parathath S, Distel E, Feig JL, Alvarez-Leite JI *et al* (2012) The neuroimmune guidance cue netrin-1 promotes atherosclerosis by inhibiting the emigration of macrophages from plaques. *Nat Immunol* 13: 136–143
- Grandin M, Mathot P, Devailly G, Bidet Y, Ghantous A, Favrot C, Gibert B, Gadot N, Puisieux I, Hecceg Z *et al* (2016a) Inhibition of DNA methylation promotes breast tumor sensitivity to netrin-1 interference. *EMBO Mol Med* 8: 863–877
- Grandin M, Meier M, Delcros JG, Nikodemus D, Reuten R, Patel TR, Goldschneider D, Orriss G, Krahn N, Bousouar A *et al* (2016b) Structural decoding of the netrin-1/UNC5 interaction and its therapeutical implications in cancers. *Cancer Cell* 29: 173–185
- Guy CT, Webster MA, Schaller M, Parsons TJ, Cardiff RD, Muller WJ (1992) Expression of the neu protooncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces metastatic disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 10578–10582
- Jiang S, Richaud M, Vieugué P, Rama N, Delcros J, Siouda M, Sanada M, Redavid A, Ducarouge B, Hervieu M *et al* (2021) Targeting netrin-3 in small cell lung cancer and neuroblastoma. *EMBO Mol Med* 13: e12878
- Kennedy TE (2006) Axon guidance by diffusible chemoattractants: a gradient of netrin protein in the developing spinal cord. *J Neurosci* 26: 8866–8874
- Lindner T, Loktev A, Giesel F, Kratochwil C, Altmann A, Haberkorn U (2019) Targeting of activated fibroblasts for imaging and therapy. *EJNMMI Radiopharm Chem* 4: 16
- Mehlen P, Delloye-Bourgeois C, Chédotal A (2011) Novel roles for slits and netrins: axon guidance cues as anticancer targets? *Nat Rev Cancer* 11: 188–197
- Ozmadenci D, Féraud O, Markossian S, Kress E, Ducarouge B, Gibert B, Ge J, Durand I, Gadot N, Plateroti M *et al* (2015) Netrin-1 regulates somatic cell reprogramming and pluripotency maintenance. *Nat Commun* 6: 7398
- Paradisi A, Creveaux M, Gibert B, Devailly G, Redoulez E, Neves D, Cleysac E, Treilleux I, Klein C, Niederfellner G *et al* (2013) Combining chemotherapeutic agents and netrin-1 interference potentiates cancer cell death. *EMBO Mol Med* 5: 1821–1834
- Ramkhalawan B, Hennessy EJ, Ménager M, Ray TD, Sheedy FJ, Hutchison S, Wanschel A, Oldebeken S, Geoffroy M, Spiro W *et al* (2014) Netrin-1 promotes adipose tissue macrophage retention and insulin resistance in obesity. *Nat Med* 20: 377–384

- Renders S, Svendsen AF, Panten J, Rama N, Maryanovich M, Sommerkamp P, Ladel L, Redavid AR, Gibert B, Lazare S et al (2021) Niche derived netrin-1 regulates hematopoietic stem cell dormancy via its receptor neogenin-1. *Nat Commun* 12: 608
- Ritt P (2022) Recent developments in SPECT/CT. *Semin Nucl Med* 52: 276–285
- Sartor O, de Bono J, Chi KN, Fizazi K, Herrmann K, Rahbar K, Tagawa ST, Nordquist LT, Vaishampayan N, El-Haddad G et al (2021) Lutetium-177–PSMA-617 for metastatic castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med* 385: 1091–1103
- Serafini T, Kennedy TE, Gaiko MJ, Mirzayan C, Jessell TM, Tessier-Lavigne M (1994) The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 78: 409–424
- Serafini T, Colamarino SA, Leonardo ED, Wang H, Beddington R, Skarnes WC, Tessier-Lavigne M (1996) Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* 87: 1001–1014
- Sharma SK, Chow A, Monette S, Vivier D, Pourat J, Edwards KJ, Dilling TR, Abdel-Atti D, Zeglis BM, Poirier JT et al (2018) Fc-mediated anomalous biodistribution of therapeutic antibodies in immunodeficient mouse models. *Cancer Res* 78: 1820–1832
- Strosberg J, El-Haddad G, Wolin E, Hendifar A, Yao J, Chasen B, Mittra E, Kunz PL, Kulke MH, Jacene H et al (2017) Phase 3 trial of ¹⁷⁷Lu-Dotatate for midgut neuroendocrine tumors. *N Engl J Med* 376: 125–135
- Tagawa ST, Milowsky MI, Morris M, Vallabhajosula S, Christos P, Akhtar NH, Osborne J, Goldsmith SJ, Larson S, Taskar NP et al (2013) Phase II study of Lutetium-177-labeled anti-prostate-specific membrane antigen monoclonal antibody J591 for metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 19: 5182–5191
- Varadarajan SG, Kong JH, Phan KD, Kao T-J, Panaitof SC, Cardin J, Eltzschig H, Kania A, Novitch BG, Butler SJ (2017) Netrin1 produced by neural progenitors, not floor plate cells, is required for axon guidance in the spinal cord. *Neuron* 94: 790–799.e3
- Wischhusen J, Wilson KE, Delcros J-G, Molina-Peña R, Gibert B, Jiang S, Ngo J, Goldschneider D, Mehlen P, Willmann JK et al (2018) Ultrasound molecular imaging as a non-invasive companion diagnostic for netrin-1 interference therapy in breast cancer. *Theranostics* 8: 5126–5142
- Yap ML, McFadyen JD, Wang X, Ziegler M, Chen Y-C, Willcox A, Nowell CJ, Scott AM, Sloan EK, Hogarth PM et al (2019) Activated platelets in the tumor microenvironment for targeting of antibody-drug conjugates to tumors and metastases. *Theranostics* 9: 1154–1169



License: This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Annexe 4 : “Comprehensive molecular portrait reveals genetic diversity and distinct molecular subtypes of small intestinal neuroendocrine tumors”

Céline Patte*, Roxane M. Pommier*, Anthony Ferrari*, Felicia Chung, Maria Ouzounova, Pauline Moullé, Mathieu Richaud, Rita Khoueiry, Maëva Hervieu, Silvia Breusa, Marion Allio, Nicolas Rama, Laura Gérard, Valérie Hervieu, Gilles Poncet, Tanguy Fenouil, Vincent Cahais, Anne-Sophie Sertier, Anne Boland, Delphine Bacq-Daian, Benjamin Ducarouge, Julien Marie, Jean-François Deleuze, Alain Viari, Jean-Yves Scoazec, Colette Roche, Patrick Mehlen, Thomas Walter, Benjamin Gibert

Nature Communications, en révision

Les tumeurs neuroendocrines de l'intestin grêle (siNET) sont des tumeurs rares qui se développent à partir des cellules neuroendocrines de l'intestin grêle, appelées cellules entéroendocrines (EEC). Ces cellules sont essentielles pour la régulation de la digestion, l'absorption des nutriments et la motilité intestinale en sécrétant diverses hormones. Bien que les siNET croissent lentement, les patients sont souvent confrontés à des rechutes ou à des métastases dès le diagnostic. Ces tumeurs sécrètent des neurotransmetteurs, comme la sérotonine, pouvant entraîner un syndrome carcinoïde et une cardiopathie carcinoïde. Sans traitement antisécrétoire et intervention chirurgicale rapide pour remplacer les valves cardiaques, ces complications peuvent s'avérer fatales. Les siNET restent relativement peu explorées, et les mécanismes moléculaires de leur tumorigenèse sont encore mal compris. Des études menées sur des petites cohortes de patients montrent que ces tumeurs présentent une faible charge mutationnelle ainsi que peu de réarrangements chromosomiques (Elias et al., 2021). Dans ce projet, nous proposons de déchiffrer ces mécanismes en réalisant une cartographie détaillée de l'expression génétique de ces tumeurs, afin d'identifier d'éventuels sous-types moléculaires.

Nous avons mené une analyse approfondie sur une nouvelle cohorte de siNET provenant de 122 patients, en intégrant des données de séquençage de l'ARN, de méthylation de l'ADN, de génotypage ainsi que de séquençage complet du génome (WGS). Cette étude a permis d'identifier quatre sous-groupes moléculaires distincts (épithélial, vésiculaire, immunitaire et mésenchymateux) et cliniquement pertinents. Le groupe vésiculaire se distingue par des cellules entéroendocrines fortement différenciées, conservant de fortes caractéristiques neuroendocrines, et est associé à un pronostic favorable. En revanche, le groupe mésenchymateux est prédictif d'un mauvais pronostic et d'une faible réponse aux traitements, en raison de sa forte infiltration de fibroblastes associés au cancer, reconnus pour leur activité pro-tumorale. Les sous-types épithélial et immunitaire n'ont pas montré de différences significatives en termes de survie globale. Ces résultats suggèrent que les siNET devraient être considérées comme un ensemble de sous-types distincts, plutôt que comme une seule entité, comme cela a été le cas jusqu'à présent. Cette étude constitue une ressource précieuse pour explorer l'origine et les caractéristiques cliniques des siNET, offrant ainsi un grand bénéfice à la communauté scientifique.

En conclusion, cet article montre que :

- les siNET peuvent être classifiées en quatre sous-groupes moléculaires principaux (vésiculaire, épithélial, immunitaire et mésenchymateux), chacun ayant une importance clinique significative.
- le sous-groupe vésiculaire est caractérisé par des cellules neuroendocrines hautement différenciées et est associé au meilleur pronostic global.
- le sous-groupe épithélial représente un état intermédiaire de différenciation neuroendocrine.
- le sous-groupe immunitaire se distingue par un infiltrat immunitaire marqué, suggérant une probabilité élevée de réponse aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaires.
- le sous-groupe mésenchymateux est associé au pronostic le plus défavorable, avec un faible taux de sécrétion hormonale et une forte présence de CAF, qui semblent favoriser la croissance des siNET.
- cette étude apporte de nouvelles perspectives sur l'hétérogénéité des siNET ainsi que sur leur prise en charge clinique.

Ma contribution à ce manuscrit englobe la réalisation d'expériences *in vitro*, comprenant notamment l'extraction d'ARN à partir des échantillons de patients.

Annexe 5 : “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*, Camille Victoor, Ruxanda Chira, Aurélien Fonseca, Maëva Hervieu, Roméo Bergé, Justine Lengrand, Pauline Vieugué, David Neves, Isabelle Goddard, Mathieu Richaud, Pierre-Alexandre Laval, Nicolas Rama, David Goldschneider, Andréa Paradisi, Nicolas Gourdin, Sylvie Chabaud, Isabelle Treilleux, Nicolas Gadot, Isabelle Ray-Coquard, Stéphane Depil, Didier Decaudin, Fariba Némati, Elisabetta Marangoni, Eliane Mery-Lamarche, Catherine Génestie, Séverine Tabone-Eglinger, Mojgan Devouassoux-Shisheboran, Kathryn J. Moore, Benjamin Gibert, Patrick Mehlen, Agnès Bernet

Cell Death & Differentiation 30, 2201-2212 (2023)

Chaque année en France, près de 60 000 femmes sont diagnostiquées d'un cancer du sein, et parmi elles, 15 à 20% connaissent une récurrence dix ans après le diagnostic initial. Les cancers du sein dits « triples négatifs » sont particulièrement à risque de récurrence. La résistance aux traitements et les rechutes post-chimiothérapie ou immunothérapie représentent des défis thérapeutiques majeurs et constituent des obstacles significatifs à la survie à long terme des patientes. Une étude publiée en 2008 a révélé que les patientes diagnostiquées avec des métastases présentaient des tumeurs primaires avec une expression de la Nétrine-1 plus élevée que celles sans métastases (Fitamant et al., 2008). Pour évaluer l'impact de la Nétrine-1 sur le pronostic, nous avons mesuré son expression tumorale par RT-qPCR au sein d'une cohorte de 89 patientes atteintes de cancer du sein traitées par chimiothérapie conventionnelle, puis nous avons corrélié ces niveaux d'expression avec les données cliniques associées. Les résultats ont montré que la Nétrine-1 est un marqueur pronostique indépendant pour la progression clinique des cancers du sein. Ce constat a été corroboré dans une cohorte distincte de 51 patientes souffrant d'un carcinome séreux ovarien de haut grade.

Il est généralement reconnu que la résistance aux traitements antiprolifératifs est étroitement associée à la présence de cellules souches cancéreuses (CSC) ou de cellules initiatrices de tumeurs (TIC) (Reya et al., 2001). Dans cet article, nous mettons en évidence une corrélation significative entre l'expression de la Nétrine-1 et les niveaux des marqueurs des CSC, tels que CD44. En outre, dans divers modèles murins de résistance à la chimiothérapie, nous montrons que l'inhibition de Nétrine-1 à l'aide de l'anticorps NP137 peut réduire la croissance tumorale, diminuer la résistance à la chimiothérapie et retarder efficacement la rechute tumorale, cet effet étant lié à une diminution du nombre de CSC. Nous démontrons également que le blocage de la Nétrine-1 par l'action du NP137 réduit la résistance des tumeurs aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaires (IPCI), tels que l'anti-CTLA-4, lorsqu'ils sont administrés en combinaison. Cette réduction de la résistance est associée à une diminution du recrutement des cellules suppressives dérivées des myéloïdes, appelées MDSC polymorphonucléaires (PMN-MDSC), reconnues pour leur rôle dans la progression tumorale (Zhou et al., 2018b). En outre, nous avons fonctionnellement démontré que ces cellules immunitaires favorisent les caractéristiques des CSC, contribuant ainsi à une résistance accrue aux traitements anticancéreux.

Nos résultats suggèrent que la Nétrine-1 joue un rôle à la fois direct et indirect dans le maintien du renouvellement des cellules souches cancéreuses. Des études récentes ont démontré que la Nétrine-1 est impliquée dans les cellules souches pluripotentes induites, les cellules souches embryonnaires et la pluripotence naïve (Huyghe et al., 2020; Ozmadenci et al., 2015; Renders et al., 2021). Cependant, le lien entre ces caractéristiques de cellules souches normales et embryonnaires n'a pas encore été exploré dans le contexte des cancers, bien qu'une étude *in vitro* ait rapporté un rôle potentiel de la Nétrine-1 dans les CSC du glioblastome (Sanvoranart et al., 2016). Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour approfondir les mécanismes impliqués et déterminer si la diminution des CSC/TIC observée lors du blocage de la Nétrine-1 est associée à une augmentation de la mort cellulaire médiée par le récepteur UNC5B.

