



HAL
open science

Méthylation du promoteur de RASSF1 et tunneling nanotubes : intérêt clinique dans les cancers pleuro-pulmonaires

Bastien Jean-Jacques

► **To cite this version:**

Bastien Jean-Jacques. Méthylation du promoteur de RASSF1 et tunneling nanotubes : intérêt clinique dans les cancers pleuro-pulmonaires. Médecine humaine et pathologie. 2019. dumas-02464202

HAL Id: dumas-02464202

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02464202>

Submitted on 3 Feb 2020

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.

UNIVERSITÉ de CAEN NORMANDIE

FACULTÉ de MÉDECINE

Année 2018/2019

THÈSE POUR L'OBTENTION
DU GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement le : 2 septembre 2019

par

M. Bastien JEAN-JACQUES

Né le 17 janvier 1989 à CAEN (Calvados)

TITRE DE LA THÈSE :

Méthylation du promoteur de *RASSF1* et tunneling nanotubes :
Intérêt clinique dans les cancers pleuro-pulmonaires

Président : Monsieur le Professeur Frédéric BIBEAU

Membres : Monsieur le Professeur Gérard ZALCMAN
Madame le Docteur Céline BAZILLE

Directeur de thèse : Madame le Docteur Guénaëlle LEVALLET

Année Universitaire 2018/2019**Doyen**

Professeur Emmanuel TOUZÉ

Assesseurs

Professeur Paul MILLIEZ (pédagogie)

Professeur Guy LAUNOY (recherche)

Professeur Sonia DOLLFUS & Professeur Evelyne EMERY (3^{ème} cycle)**Directrice administrative**

Madame Sarah CHEMTOB

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

M.	AGOSTINI Denis	Biophysique et médecine nucléaire
M.	AIDE Nicolas	Biophysique et médecine nucléaire
M.	ALLOUCHE Stéphane	Biochimie et biologie moléculaire
M.	ALVES Arnaud	Chirurgie digestive
M.	AOUBA Achille	Médecine interne
M.	BABIN Emmanuel	Oto-Rhino-Laryngologie
M.	BÉNATEAU Hervé	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
M.	BENOIST Guillaume	Gynécologie - Obstétrique
M.	BERGER Ludovic	Chirurgie vasculaire
M.	BERGOT Emmanuel	Pneumologie
M.	BIBEAU Frédéric	Anatomie et cytologie pathologique
Mme	BRAZO Perrine	Psychiatrie d'adultes
M.	BROUARD Jacques	Pédiatrie
M.	BUSTANY Pierre	Pharmacologie
Mme	CHAPON Françoise	Histologie, Embryologie
Mme	CLIN-GODARD Bénédicte	Médecine et santé au travail
M.	COQUEREL Antoine	Pharmacologie
M.	DAO Manh Thông	Hépatologie-Gastro-Entérologie
M.	DAMAJ Ghandi Laurent	Hématologie
M.	DEFER Gilles	Neurologie
M.	DELAMILLIEURE Pascal	Psychiatrie d'adultes
M.	DENISE Pierre	Physiologie
M.	DERLON Jean-Michel	Neurochirurgie
Mme	DOLLFUS Sonia	Psychiatrie d'adultes

M.	DREYFUS Michel	Gynécologie - Obstétrique
M.	DU CHEYRON Damien	Réanimation médicale
Mme	ÉMERY Evelyne	Neurochirurgie
M.	ESMAIL-BEYGUI Farzin	Cardiologie
Mme	FAUVET Raffaèle	Gynécologie – Obstétrique
M.	FISCHER Marc-Olivier	Anesthésiologie Réanimation et
	médecine Péri-opératoire	
M.	GÉRARD Jean-Louis	Anesthésiologie Réanimation et
	médecine Péri-opératoire	
M.	GUILLOIS Bernard	Pédiatrie
Mme	GUITTET-BAUD Lydia	Epidémiologie, économie de la santé
	et prévention	
M.	HABRAND Jean-Louis	Cancérologie option Radiothérapie
M.	HAMON Martial	Cardiologie
Mme	HAMON Michèle	Radiologie et imagerie médicale
M.	HANOUI Jean-Luc	Anesthésiologie Réanimation et
	médecine Péri-opératoire	
M.	HULET Christophe	Chirurgie orthopédique et
	traumatologique	
M.	HURAUULT de LIGNY Bruno <small>Éméritat jusqu'au 31/01/2020</small>	Néphrologie
M.	ICARD Philippe	Chirurgie thoracique et cardio-
	vasculaire	
M.	JOIN-LAMBERT Olivier	Bactériologie - Virologie
Mme	JOLY-LOBBEDEZ Florence	Cancérologie
M.	JOUBERT Michael	Endocrinologie
Mme	KOTTLER Marie-Laure	Biochimie et