Nos travaux établissent pour la première fois un lien entre la Nétrine-1 et la progression des cancers du sein et de l'ovaire, et ouvrent la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques combinant chimiothérapies et immunothérapies classiques avec des agents ciblant la Nétrine-1. En s'appuyant sur ces recherches, un essai clinique de phase 2 (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04652076>) a été lancé à la fin de l'année 2020 pour

évaluer l'efficacité de l'anticorps anti-Nétrine-1 en combinaison avec des chimiothérapies standards et une immunothérapie.

En conclusion, cette nouvelle étude révèle que :

- L'expression de la Nétrine-1 est liée à la rechute et au maintien du caractère souche dans les tumeurs du sein et de l'ovaire.
- Le blocage de la Nétrine-1 induit la mort cellulaire et retarde la rechute après la chimiothérapie.
- Le ciblage de la Nétrine-1 réduit la résistance à la thérapie par IPCI.
- Les PMN-MDSC contribuent à l'enrichissement des cellules souches cancéreuses médié par la Nétrine-1 et à la résistance aux IPCI.

Ma contribution à ce manuscrit comprend la réalisation des expériences *in vivo*, notamment les xéno greffes de cellules murines, les injections de traitements et le suivi de la croissance tumorale.

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 Gènezie⁹, Séverine Tabone-Eglinger⁶, 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 (2023) 30:2201–2212; <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

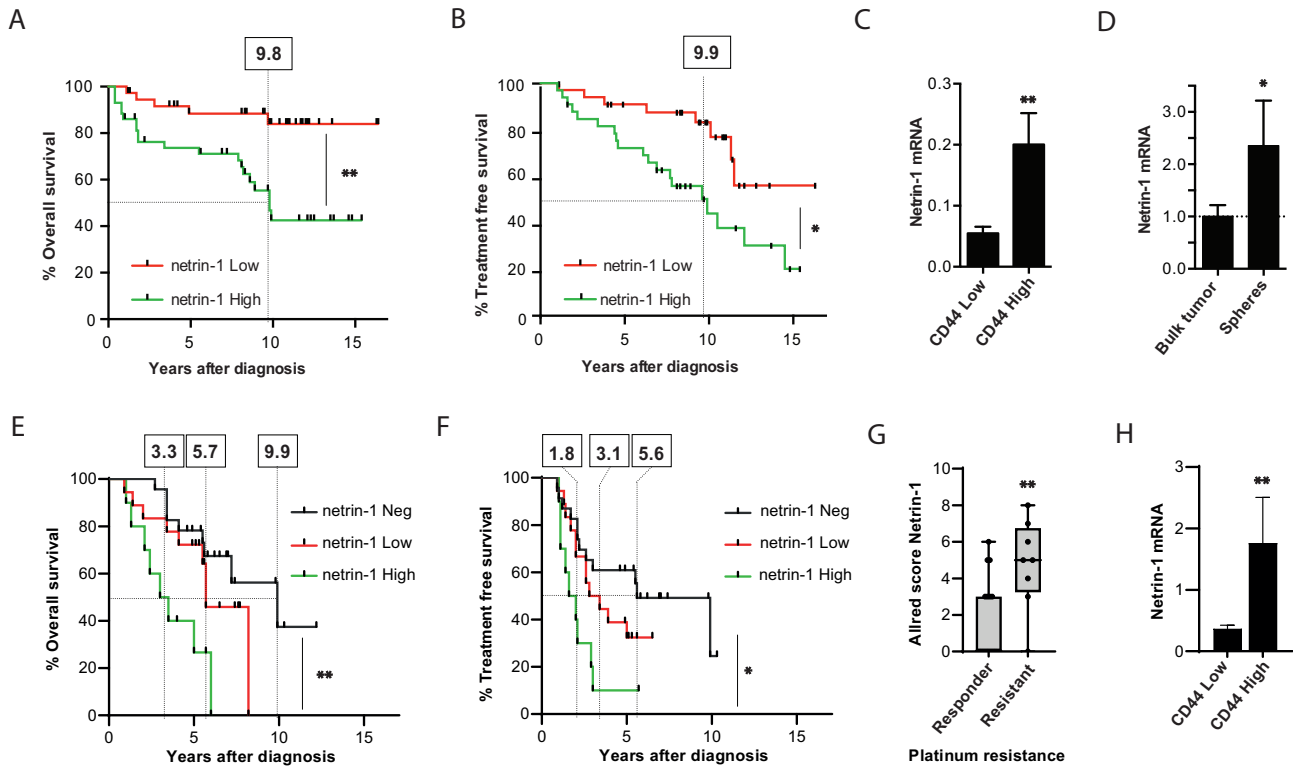


Fig. 1 Netrin-1 expression is a poor prognosis marker and correlates with stem cells marker in human breast and ovary cancers.

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

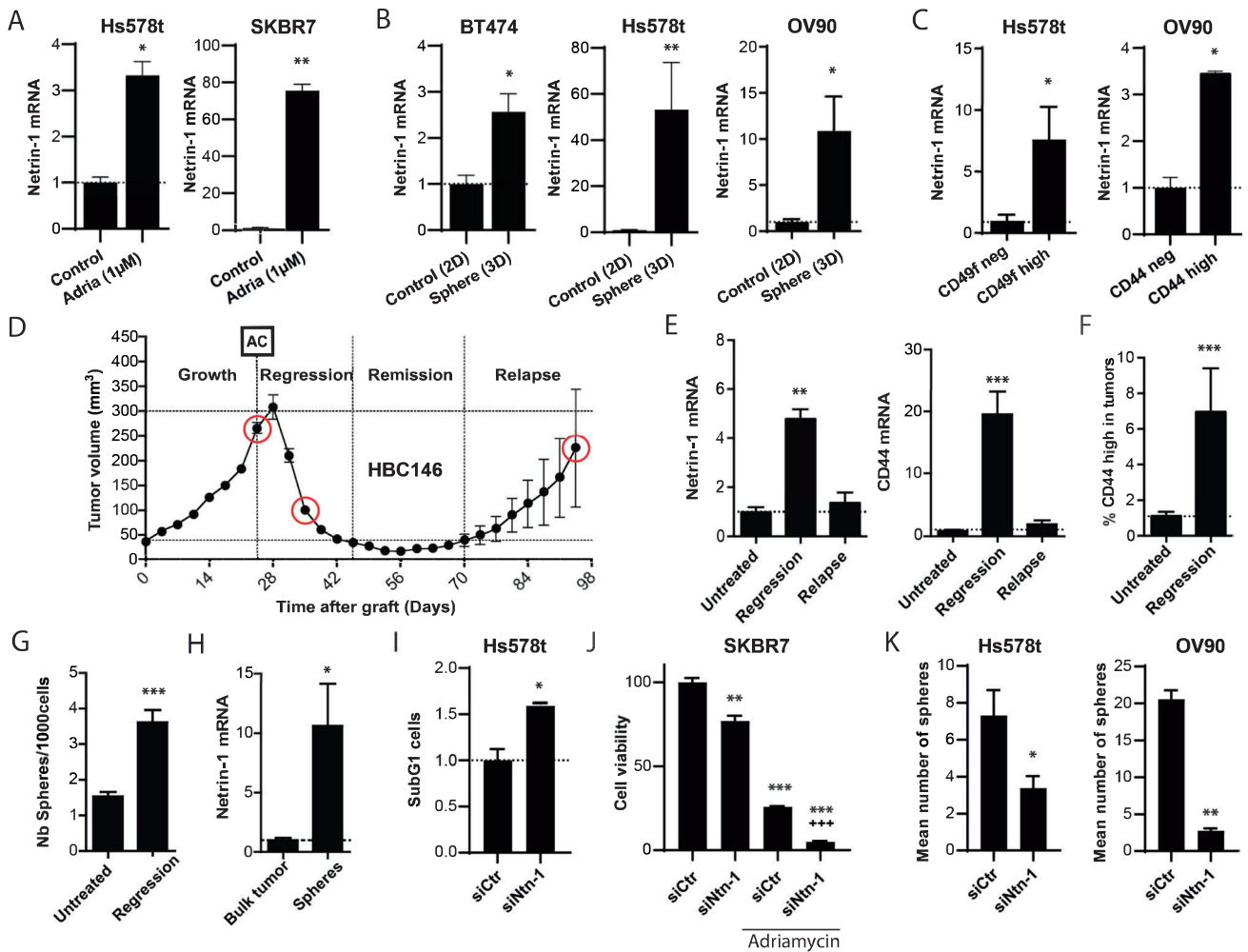


Fig. 2 Netrin-1 expression is associated with CSCs features in human cell lines and in a PDX model of breast cancer resistance to chemotherapy. **A** Netrin-1 mRNA expression level was measured by q-RT-PCR in Hs578t ($n = 3$) or SKBR7 ($n = 3$) cell lines treated 48 h with 1 μ M Adriamycin (Adria). Bars 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 (siCtr) or siRNA against Netrin-1 (siNtn-1) ($n = 3$). **J** Cell viability measured by WST1 assay in SKBR7 ($n = 3$) cell lines treated with siCtr and siNtn-1 alone or in combination with Adriamycin. Bars are mean values \pm SEM, normalized to the siCtr group (* are statistics against siCtr and + against siCtr + Adriamycin). **K** Number of mammospheres formed by 1000 viable cells of Hs578t ($n = 5$) and OV90 ($n = 3$) cell lines treated with siCtr and siNtn-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 monootherapy similarly failed to inhibit tumor growth (Supplementary Fig. 3B)

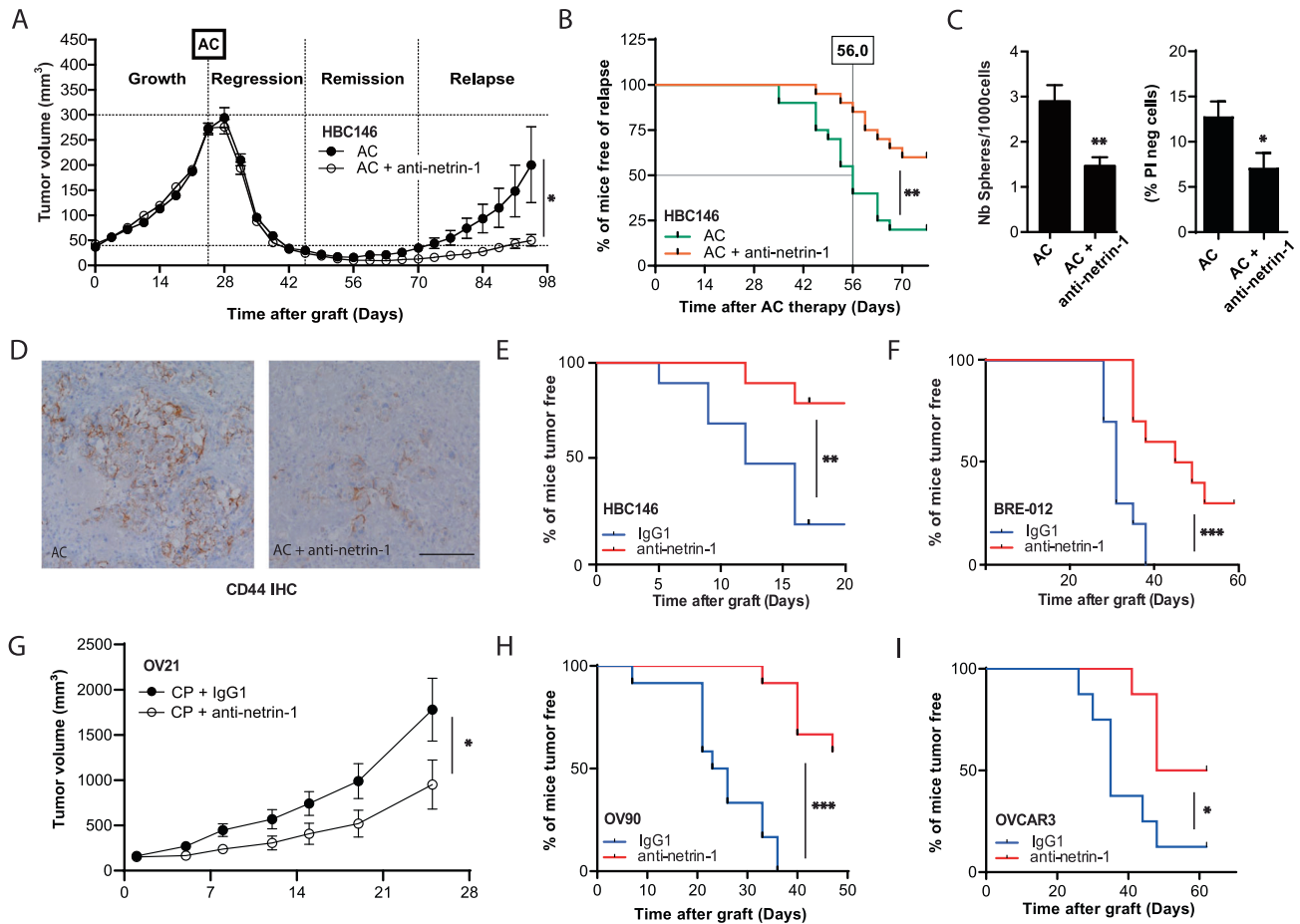


Fig. 3 Netrin-1 blockade delays cancer relapse and impact CSCs features. **A** Tumor volume was measured along the different phases of the HBC146 PDX model: Growth, Regression after chemotherapy (Adriamycin-Cyclophosphamide: AC), Remission and Relapse. At day 21, the mice were randomized into two groups 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-enuffment, 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.

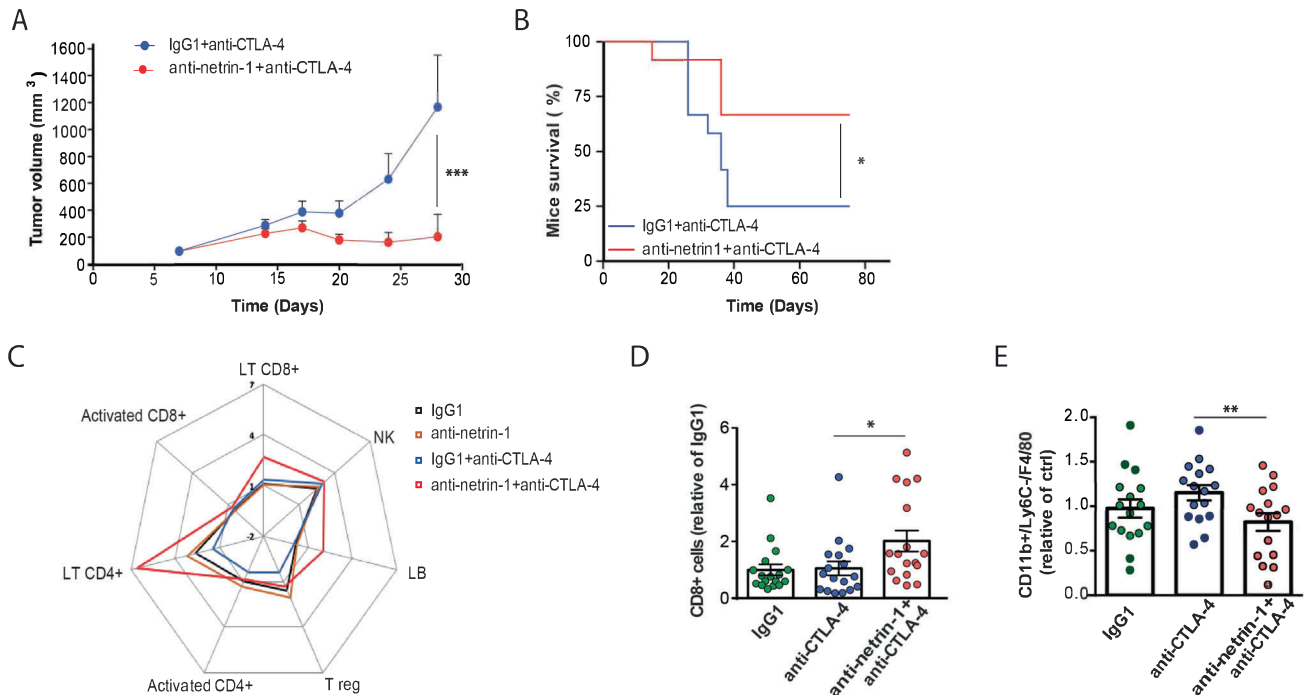


Fig. 4 Netrin-1 blockade alleviates resistance to immune checkpoint inhibitor anti-CTLA-4. **A** Tumor growth quantification of syngeneic EMT6 mammary carcinoma, in mice treated with control IgG1 or anti-netrin-1 mAb, in combination with anti-CTLA-4 mAb. **B** Kaplan-Meier survival analysis of the mice 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 were 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].

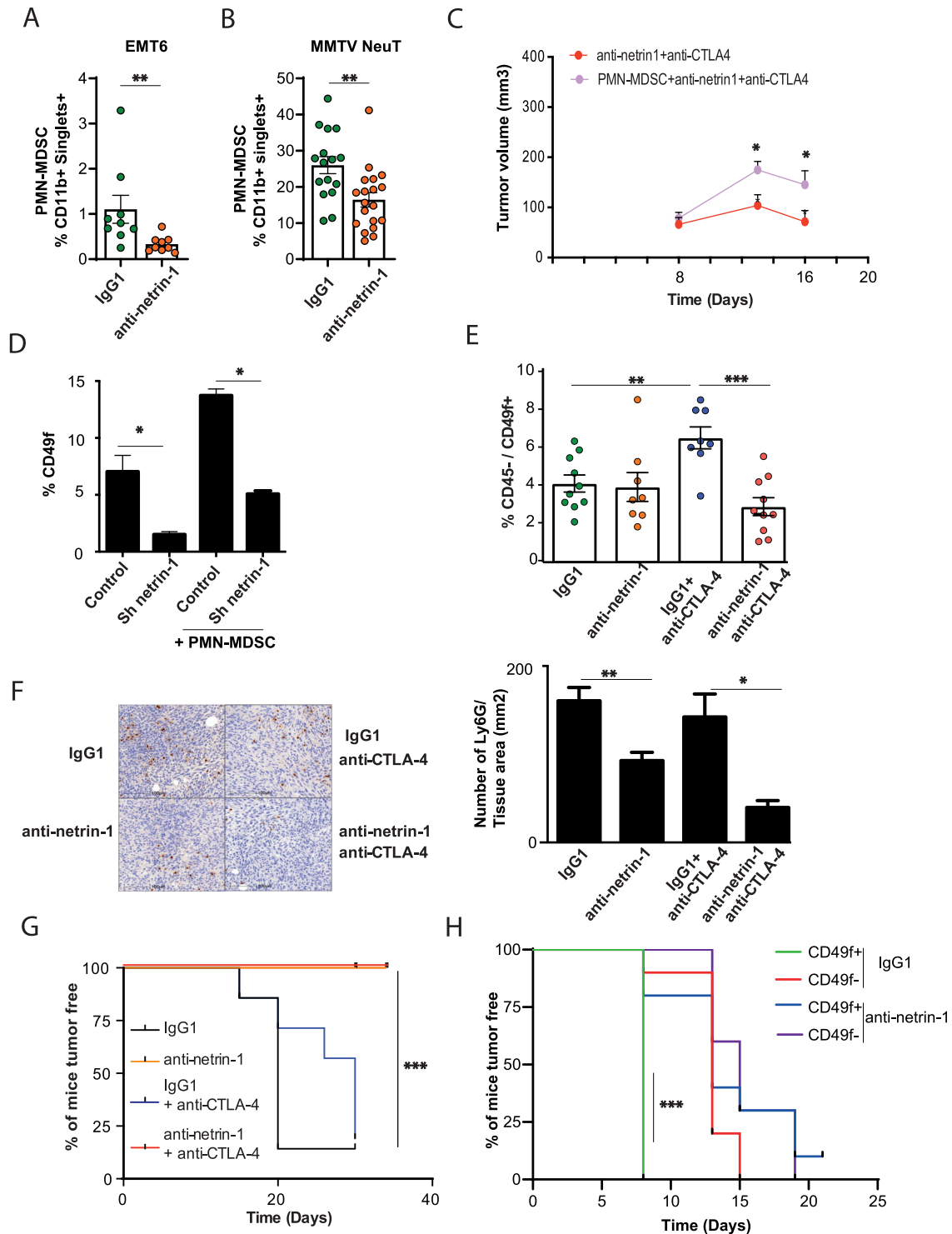
In parallel studies, we analyzed the tumor immune infiltrate using both lymphoid and myeloid panels by flow cytometry. We noticed an increase of CD8⁺ T lymphocytes within tumors of mice

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^{int/term}) 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 $CD11b^+ \text{ Singlets}^+$ cells among the $CD45^+$ ($CD11b^+ \text{ Ly6G}^+ \text{ Ly6C}^{\text{interm}}$) 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 $CD45^{\text{neg}}$ ($CD45^-$) 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/sgRNA-design-crisprai>). A control sgRNA targeting Firefly Luciferase was also designed. Sequences are as follows: sgUNC5B: 5'-GCGCGCTCTCGGAGCCCGG-3' and sgLUC: 5'-CGCCACGCGCCCTCCCGGG-3'. Forward and reverse sgRNA-coding oligos with Esp31 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'-CGCCTACATCGTAAAGAACA-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 BalbC/J 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 Biotech) 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. ALDEFUOR (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 mammosphere 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 mammosphere 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 accordingly 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

1. 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.
2. 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, Sathornsumtee 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, Pedoux 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, Courbebaisse 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, Murgan 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. Batlle 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, Izzue 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. Boneschanski 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'Ippolito 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, Nemat 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, Vieugué 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.

Annexe 6 : “Hepatic inflammation elicits production of proinflammatory netrin-1 through exclusive activation of translation”

Romain Barnault, Claire Verzeroli, Carole Fournier, Maud Michelet, Anna-Rita Redavid, Ievgeniia Chicherova, Marie-Laure Plissonnier, Annie Adrait, Olga Khomich, Fleur Chapus, Mathieu Richaud, Maëva Hervieu, Veronika Reiterer, Federica G. Centonze, Julie Lucifora, Birke Bartosch, Michel Rivoire, Hesso Farhan, Yohann Couté, Valbona Mirakaj, Thomas Decaens, Patrick Mehlen, Benjamin Gibert, Fabien Zoulim, Romain Parent

Hepatology 76, 1345-1359 (2022)

Les maladies hépatiques chroniques (MHC) affectent plus d'un milliard de personnes dans le monde et sont les principales causes de lésions hépatiques, de cirrhose et de carcinome hépatocellulaire (CHC). Malgré leurs diverses origines, incluant les infections, les troubles métaboliques, les toxines et les facteurs génétiques, les MHC aboutissent toutes à une inflammation hépatique. Cette inflammation stimule le renouvellement des hépatocytes et la réparation des tissus, mais peut également exacerber la fibrogenèse, conduisant à la cirrhose et au développement d'un CHC. Une meilleure compréhension des mécanismes inflammatoires et de leurs effets pourrait contribuer à améliorer les stratégies de traitement des MHC.

Dans cet article, nous avons identifié la Nétrine-1 comme un facteur dont l'expression est induite par l'inflammation hépatique et avons élucidé son mode d'activation. Nous avons observé que l'induction de la Nétrine-1 n'est pas liée à des modifications de la transcription, de l'épissage ou de la stabilité de l'ARN, mais repose sur un mécanisme d'induction jusqu'ici inconnu : une activation exclusivement translationnelle. Ce processus implique le transfert de l'ARNm de la Nétrine-1 vers le réticulum endoplasmique (RE), l'interaction directe entre la protéine Staufen-1 (STAU1) et ce transcrit, ainsi que la mobilisation de la Nétrine-1 depuis sa forme liée à la cellule. STAU1 est une protéine de liaison à l'ARN qui joue un rôle crucial dans la régulation de la traduction et du transport de l'ARNm. Elle intervient dans la régulation post-transcriptionnelle de nombreux ARNm, en particulier ceux riches en séquences GC et

présentant des structures spécifiques dans leurs régions non traduites (UTR) 5'. Nos résultats montrent que STAU1 se fixe directement au transcrit de la Nétrine-1 au niveau du RE, où la Nétrine-1 est traduite et mobilisée pour la sécrétion. Ainsi, STAU1 semble moduler la traduction de la Nétrine-1 en régulant à la fois l'accumulation du transcrit et son transfert vers la voie sécrétoire.

Enfin, nous avons évalué l'effet de l'anticorps anti-Nétrine-1 dans deux modèles murins d'inflammation hépatique. L'analyse de l'expression de 248 cytokines inflammatoires a révélé qu'un traitement au poly (I:C), un activateur des récepteurs toll-like (TLR) 2/TLR3/TLR6, ainsi que des récepteurs de l'ARN double-brin, entraînait une augmentation de l'expression de 81 cytokines pro-inflammatoires. Cependant, le traitement avec l'anticorps NP137 contre la Nétrine-1 a permis de restaurer l'expression de 15 de ces cytokines, principalement des chimiokines et des acteurs du système de l'interféron. De plus, l'anticorps NP137 a diminué le nombre de macrophages Ly6C⁺ dans le foie, une population activée par les chimiokines CCL2, CCL3 et CCL5. Ces résultats suggèrent que la Nétrine-1 joue un rôle dans l'amplification de l'inflammation hépatique.

En conclusion, cette nouvelle étude montre que :

- L'inflammation stimule l'augmentation de la protéine Nétrine-1, sans entraîner d'élévation de son ARNm, tant dans les échantillons cliniques que chez la souris.
- STAU1 médie l'induction de la Nétrine-1 en interagissant directement avec son transcrit.
- Cette interaction entre STAU1 et l'ARNm de la Nétrine-1 facilite son transfert vers le RE et sa traduction subséquente.
- L'administration de l'anticorps anti-Nétrine-1 réduit l'inflammation hépatique chez la souris.

Ma contribution à ce manuscrit comprend la réalisation de certaines expériences *in vivo*, notamment le traitement au NP001, NP137 et poly (I:C) et le sacrifice des souris.

ORIGINAL ARTICLE

Hepatic inflammation elicits production of proinflammatory netrin-1 through exclusive activation of translation

Romain Barnault^{1,2,3,4,5}  | Claire Verzeroli^{1,2,3,4,5}  | Carole Fournier⁶  |
 Maud Michelet^{1,2,3,4,5}  | Anna Rita Redavid^{2,3,4,5,7}  |
 Ievgeniia Chicherova^{1,2,3,4,5}  | Marie-Laure Plissonnier^{2,3,4,5,8}  | Annie Adrait⁹  |
 Olga Khomich^{1,2,3,4,5}  | Fleur Chapus¹⁰  | Mathieu Richaud^{2,3,4,5,7}  |
 Maëva Hervieu^{2,3,4,5,7}  | Veronika Reiterer¹¹  | Federica Grazia Centonze¹¹  |
 Julie Lucifora^{1,2,3,4,5}  | Birke Bartosch^{1,2,3,4,5}  | Michel Rivoire^{12,13} |
 Hesso Farhan¹¹  | Yohann Couté⁹  | Valbona Mirakaj¹⁴  |
 Thomas Decaens⁶  | Patrick Mehlen^{2,3,4,5,7}  |
 Benjamin Gibert^{2,3,4,5,7}  | Fabien Zoulim^{1,2,3,4,5,15}  | Romain Parent^{1,2,3,4,5} 

¹Pathogenesis of Chronic Hepatitis B and C Laboratory - LabEx DEVweCAN, Inserm U1052, Cancer Research Centre of Lyon, Lyon, France

²University of Lyon, Lyon, France

³University Lyon 1, Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Lyon, France

⁴CNRS UMR5286, Lyon, France

⁵Centre Léon Bérard, Lyon, France

⁶Institute for Advanced Biosciences, Inserm U1209, University of Grenoble-Alpes, La Tronche, France

⁷Apoptosis, Cancer and Development Laboratory - LabEx DEVweCAN, Inserm U1052, Cancer Research Centre of Lyon, Lyon, France

⁸Inserm U1052, Cancer Research Centre of Lyon, Lyon, France

⁹University of Grenoble-Alpes, Inserm, CEA, UMR BioSanté U1292, CNRS CEA FR2048, Grenoble, France

¹⁰Single Cell Dynamics Group, Epigenetics and Stem Cell Biology Laboratory, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, Durham, North Carolina, USA

¹¹Institute of Pathophysiology, Medical University of Innsbruck, Innsbruck, Austria

¹²Léon Bérard Cancer Center, Lyon, France

¹³Université Lyon 1, Lyon, France

¹⁴Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, University Hospital of Tuebingen, Eberhard-Karls University, Tuebingen, Germany

¹⁵Service of Hepato-Gastroenterology, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

Correspondence

Romain Parent, Inserm Unit 1052, 151
 cours Albert Thomas, F-69424-Lyon
 Cedex 03, France.
 Email: romain.parent@inserm.fr

Abstract

Background and Aims: Netrin-1 displays protumoral properties, though the pathological contexts and processes involved in its induction remain understudied. The liver is a major model of inflammation-associated cancer development, leading to HCC.

Abbreviations: Arg, arginine; CLD, chronic liver disease; dsRNA, double-stranded RNA; ECM, extracellular matrix; ER, endoplasmic reticulum; FSL-1, Pam2CGDPKHPKSF; HMW, high molecular weight; HRP, horseradish peroxidase; IHC, immunohistochemistry; LPS, lipopolysaccharide; Lys, lysine; *NTN1*, netrin-1; Pam3CSK4, Pam3CysSerLys4; PDI, protein disulfide isomerase; PHH, primary human hepatocytes; poly(I:C), polyinosinic:polycytidylic acid; RIG-I, retinoic acid-inducible gene I; RT-qPCR, reverse transcription quantitative polymerase chain reaction; STAU1, Staufen-1; TLR, toll-like receptor; UTR, untranslated region.

Romain Barnault and Claire Verzeroli contributed equally to this work.

SEE EDITORIAL ON PAGE 1237

© 2022 American Association for the Study of Liver Diseases.

Funding information

Romain Barnault and Ievgeniia Chicherova are recipients of a DevWeCan Labex (Laboratories of Excellence Network, ANR-LABX-061) and Agence Nationale de la Recherche sur le Sida et les Hépatites Virales (ECTZ63958) predoctoral fellowships, respectively. Funding was obtained through the same Labex consortium (ANR-LABX-061) and the French National Cancer Institute (Inca PRT-K 19-033). Proteomic experiments were partially supported by the French National Research Agency under projects ProFI (Proteomics French Infrastructure, ANR-10-INBS-08) and GRAL, a program from the Chemistry Biology Health Graduate School of University of Grenoble-Alpes (ANR-17-EURE-0003)

Approach and Results: A panel of cell biology and biochemistry approaches (reverse transcription quantitative polymerase chain reaction, reporter assays, run-on, polysome fractionation, cross linking immunoprecipitation, filter binding assay, subcellular fractionation, western blotting, immunoprecipitation, stable isotope labeling by amino acids in cell culture) on in vitro-grown primary hepatocytes, human liver cell lines, mouse samples and clinical samples was used. We identify netrin-1 as a hepatic inflammation-inducible factor and decipher its mode of activation through an exhaustive eliminative approach. We show that netrin-1 up-regulation relies on a hitherto unknown mode of induction, namely its exclusive translational activation. This process includes the transfer of *NTN1* (netrin-1) mRNA to the endoplasmic reticulum and the direct interaction between the Staufen-1 protein and this transcript as well as netrin-1 mobilization from its cell-bound form. Finally, we explore the impact of a phase 2 clinical trial-tested humanized anti-netrin-1 antibody (NP137) in two distinct, toll-like receptor (TLR) 2/TLR3/TLR6-dependent, hepatic inflammatory mouse settings. We observe a clear anti-inflammatory activity indicating the proinflammatory impact of netrin-1 on several chemokines and Ly6C+ macrophages.

Conclusions: These results identify netrin-1 as an inflammation-inducible factor in the liver through an atypical mechanism as well as its contribution to hepatic inflammation.

INTRODUCTION

Chronic liver diseases (CLDs) affect more than 1 billion people worldwide. They represent the main etiological conditions for the onset of liver injury, impaired liver function (cirrhosis), and HCC.^[1] Though CLDs exhibit a high degree of diversity in terms of causal effects, including infectious (HBV and HCV), metabolic, toxic, and genetic, they all converge toward hepatic inflammation and represent a pertinent model for its study. Inflammation in turn drives hepatocyte turnover, extracellular matrix (ECM) accumulation, histological worsening, and the long-term induction of tumorigenic mediators such as IL-6, eventually leading to the development of HCC.^[2] A clear understanding of the onset of this inflammatory response and of its outcome in the hepatic tissue is hampered by biologically opposite functions, as it favors viral and dead cell clearance, as well as histological wound healing, but exacerbates fibrogenesis, thus inducing cirrhosis and oncogenesis. Hence, the identification of factors involved in the harmful consequences of inflammation may lead to its clinical improvement.

Netrin-1 is well known for preventing cellular apoptosis through its binding to “dependence receptors,”^[3–5] and we demonstrated that it is HBV-HCV induced^[6] and endowed hepatocytes with resistance to apoptosis during the unfolded protein response (UPR),^[7] a hallmark of CLDs and cirrhosis. Owing to the causal link

between inflammation, cancer in general, and HCC, we hypothesized that hepatic inflammation and netrin-1 may be reciprocal influencers in the liver. However, conflicting data currently depict the implication of netrin-1 in inflammation by either exacerbating^[8,9] or dampening^[10–12] the inflammatory response according to the setting studied. This prompted us to test its inducibility and inflammatory contribution in the liver in the context of previous descriptions in inflammatory bowel disease and colorectal cancer.^[13,14]

MATERIALS AND METHODS

For better reproducibility, methods that have necessitated in-depth in-house development describing transfection, preparative and analytical biochemistry, generation of Netrin-1 Crispr cell lines, flow cytometry analysis, netrin-1 IHC, ImmunoPrecipitation, and mass spectrometry (MS) are exhaustively described in Supporting Information 8.

Clinical samples

Clinical liver samples were used under the French Institutional Review Board (IRBAQ61) “CPP South-East IV” approval #A16/207 (2016) related to the Inserm unit 1052 Hepatology biobank, France (#DC2008-235).

Commercial TMAs used (US Biomax) were the following: LV2084, LV2081, LV8011a, LV2085, and LV2086, of which 34 normal and chronic hepatitis samples were analyzed. Written informed consent was obtained from each patient and conformed to the ethics guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki. All activity scores were determined by the pathology department of the Lyon University Hospital.

Animal housing, treatment, and sample harvest

All trials were performed under the French Lyon IRB agreement #CECCAP_CLB_2014_015 as previously described.^[50] All the mice received humane care according to the criteria outlined in the NIH Guide for the care and use of laboratory animals, and all the treatments were approved by the institutional animal care and use committee. Eight-week-old C57BL/6J mice (Janvier Labs, Saint-Berthevin, France) were injected intraperitoneally with NP001 or NP137 antibodies (10 mg/kg; circulating half-life of 48 h in the mouse) and poly(I:C) or FSL-1 (Pam2CGDPKHPKSF) (30 µg/mouse and 1 µg/mouse, respectively, Invivogen, Toulouse, France) at indicated doses or vehicle control for 16 h and sacrificed before liver harvest. Due to liver zonation considerations, all analyses were performed after selection on ice of the median hepatic lobe of all animals.

Statistics

Normal distribution of data was first assayed using the Shapiro-Wilk test. All quantitative data were tested using the two-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test or with the Mann-Whitney test. Slope data were analyzed using the Mann-Whitney test.

RESULTS

Inflammation fosters netrin-1 protein, but not mRNA, up-regulation in clinical samples, in vitro, and in mice

Data related to clinical samples can be found in the Supporting Information 1. In order to probe the robustness of these correlative clinical data, we investigated the potential impact of experimentally induced inflammation using a panel of toll-like receptor (TLR) ligands, namely Pam3CysSerLys4 (Pam3CSK4) as a TLR1/2 agonist, lipopolysaccharide (LPS) as a TLR4 agonist, flagellin as a TLR5 agonist, FSL-1 as a TLR2/6 agonist, Riboxsol (molecularly defined TLR3 agonist), and finally low or high molecular weight

(HMW) polyinosinic:polycytidylic acid [poly(I:C)] as TLR3, RIG-I (retinoic acid-inducible gene I), and melanoma differentiation-associated protein 5 agonists. Experiments were carried out on HepaRG cells^[15] and in primary human hepatocytes (PHH). RIG-I was also probed as a control. Pam3CSK4, LPS, FSL-1, Riboxsol, and HMW poly(I:C) induced netrin-1, suggesting its relevance in the hepatic environment. Inducibility was confirmed in PHH for Pam3CSK4, LPS, Riboxsol, and HMW poly(I:C) (Figure 1A). Chronic viral liver infections represent one of the major etiologies of CLDs, and, though still controversial for HBV, HBV and HCV have been reported to be direct inducers of double-stranded RNA (dsRNA)-based responses,^[16,17] which in turn unleash an inflammatory response in hepatocytes. TLR3 signaling may be activated by a variety of ligands derived from HCV infection or other viral motifs,^[18] commensal bacteria^[19] or hepatotoxicity.^[20] We hereafter focused on the dsRNA analogue poly(I:C) of HMW as a viral mimetic and TLR3 agonist and robust netrin-1 inducer.

We initially assayed inflammation-related netrin-1 induction in the liver in vivo. To achieve this, C57BL/6J male and female mice were challenged with HMW poly(I:C), before harvesting their liver. Although poly(I:C) injection did not increase ALT levels in mouse serum in females and marginally in males (Figure S3A), several other markers of inflammation (*chemokine [C-X-C motif] ligand 10*, *IL-1B*, *IL-6*, *KC*) were induced in both sexes. Interestingly, the inducibility of inflammation was higher in females (Figure S3B). Though *NTN1* (netrin-1) mRNA induction was not observed within total RNA populations, a western blot and immunohistochemistry (IHC) approach uncovered netrin-1 induction, which appeared to a greater extent in female mice (Figure 1B–E). Such data suggest a causal link between inflammation, inflammation intensity, and netrin-1 induction. By IHC, netrin-1 staining yielded a homogenous, and therefore most likely hepatocytic as well, staining pattern, similar to previous data obtained in human liver.^[6]

To gain further insight into the mechanisms of netrin-1 production, we conducted a set of in vitro experiments using HepaRG cells^[15] as well as PHH, where poly(I:C) led to netrin-1 protein induction in a dose- and time-dependent manner (56- and 7-fold increase in HepaRG and PHH after 72 h, respectively). The RIG-I inducible marker was monitored to verify poly(I:C) activity (Figure 2A). As a laminin-related protein, netrin-1 is secreted and may accumulate at the extracellular surface of the plasma membrane. We thus tested netrin-1 signals by immunoprecipitation after heparin-based release of plasma membrane-bound netrin-1. Data indicate that the previously observed netrin-1 up-regulation concerns the plasma membrane-bound netrin-1 pool in both cell types (Figure 2B). Importantly, netrin-1 up-regulation by inflammation was unrelated to cell death protection (Supporting Information 2).

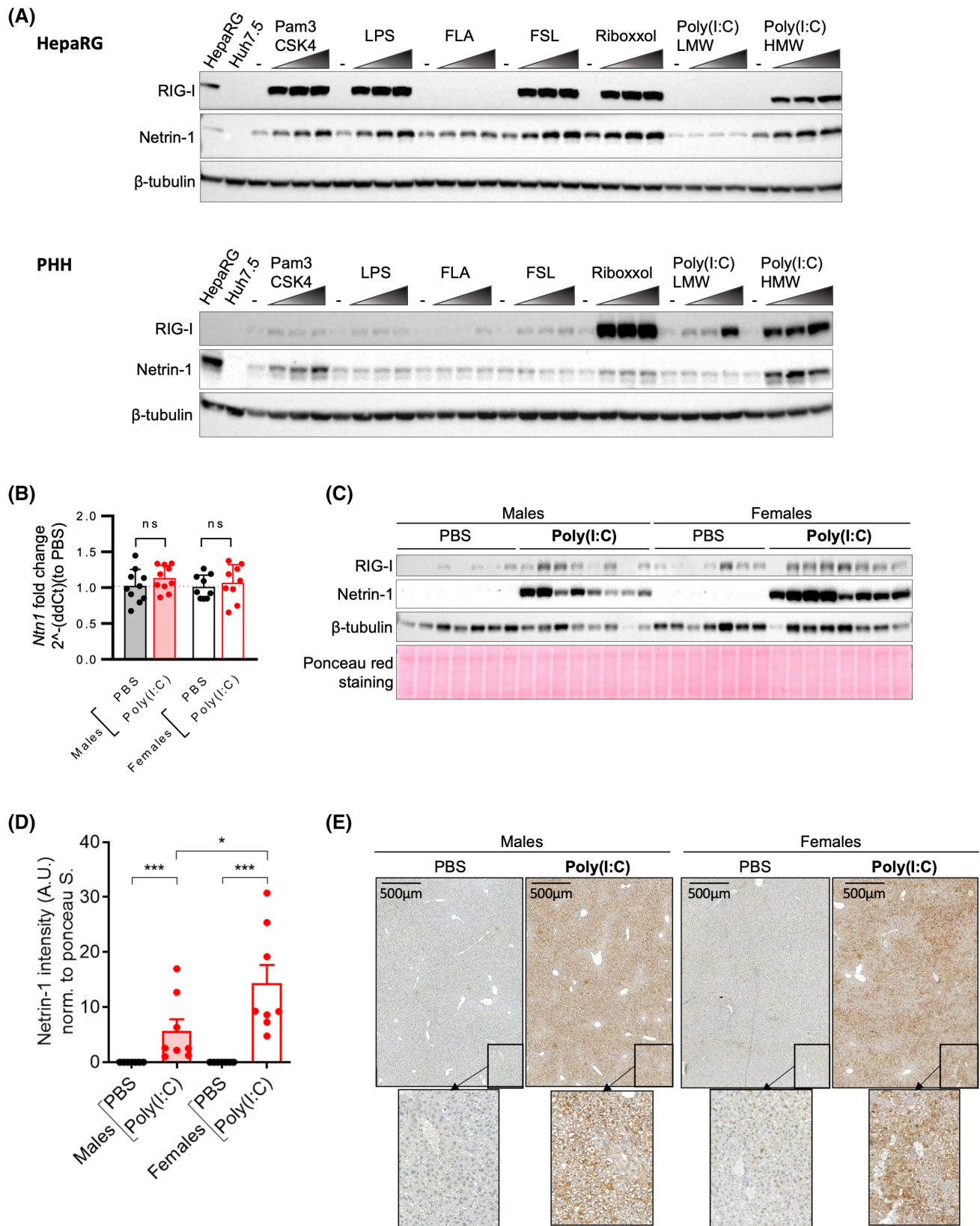


FIGURE 1 Netrin-1 induction in vivo and in vitro. (A) Netrin-1 expression levels were evaluated by immunoblotting ($n = 3$). (B) Levels of *NTN1* mRNA in total RNA extracts processed from mouse livers were quantified by RT-qPCR. (C) The same liver extracts were probed for immunoblotting. (D) Densitometric quantification of netrin-1 on mice blots. (E) IHC on netrin-1 using the same antibody. Data are representative of a total of 40 mice [10 females, 10 males, \pm poly(I:C), Mann-Whitney test (n.s)]. [Correction added on June 21, 2022, after first online publication: the authors have unpurposely rotated the zoomed image derived from PBS-injected female mice. The authors provide here the updated figure containing the upright image. The contents described do not alter in any way the scientific data of the paper.]

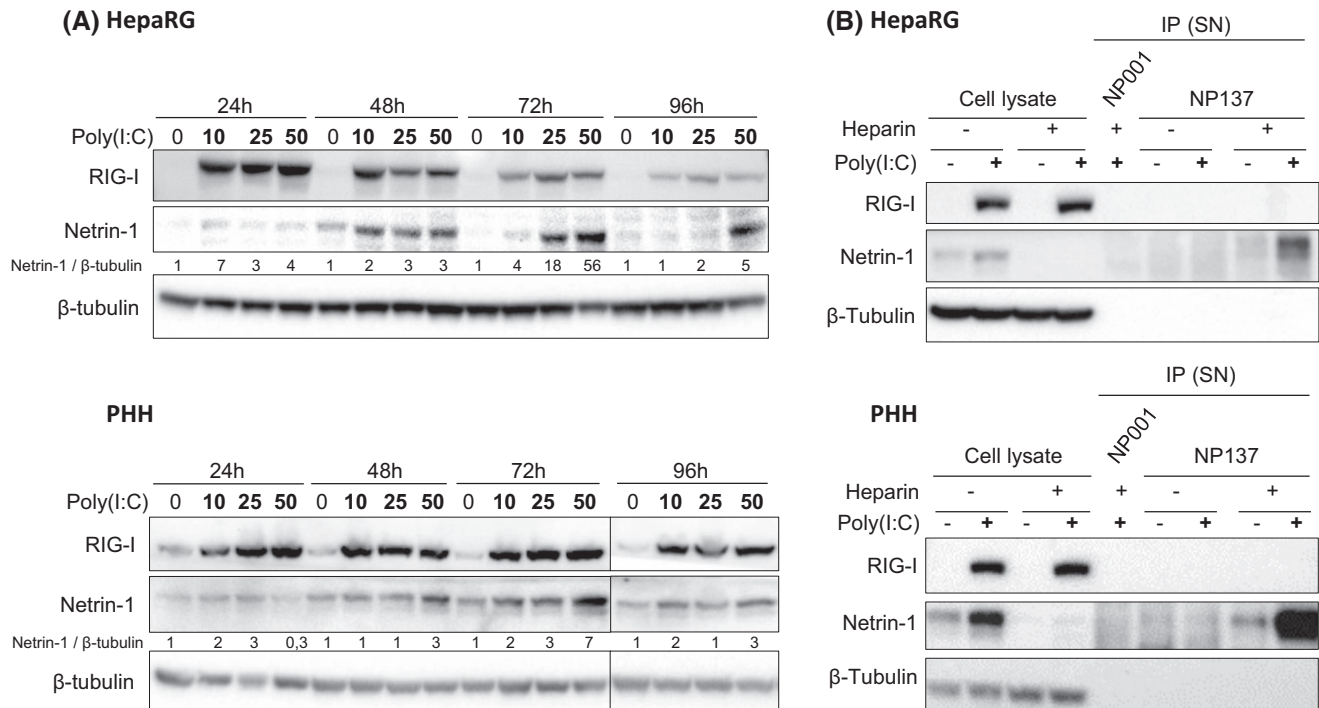


FIGURE 2 Cell-associated and soluble netrin-1 levels are up-regulated by poly(I:C) in HepaRG cells and in PHH. (A) Netrin-1 expression levels were evaluated by immunoblotting. (B) Netrin-1 expression levels were evaluated by immunoblotting in total cell lysates or after immunoprecipitation in supernatants, with or without heparin pretreatment. NP001, isotype control; NP137, anti-netrin-1 Ig. RIG-I was used as a poly(I:C) activity control ($n = 3$, HepaRG; and $n = 3$ distinct PHH batches in both panels)

Netrin-1 up-regulation is translational and differs in immortalized/dedifferentiated cells versus primary hepatocytes

We have first demonstrated that netrin-1 induction does not rely on transcription, RNA splicing, or RNA stability (Supporting Information 3). Following the next step in the biogenetic processing of netrin-1, we then considered translational regulation as a potential contributor to netrin-1 protein induction. We first submitted HepaRGs as amenable cells for mechanistic studies, PHHs, and mouse livers to total polysomal fractionation using sucrose gradient-based isopycnic ultracentrifugation followed by gradient trace monitoring, RNA extraction, and reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) on the *NTN1* transcript. Adequate fractionation could be evidenced using gradient UV traces. The presence of the peak of free RNA, followed by the 40S, 60S, and 80S ribosomal subunits and preceding the typical oscillating profile of successive polyribosomes, was identified (Figure 3A, black and red traces). As expected, translation was more active in HepaRG cells than in resting, optimally differentiated, PHH, or mouse livers. Moreover, for HepaRG cells, the percentage of polysome-bound *NTN1* mRNA signals versus total *NTN1* signals remained unchanged on poly(I:C) treatment (87.9% versus 86.0% in treated cells), whereas in PHH, a major shift of the *NTN1* signal could be observed toward the polysomal compartment

of the gradient (46% versus 89%) (Figure 3B–C). The polysomal association of the netrin-1 transcript in mouse livers led to a clear shift of *NTN1* toward heavy polysomes (fractions 13–17) that are associated with strong translational activity. In order to confirm this, an EDTA release control experiment^[21] was carried out in all types of samples. EDTA induces polysomal collapse through Mg^{2+} and Ca^{2+} chelation, enabling the evaluation of the genuine polysomal origin of the RT-qPCR signals, and reinforced these results (Figure 3A–C). Our data advocate for distinct modes of regulation of netrin-1 induction in HepaRG hepatocyte-like cells and fully differentiated environments such as PHH and mice livers. Unlike in HepaRGs, mouse livers and PHH appear to activate total polysome-based translation of the *NTN1* transcript for the final induction of the protein. Yet, netrin-1 biogenesis mechanisms remain uncharted at this stage of the study in HepaRG cells, which are representative of late stage CLD.^[15]

Because translational propensity of a transcript may be to some extent uncoupled from its level of association to polysomes, intensities of *de novo* synthesis of the netrin-1 protein in inflammatory conditions and in naïve HepaRG cells were then quantified. Nascent proteins were labeled with heavy amino acids on treatment or not with poly(I:C) using a pulsed stable isotope labeling by amino acids in cell culture method before netrin-1 immunoprecipitation and MS-based proteomic analyses. This strategy indicated a 4.5-fold increase

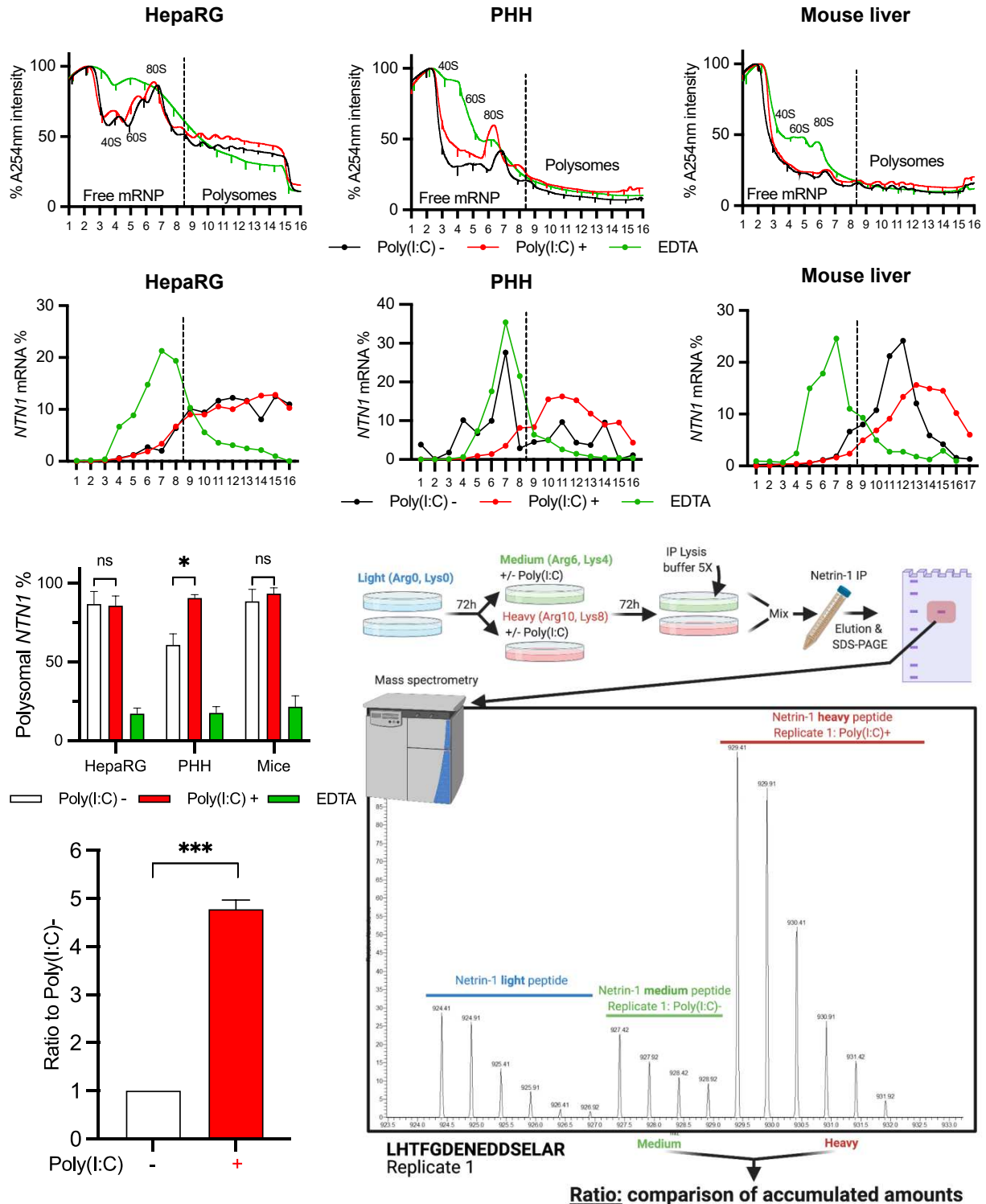


FIGURE 3 Inflammation activates translation of the *NTN1* transcript in HepaRG cells, PHH, and mouse livers. Samples were homogenized in polysome lysis buffer and loaded onto a linear sucrose gradient before isopycnic ultracentrifugation. (A) Representative profile of UV gradient traces. (B) *NTN1* distribution profile. Total polyribosomes were processed for *NTN1* ($n = 3$, HepaRG; $n = 3$ distinct PHH donors, $n = 6$ female mice). Mann-Whitney test, $*p < 0.05$. (A,B) An EDTA release control assay was performed by adding EDTA to lysates before ultracentrifugation (green values). (C) Quantification of corresponding signals. (D) Total lysates and supernatants (and labeled with medium or heavy lysine [Lys] or arginine [Arg] isotopes supplemented in Lys/Arg-free William's E medium) were lysed, quantified for total protein amounts, and mixed 1:1 before netrin-1 immunoprecipitation. (E) Immunoprecipitated material was run onto SDS-PAGE and submitted to tryptic digestion and isotope-specific mass spectrometry-based quantification ($n = 3$ independent experiments). Diagram used the BioRender software. Mann-Whitney test, $***p < 0.001$

in *de novo* synthesis of netrin-1 in inflammatory conditions versus naïve cells (Figure 3D,E). These data suggest that if ribosomal loading by the *NTN1* transcript *per se* is not modulated in HepaRG cells, as observed after polysomal fractionation, processes increasing the susceptibility of the *NTN1* transcript to translation are strong candidates.

Staufen-1 mediates netrin-1 induction through direct interaction with the *NTN1* transcript

Netrin-1 is a secreted protein, and its translation should naturally take place in association with endoplasmic reticulum (ER) membranes so that cotranslational translocation of the nascent peptide across the ER membrane may occur through the transient association of the peptide's signal sequence with the translocon.^[22]

Therefore, netrin-1 translation is conditioned by two distinct events: association with polyribosomes and accumulation of the transcript at the ER level for subsequent transfer of the native peptide to the secretory pathway. Given the pathophysiological relevance of dedifferentiated cells in CLD, we took into consideration this process in order to determine divergences between HepaRG cells and PHH for netrin-1 induction. Based on the so-called “sequential extraction” method,^[23] which allows the investigation of mRNA partitioning between cytosol and microsomes, we verified netrin-1 mRNA enrichment following poly(I:C) treatment using three protein markers (RIG-I and caspase-3 as cytosolic proteins and the ER-associated PDI (protein disulfide isomerase)/P4HD protein; Figure 4A). Whereas no significant alteration in cytosolic or membrane-bound levels of *NTN1* transcripts was evidenced on poly(I:C) treatment in PHH, the level of *NTN1* transcript enrichment in membrane-bound versus cytosolic fractions

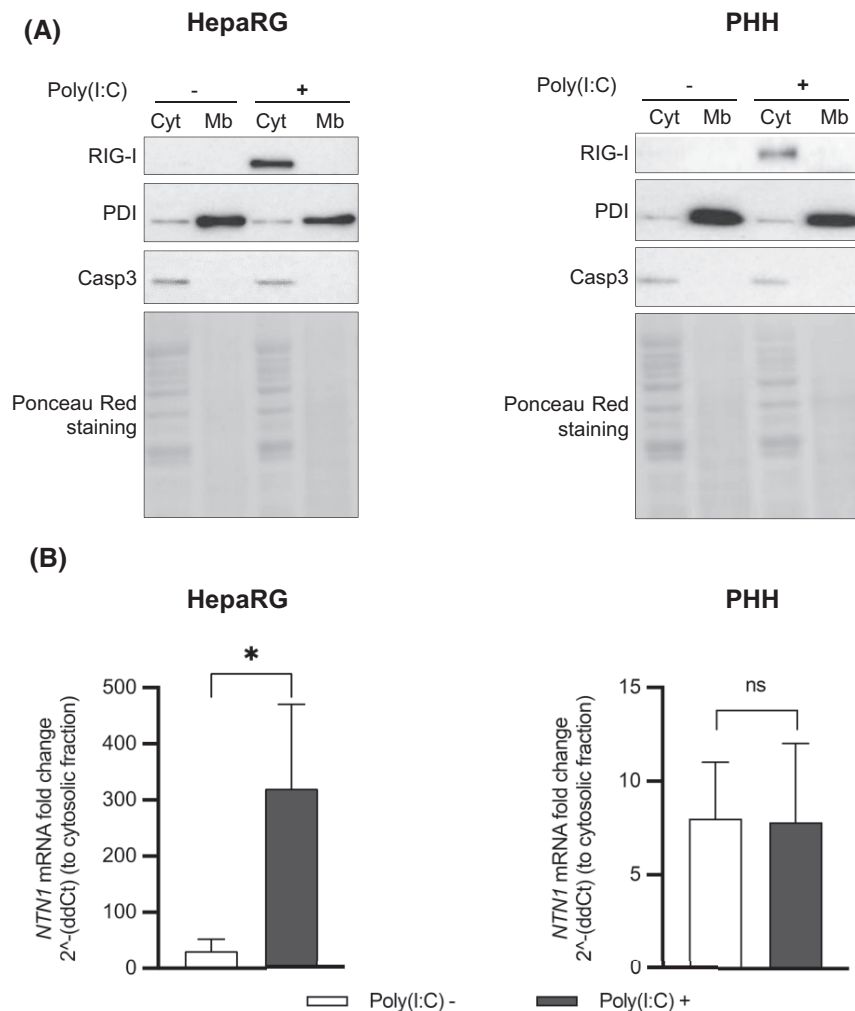


FIGURE 4 *NTN1* accumulates in membrane/ER-positive fractions on poly(I:C) treatment in HepaRG cells. (A) Adequate partitioning was verified by Western blotting on PDI (internal membrane contents) and caspase-3 (cytosolic contents). RIG-I (cytosolic location) was also probed as a poly(I:C) activity control. The Stephens et al.^[23] sequential extraction method was used. (B) *NTN1* transcripts were monitored for their partitioning. Mann-Whitney test, * $p < 0.05$ [$n = 3$ (HepaRG), and $n = 3$ distinct PHH batches in both panels]

increased by 7-fold in inflammatory HepaRG cells (Figure 4B). These findings indicate that translational induction of netrin-1 occurs through the transfer of the *NTN1* transcript to the ER before its active translation in HepaRG cells. We then identified that this phenotype was not sensitive to altered differentiation in vitro (Supporting Information 4).

We then focused on *NTN1* mRNA relocalization by conducting a bibliographic search for proteins participating in transport and translational regulation of highly structured, GC (guanine-cytosine)-rich mRNAs in their 5' ends, which the *NTN1* transcript belongs to.^[7] The RNA-binding protein Staufen-1 (STAU1) shuttles between the cytosol and the ER thanks to its association with microtubules through its tubulin binding domain.^[24] STAU1 is implicated in translational activation through GC-rich, structured 5' untranslated regions (UTRs)^[25] and was proposed to bind to the *NTN1* transcript in high throughput experiments.^[26,27] In resting HepaRG cells, STAU1 displayed a granular staining also observed in other studies, where it associates with RNA granules before or after movement on microtubules.^[28,29] Interestingly, poly(I:C) triggered the reconfiguration of STAU1 signals from a granular to a microtubule-like filamentous pattern, also in accordance with other studies.^[30] The number of STAU1-positive granular foci per cell decreased 11-fold and the percentage of STAU1 filamentous staining-positive cells increased 9-fold with poly(I:C) (Figure 5A,B). STAU1 staining also displayed an increased overlap with PDI+ (ER) areas, quantified using the Li colocalization coefficient. (Figure 5C). Accumulation of STAU1 at these ER+ areas on poly(I:C) treatment was verified by immunoblotting after subcellular fractionation using previously described markers (Figure 5D). Such data suggest that STAU1 may be involved in netrin-1 induction.

Direct interaction between STAU1 and netrin-1 mRNA promotes its transfer to the ER and its subsequent translation

In order to test interactions between STAU1 and the full length netrin-1 mRNA in our biological context, we set up a cross linking immunoprecipitation assay in UV cross-linked HepaRG cells using a variety of relevant positive and negative control transcripts.^[26,27] Immunoprecipitation conditions for STAU1 were first defined (Figure 6A). Data depicted in the following panel show significant increase in STAU1-bound *NTN1* levels versus several other transcripts, in addition to a specific and positive impact of poly(I:C) *per se* on these *NTN1* binding levels to STAU1. Percentages of transcript inputs are indicated in poly(I:C)-treated or untreated conditions in Figure 6B.

To further probe the likelihood of a direct interaction between STAU1 and *NTN1*, we carried out a filter binding assay using recombinant STAU1 and in vitro transcribed *NTN1* 5'UTR, which provides information on the affinity of both partners and on their class of interaction dynamics downstream of collected STAU1-bound, RNA-conjugated, biotin-avidin-horseradish peroxidase (HRP) signals. Based on the profiles obtained, filter binding data were fit to a sigmoidal equation to determine binding constants and to estimate the degree of binding cooperativity. Calculation of K_d led to a value of 1.17 ± 0.11 nM. Calculation of the Hill constant was done using the formula $\text{Log}(81) / \text{Log}(EC_{50}/EC_{10})$ ^[31] and led to a value of 1.9 ± 0.28 , suggesting a moderately cooperative interaction. As a control, no interaction between an HBV epsilon loop RNA sequence and STAU1 was observed. In competition experiments, incubation of increasing concentrations of unlabeled *NTN1* 5'UTR led to displacement of the prebound labeled *NTN1* 5'UTR RNA, whereas, again, no reversion of STAU1-*NTN1* 5'UTR complex-derived signals could be achieved using HBV control RNA (Figure 6C,D). Altogether, such data suggest that the RNA-binding protein STAU1 directly associates with the 5'UTR of the netrin-1 transcript. This finding corroborates the accumulation of STAU1 at the ER level for enhanced translational susceptibility of the mRNA of this secreted protein.

In order to functionally confirm the implication of STAU1 in the accumulation of the *NTN1* transcript at ER sites for netrin-1 protein induction, we tested the effect of RNAi-mediated STAU1 depletion on poly(I:C)-induced *NTN1* accumulation at the ER and on netrin-1 induction. Both approaches showed reversion of poly(I:C)-induced netrin-1 signals in HepaRG cells (Figure 6E–G). In order to assess whether dependence of netrin-1 induction toward STAU1 is widespread in dedifferentiated hepatocytic contexts, we depleted STAU1 in the Hep3B cell line and in PHH as a control. We observed that netrin-1 induction was also reversed by STAU1 depletion in Hep3B cells but not in PHH, which is data consistent with the abovementioned *NTN1* mRNA transfer-independent phenotype of the latter (Figure S11). Altogether, these mechanistic data indicated that STAU1-dependent transcript transfer to the ER in dedifferentiated hepatocytic cells determined netrin-1 induction. A comparison of results obtained in hepatocytic lines and PHH suggests that mRNA relocalization and translational activation *per se* seem to be mutually exclusive mechanisms across both cell environments yet, importantly, converging and enabling netrin-1 induction. We finally also demonstrated that netrin-1 induction does not rely on posttranslational steps (Supporting Information 5), providing final evidence that netrin-1 induction occurs through exclusive translational activation.

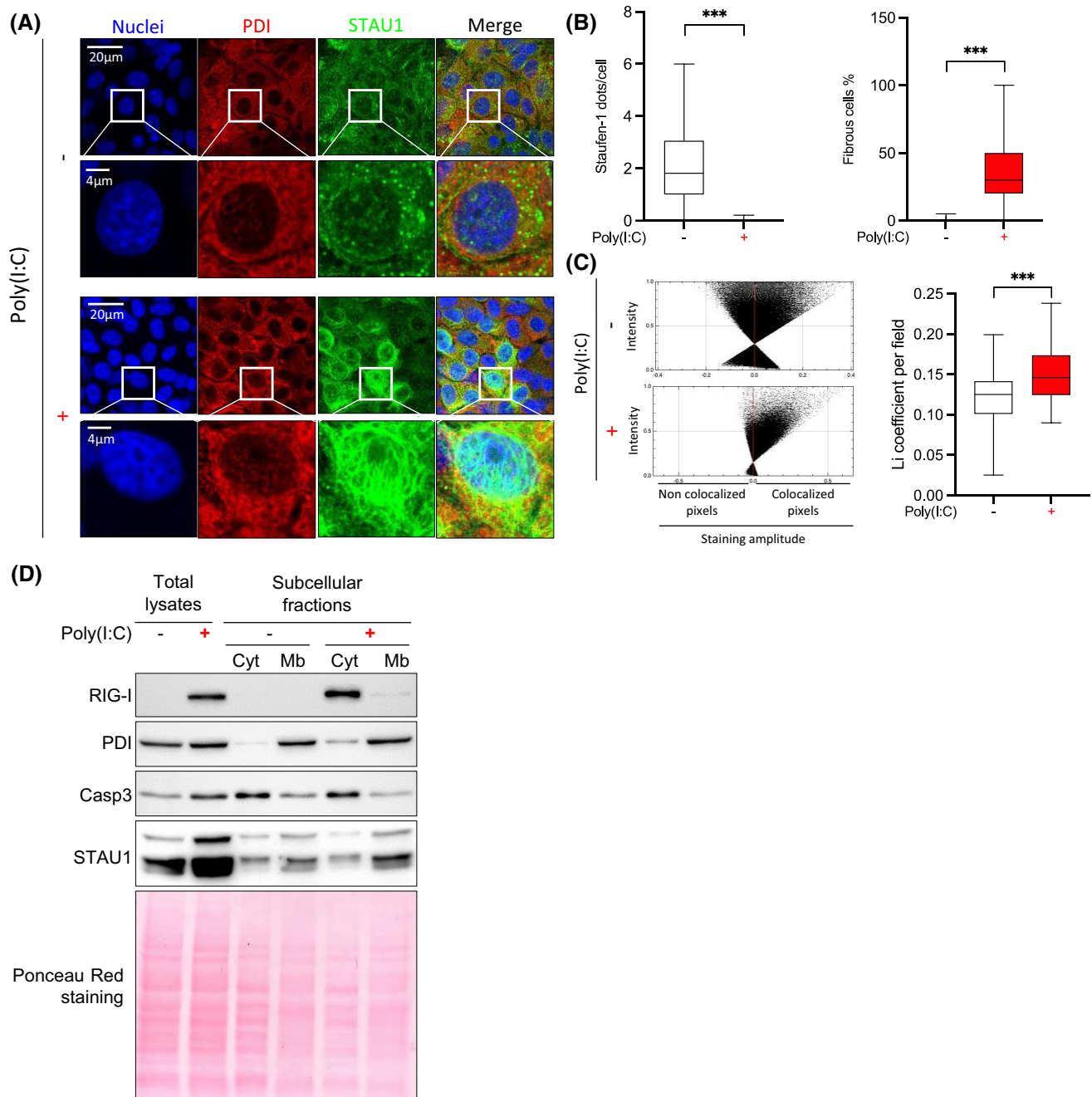


FIGURE 5 Poly(I:C) induces STAU1 relocalization and accumulation at the ER. (A) Representative immunofluorescence-based localization of PDI (red) and STAU1 (green). (B) Number of STAU1-positive dots per cell and percentage of fibrillar STAU1-positive cells versus total cells are shown. Mann-Whitney test after Shapiro-Wilk test ($*p < 0.05$, $n = 3$ independent experiments). (C) Li diagrams coefficient calculations for PDI and STAU1 colocalization quantification, respectively, using the JACop plugin from the ImageJ software. Twenty random fields were acquired per biological sample ($n = 3$ independent experiments). (D) STAU1 transfer to the ER on inflammation assessed by immunoblotting. Markers used are depicted in Figure 4A ($n = 3$ independent experiments)

A phase 2 trial-validated antibody enabling netrin-1 capture unravels its contribution to hepatic inflammation in mice

We first identified netrin-1 as a diffusible factor during inflammation (Supporting Information 6). Considering that

this diffusible status corroborated previously known tissue effects of netrin-1,^[8,9,32,33] we treated C57BL/6J mice with the clinically used and well-tolerated anti-netrin-1 antibody NP137 (NCT02977195)^[34] or its NP001 isotopic control 32 h before challenging them with poly(I:C) for 16 h and liver harvest (Figure 7A). Treatment with the former dampened poly(I:C)-induced netrin-1 levels (Figure 7B,C)

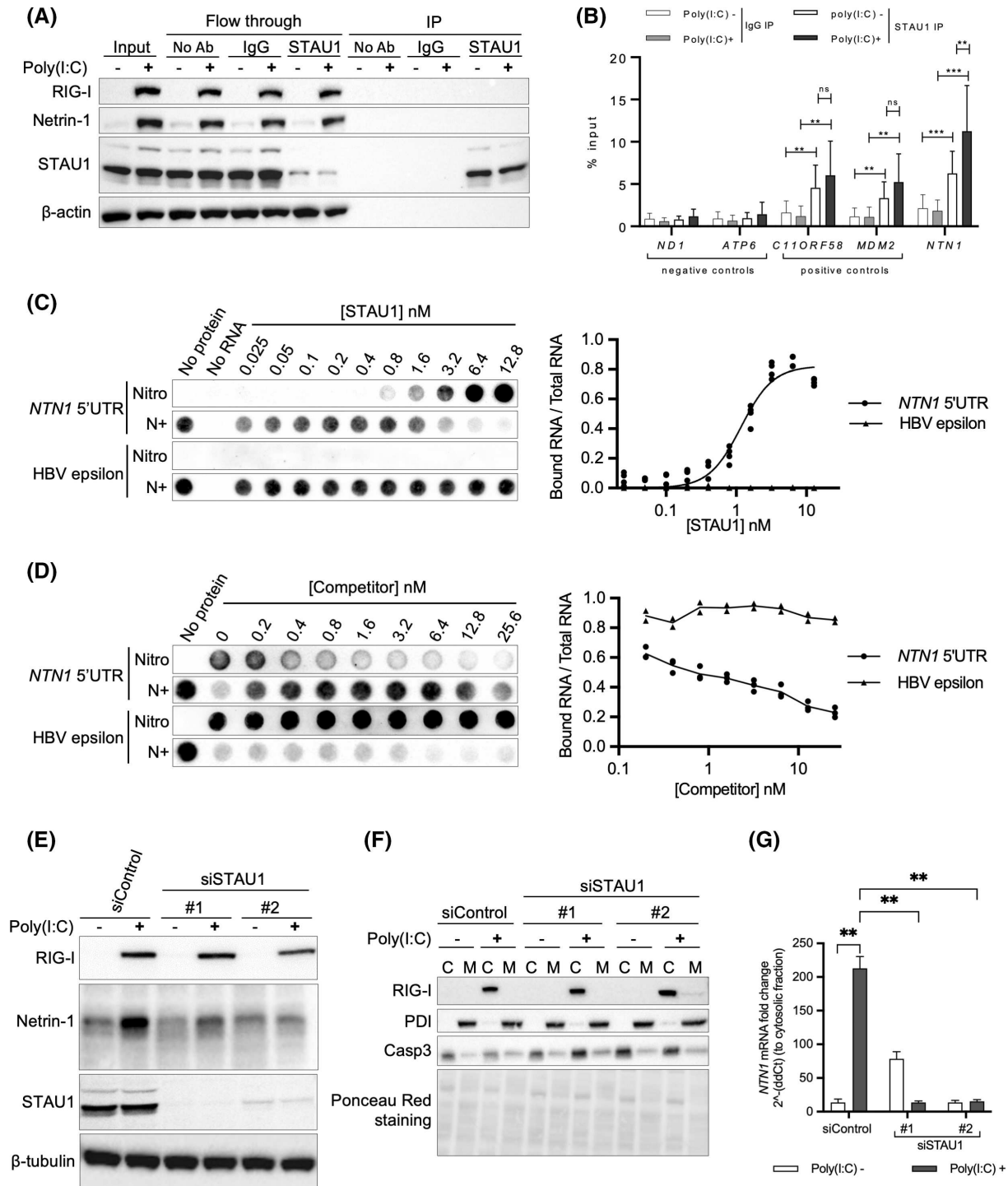


FIGURE 6 STAU1 interacts with *NTN1* mRNA through its 5'UTR and conditions *NTN1* transcript relocalization as well as netrin-1 induction in HepaRG cells. (A) cross linking immunoprecipitation/STAU1 immunoprecipitation. HepaRG cell lysates were immunoprecipitated before elution and one-dimensional SDS-PAGE. (B) Negative control (mitochondrial) transcripts, positive control transcripts for STAU1 binding,^[26] and *NTN1* were quantified on immunoprecipitated materials relatively to inputs. Mann-Whitney test, *** $p < 0.01$ ($n = 5$ independent experiments). (C) Filter binding assay. The ability of the biotin-labeled *NTN1* 5'UTR RNA to bind STAU1 was assessed by measuring the ratio of HRP signals between the upper nitrocellulose (Nitro) membrane (adsorbing complexes) and the lower nylon (N+) membrane (adsorbing unbound RNA). HBV RNA epsilon loop was a negative control. (D) Competition experiments using the filter assay approach. Prebound STAU1-*NTN1* 5'UTR biotin(+) complexes were submitted to increased concentrations of unlabeled competitors (*NTN1* 5'UTR or HBV epsilon RNAs). Corresponding quantification of HRP signals and obtained parameters derived from one representative experiment are shown ($n = 5$ independent experiments). (E) Impact of STAU1 depletion by immunoblotting. (F) Adequate partitioning in control and STAU1-depleted cells between cytosolic (C) and membrane (M) fractions was addressed by Western blotting on PDI (internal membrane contents) and caspase-3 (cytosolic contents). RIG-I (cytosolic location) was probed. (G) *NTN1* was then quantified by RT-qPCR in both fractions. Mann-Whitney test, ** $p < 0.01$ ($n = 3$ independent experiments). [Correction added on June 21, 2022, after first online publication: due to too high contrast of the initial netrin-1 blot image, the authors provided an updated Figure 6 displaying the same uncontrasted image. The contents described do not alter in any way the scientific data of the paper.]

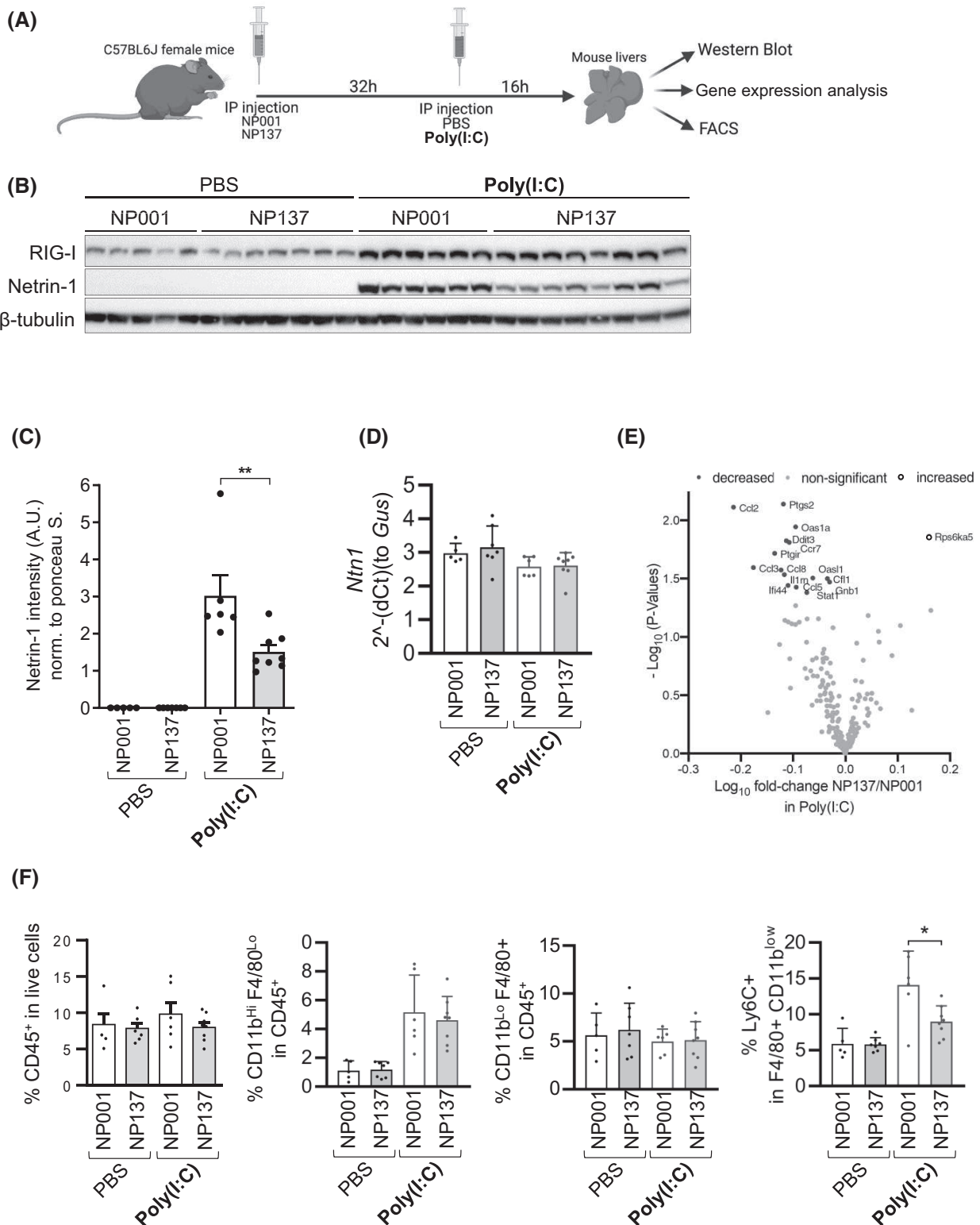


FIGURE 7 Netrin-1 capture by a clinically used antibody dampens hepatic inflammation in mice. (A) Workflow created with Biorender.com. (B) Hepatic netrin-1 levels in mice were measured by western blotting. (C) Quantification of signals. (D) *Ntn1* was quantified by RT-qPCR. (E) Transcripts conditioned by netrin-1 levels. (F) Percentage of positive live (DsRed) cells against CD45, CD11b, F4/80, and Ly6C markers are indicated ($n = 5-8$ mice per group). Mann-Whitney test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

in addition to its netrin-1 capture activity.^[34] Such events occurred again independently of *NTN1* RNA up-regulation in all instances (Figure 7D). Gene expression analysis was conducted on a panel of 248 inflammation-related cytokines. Poly(I:C)-triggered up-regulation of 81 inflammation-related transcripts (Table S7). Our experiment highlighted a causal relationship between netrin-1 inactivation by NP137 and reversion of the induction of 15 transcripts, of which several encode chemokines (chemokine [C-C motif] ligand [Ccl] 2, -1.63-fold; *Ccl3*, -1.51-fold; *Ccl5*, -1.64-fold; *Ccl8*, -1.33-fold). Four actors related to the inflammation-associated interferon system (signal transducer and activator of transcription [Stat] 1, 2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 2'-5'-oligoadenylate synthetase like, interferon induced protein 44 were also significantly reversed, albeit more weakly, together with the master regulator of inflammation cyclooxygenase prostaglandin-endoperoxide synthase 2 and its product prostaglandin I2. Consistently, the only NP137-induced transcript out of the 248 analyzed targets encodes an anti-inflammatory kinase, ribosomal protein S6 kinase A5 (+1.44-fold, Figure 7E). In order to further document this phenotype that implicates several chemotactic factors, we performed a flow cytometry analysis to monitor immune cell population regulation. Gating strategies are shown in Figure S15, where the three left panels depict Ly6C⁺ CD11^{low} F4/80^{hi} gateings (from top to bottom: Poly(I:C)+ and NP001, Poly(I:C)+ and NP137, and finally Ly6C fluorescence minus one control on pooled cells from all mice). Monocyte-derived macrophages (CD45⁺ CD11b⁺ F4/80^{low}) remained stable. Total Kupffer cells (CD45⁺ CD11b^{low} F4/80^{hi}) counts were not regulated. However, the NP137 antibody specifically reversed Ly6C⁺ intrahepatic macrophages counts in inflammatory conditions (Figure 7F), a population that is activated by CCL2, CCL3, and CCL5 in four distinct models of CLD.^[35–37] Confirmatory data were obtained in the context of lipopeptide FSL-1–driven inflammation (Supporting Information 7). Hence, such data identify netrin-1 as an amplifier of liver inflammation induced by two unrelated microbial classes of triggers (dsRNA and lipopeptides), in accordance with its role in other organs.^[8,9,32]

DISCUSSION

In the present study, we identify a to-date unknown mode of induction of netrin-1 and unveil the implication of STAU1 during inflammation. Transcriptional regulation is considered to be a hallmark regulatory step in liver differentiation processes,^[38] and regulation of netrin-1 has been repeatedly identified as transcription dependent through hypoxia inducible factor 1 alpha subunit or NF-κB transcriptional complexes,^[10,13,39] suggesting this work's timeliness. However, increasing evidence suggests that processes that need swift temporal regulation in highly remodeled tissues, such

as during inflammation, and, more generally, oncogenic processes and associated resistance, also rely on translational modulation.^[40,41]

For instance, hepatocytic differentiation is strongly associated with important down-regulation of a majority of transcripts at the total RNA level and a concomitant up-regulation in polysomal fractions of a subset of hepatocytic differentiation-related mRNAs.^[42] Experimental activation of the mTOR pathway, which is present in half of HCC cases, impairs hepatocytic differentiation and impedes the translation of transcripts moderating lipid homeostasis and cell growth.^[43] Following the UPR, netrin-1 translation is selectively favored during global translation shutdown, together with internal ribosome entry site–bearing transcripts implicated in cell survival and transformation.^[7] Moreover, the liver is one of the most, if not the most, active secretory and metabolic organs in human physiology, as well as being exposed to real-time needs for metabolic and hence secretory regulation (acute phase, postprandial phases). It is thus conceivable that the biogenesis of secreted factors such as netrin-1 are more often constrained by swift regulatory processes such as translational control in the liver than in other organs. The present data, to be interpreted as a confirmation of the particular susceptibility of netrin-1 to posttranscriptional regulation, strengthen the need for more frequent molecular analyses of inflammatory processes using total RNA-unrelated enrichment methods, such as polysomal profiling, at least at the level of the liver.

Moreover, we have shown, depending on the cell system of interest, i.e., undifferentiated HepaRG or PHH, that netrin-1 biogenesis under inflammation was specifically regulated at the mRNA localization level in the former but at the translational level *per se* in the latter case. The presence of these mechanisms is of interest, because it appears that two distinct modes of posttranscriptional regulation actually converge toward a single phenotypic outcome, i.e., netrin-1 increase. Pathophysiological needs for delivering this final phenotype therefore seem to override cell type-specific functional singularities, suggesting that induced netrin-1 conveys important functions in the liver, either immunomodulatory^[8,9,32,33] or, in the long term, merging with hepatoprotection as an antiapoptotic factor.^[3–5,44]

This phenotype relies on the RNA-binding protein STAU1, the implication of which is to-date undocumented in inflammation. However, STAU1 has recently been shown to foster gastric cancer progression in a cyclin- and kinase-dependent manner^[45] and also to take part in an enhancer Of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit-related, HCC-promoting pathway,^[46] suggesting the relevance of further studies aiming at characterizing its implication in end-stage liver disease, possibly through netrin-1. Interestingly, STAU1 regulates cortical neurogenesis, a process that is highly dependent on netrin-1 as well.^[47]

This work suggests a potential link between hepatic inflammation and liver disease progression through netrin-1. Direct cross-talks between inflammation and HCC have been notably defined through the IL-6/glycoprotein 130/STAT3 axis and lymphotoxin beta.^[48] Our study improves the understanding of the potential implication of inflammation in the evolution of CLDs and identifies an actionable target for its modulation. Chronic inflammation of a given tissue is counterbalanced by ECM growth. As mentioned before, netrin-1 is a laminin-related protein that shares several structural features with ECM-constituting proteins. As a consequence, one may hypothesize that netrin-1 could participate in ECM growth. A recent study featuring netrin-1 as a fibrosis promoter in the inflammatory lung^[49] strengthens the likelihood of this hypothesis. Finally, the humanized anti-netrin capture antibody NP137 developed by the authors^[34] (US Clinical Trials #02977195) displays anti-inflammatory activity in the present setting and identifies netrin-1 as a previously unknown proinflammatory factor in CLD.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank B. Bancel (pathologist, Lyon U. Hospital) for determining the activity scores; M. Ressejac for help with FACS processing; A. Paradisi for the netrin-1 promoter reporter plasmid; the CIQLE and Anipath platforms for assistance with confocal microscopy and IHC, respectively; and B. Manship for editing.

CONFLICT OF INTEREST

Dr. Mehlen owns stock in Netris Pharma.


AUTHOR CONTRIBUTIONS

Substantial contribution to conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data: Romain Barnault, Claire Verzeroli, Carole Fournier, Maud Michelet, Anna Rita Redavid, Ievgeniia Chicherova, Marie-Laure Plissonnier, Annie Adrait, Olga Komich, Fleur Chapus, Mathieu Richaud, Maëva Hervieu, Veronika Reiterer, Federica Grazia, Centonze, Julie Lucifora, Birke Bartosch, Michel Rivoire, Hesso Farhan, Johann Couté, Thomas Decaens, Patrick Mehlen, Benjamin Gibert, Romain Parent. Drafting the article or revising it critically for important intellectual content: Romain Barnault, Claire Verzeroli, Carole Fournier, Julie Lucifora, Hesso Farhan, Johann Couté, Benjamin Gibert, Fabien Zoulim, Romain Parent. Final approval of the version to be published: Romain Barnault, Claire Verzeroli, Romain Parent, Fabien Zoulim.

ORCID

Romain Barnault  <https://orcid.org/0000-0003-1671-3251>

Claire Verzeroli  <https://orcid.org/0000-0001-5728-0363>

Carole Fournier  <https://orcid.org/0000-0001-5735-0472>

Maud Michelet  <https://orcid.org/0000-0002-5607-7889>

Anna Rita Redavid  <https://orcid.org/0000-0002-1332-2792>

Ievgeniia Chicherova  <https://orcid.org/0000-0002-0764-9641>

Marie-Laure Plissonnier  <https://orcid.org/0000-0003-4879-4586>

Annie Adrait  <https://orcid.org/0000-0002-1565-2859>

Olga Khomich  <https://orcid.org/0000-0001-5172-199X>

Fleur Chapus  <https://orcid.org/0000-0001-6611-9547>

Mathieu Richaud  <https://orcid.org/0000-0002-7472-9019>

Veronika Reiterer  <https://orcid.org/0000-0002-7734-1255>


Federica Grazia Centonze  <https://orcid.org/0000-0002-2124-443X>


Julie Lucifora  <https://orcid.org/0000-0003-0482-7809>


Birke Bartosch  <https://orcid.org/0000-0001-6354-4660>

Hesso Farhan  <https://orcid.org/0000-0002-0889-8463>

Johann Couté  <https://orcid.org/0000-0003-3896-6196>

Valbona Mirakaj  <https://orcid.org/0000-0002-6907-6455>

Thomas Decaens  <https://orcid.org/0000-0003-0928-0048>

Patrick Mehlen  <https://orcid.org/0000-0003-1743-5417>

Benjamin Gibert  <https://orcid.org/0000-0002-5295-3124>

Fabien Zoulim  <https://orcid.org/0000-0002-2245-0083>

Romain Parent  <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent  <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent  <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent  <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>


Romain Parent  <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent  <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent  <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent  <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent  <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent  <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent  <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent  <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent  <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent  <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent  <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent  <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent  <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent  <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent  <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent  <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent <https://orcid.org/0000-0002-3645-7008>

Romain Parent

7. Lahlali T, Plissonnier ML, Romero-López C, Michelet M, Ducarouge B, Berzal-Herranz A, et al. Netrin-1 protects hepatocytes against cell death through sustained translation during the unfolded protein response. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2016;2(3):281–301.e9.
8. Hadi T, Boytard L, Silvestro M, Alebrahim D, Jacob S, Feinstein J, et al. Macrophage-derived netrin-1 promotes abdominal aortic aneurysm formation by activating MMP3 in vascular smooth muscle cells. *Nat Commun.* 2018;9(1):5022.
9. van Gils JM, Derby MC, Fernandes LR, Ramkhelawon 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(2):136–43.
10. Rosenberger P, Schwab JM, Mirakaj V, Masekowsky E, Mager A, Morote-Garcia JC, et al. Hypoxia-inducible factor-dependent induction of netrin-1 dampens inflammation caused by hypoxia. *Nat Immunol.* 2009;10(2):195–202.
11. Mirakaj V, Thix CA, Laucher S, Mielke C, Morote-Garcia JC, Schmit MA, et al. Netrin-1 dampens pulmonary inflammation during acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;181(8):815–24.
12. Aherne CM, Collins CB, Masterson JC, Tizzano M, Boyle TA, Westrich JA, et al. Neuronal guidance molecule netrin-1 attenuates inflammatory cell trafficking during acute experimental colitis. *Gut.* 2012;61(5):695–705.
13. Paradisi A, Maise C, Bernet A, Coissieux MM, Maccarrone M, Scoazec JY, et al. NF-kappaB regulates netrin-1 expression and affects the conditional tumor suppressive activity of the netrin-1 receptors. *Gastroenterology.* 2008;135(4):1248–57.
14. Paradisi A, Maise C, Coissieux MM, Gadot N, Lépinasse F, Delloye-Bourgeois C, et al. Netrin-1 up-regulation in inflammatory bowel diseases is required for colorectal cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106(40):17146–51.
15. Parent R, Marion MJ, Furio L, Trepo C, Petit MA. Origin and characterization of a human bipotent liver progenitor cell line. *Gastroenterology.* 2004;126(4):1147–56.
16. Saito T, Owen DM, Jiang F, Marcotrigiano J, Gale M Jr. Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. *Nature.* 2008;454(7203):523–27.
17. Sato S, Li K, Kameyama T, Hayashi T, Ishida Y, Murakami S, et al. The RNA sensor RIG-I dually functions as an innate sensor and direct antiviral factor for hepatitis B virus. *Immunity.* 2015;42(1):123–32.
18. Yu P, Lübben W, Slomka H, Gebler J, Konert M, Cai C, et al. Nucleic acid-sensing Toll-like receptors are essential for the control of endogenous retrovirus viremia and ERV-induced tumors. *Immunity.* 2012;37(5):867–79.
19. Kawashima T, Kosaka A, Yan H, Guo Z, Uchiyama R, Fukui R, et al. Double-stranded RNA of intestinal commensal but not pathogenic bacteria triggers production of protective interferon-beta. *Immunity.* 2013;38(6):1187–97.
20. Cavassani KA, Moreira AP, Habel D, Ito T, Coelho AL, Allen RM, et al. Toll like receptor 3 plays a critical role in the progression and severity of acetaminophen-induced hepatotoxicity. *PLoS One.* 2013;8(6):e65899.
21. del Prete MJ, Vernal R, Dolznig H, Mullner EW, Garcia-Sanz JA. Isolation of polysome-bound mRNA from solid tissues amenable for RT-PCR and profiling experiments. *RNA.* 2007;13(3):414–21.
22. Chen Q, Jagannathan S, Reid DW, Zheng T, Nicchitta CV. Hierarchical regulation of mRNA partitioning between the cytoplasm and the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *Mol Biol Cell.* 2011;22(14):2646–58.
23. Stephens SB, Nicchitta CV. In vitro and tissue culture methods for analysis of translation initiation on the endoplasmic reticulum. *Methods Enzymol.* 2007;431:47–60.
24. Wickham L, Duchaine T, Luo M, Nabi IR, DesGroseillers L. Mammalian Staufen is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol.* 1999;19(3):2220–30.
25. Dugre-Brisson S, Elvira G, Boulay K, Chatel-Chaix L, Moulard AJ, DesGroseillers L. Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(15):4797–812.
26. Ricci EP, Kucukural A, Cenik C, Mercier BC, Singh G, Heyer EE, et al. Staufen1 senses overall transcript secondary structure to regulate translation. *Nat Struct Mol Biol.* 2014;21(1):26–35.
27. Furic L, Maher-Laporte M, DesGroseillers L. A genome-wide approach identifies distinct but overlapping subsets of cellular mRNAs associated with Staufen1- and Staufen2-containing ribonucleoprotein complexes. *RNA.* 2008;14(2):324–35.
28. Kohrmann M, Luo M, Kaether C, DesGroseillers L, Dotti CG, Kiebler MA. Microtubule-dependent recruitment of Staufen-green fluorescent protein into large RNA-containing granules and subsequent dendritic transport in living hippocampal neurons. *Mol Biol Cell.* 1999;10(9):2945–53.
29. Fang J, Pietzsch C, Ramanathan P, Santos RI, Ilinykh PA, Garcia-Blanco MA, et al. Staufen1 interacts with multiple components of the Ebola virus ribonucleoprotein and enhances viral RNA synthesis. *MBio.* 2018;9(5):e01771-18.
30. Marion RM, Fortes P, Beloso A, Dotti C, Ortin J. A human sequence homologue of Staufen is an RNA-binding protein that is associated with polysomes and localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol.* 1999;19(3):2212–9.
31. Taketa K, Pogell BM. Allosteric inhibition of rat liver fructose 1,6-diphosphatase by adenosine 5'-monophosphate. *J Biol Chem.* 1965;240(2):651–62.
32. Mediero A, Wilder T, Ramkhelawon B, Moore KJ, Cronstein BN. Netrin-1 and its receptor Unc5b are novel targets for the treatment of inflammatory arthritis. *FASEB J.* 2016;30(11):3835–44.
33. Schlegel M, Kohler D, Korner A, Granja T, Straub A, Giera M, et al. The neuroimmune guidance cue netrin-1 controls resolution programs and promotes liver regeneration. *Hepatology.* 2016;63(5):1689–705.
34. 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(2):173–85.
35. Ambade A, Lowe P, Kodys K, Catalano D, Gyongyosi B, Cho Y, et al. Pharmacological inhibition of CCR2/5 signaling prevents and reverses alcohol-induced liver damage, steatosis, and inflammation in mice. *Hepatology.* 2019;69(3):1105–21.
36. Baeck C, Wei X, Bartneck M, Fech V, Heymann F, Gassler N, et al. Pharmacological inhibition of the chemokine C-C motif chemokine ligand 2 (monocyte chemoattractant protein 1) accelerates liver fibrosis regression by suppressing Ly-6C(+) macrophage infiltration in mice. *Hepatology.* 2014;59(3):1060–72.
37. Baeck C, Wehr A, Karlmark KR, Heymann F, Vucur M, Gassler N, et al. Pharmacological inhibition of the chemokine CCL2 (MCP-1) diminishes liver macrophage infiltration and steatohepatitis in chronic hepatic injury. *Gut.* 2012;61(3):416–26.
38. Odom DT, Zizlsperger N, Gordon DB, Bell GW, Rinaldi NJ, Murray HL, et al. Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science.* 2004;303(5662):1378–81.
39. Berg NK, Li J, Kim B, Mills T, Pei G, Zhao Z, et al. Hypoxia-inducible factor-dependent induction of myeloid-derived netrin-1 attenuates natural killer cell infiltration during endotoxin-induced lung injury. *FASEB J.* 2021;35(4):e21334.
40. Knight JRP, Alexandrou C, Skalka GL, Vlahov N, Pennel K, Officer L, et al. MNK inhibition sensitizes KRAS-mutant colorectal cancer to mTORC1 inhibition by reducing eIF4E phosphorylation and c-MYC expression. *Cancer Discov.* 2021;11(5):1228–47.
41. Boussemart L, Malka-Mahieu H, Girault I, Allard D, Hemmingsson O, Tomasic G, et al. eIF4F is a nexus of

- resistance to anti-BRAF and anti-MEK cancer therapies. *Nature*. 2014;513(7516):105–9.
42. Parent R, Beretta L. Translational control plays a prominent role in the hepatocytic differentiation of HepaRG liver progenitor cells. *Genome Biol*. 2008;9(1):R19.
 43. Parent R, Kolippakkam D, Booth G, Beretta L. Mammalian target of rapamycin activation impairs hepatocytic differentiation and targets genes moderating lipid homeostasis and hepatocellular growth. *Can Res*. 2007;67(9):4337–45.
 44. Guenebeaud C, Goldschneider D, Castets M, Guix C, Chazot G, Delloye-Bourgeois C, et al. The dependence receptor UNC5H2/B triggers apoptosis via PP2A-mediated dephosphorylation of DAP kinase. *Mol Cell*. 2010;40(6):863–76.
 45. Xu TP, Wang YF, Xiong WL, Ma P, Wang WY, Chen WM, et al. E2F1 induces TINCR transcriptional activity and accelerates gastric cancer progression via activation of TINCR/STAU1/CDKN2B signaling axis. *Cell Death Dis*. 2017;8(6):e2837.
 46. Xu F, Li CH, Wong CH, Chen GG, Lai PBS, Shao S, et al. Genome-wide screening and functional analysis identifies tumor suppressor long noncoding RNAs epigenetically silenced in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2019;79(7):1305–17.
 47. Serafini T, Kennedy TE, Galko MJ, Mirzayan C, Jessell TM, Tessier-Lavigne M. The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell*. 1994;78(3):409–24.
 48. Haybaeck J, Zeller N, Wolf MJ, Weber A, Wagner U, Kurrer MO, et al. A lymphotoxin-driven pathway to hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell*. 2009;16(4):295–308.
 49. Gao R, Peng X, Perry C, Sun H, Ntokou A, Ryu C, et al. Macrophage-derived netrin-1 drives adrenergic nerve-associated lung fibrosis. *J Clin Invest*. 2021;131(1):e136542.
 50. Jiang S, Richaud M, Vieugué P, Rama N, Delcros JG, Siouda M, et al. Targeting netrin-3 in small cell lung cancer and neuroblastoma. *EMBO Mol Med*. 2021;13(4):e12878.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of the article at the publisher's website.

How to cite this article: 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;76:1345–1359. doi:[10.1002/hep.32446](https://doi.org/10.1002/hep.32446)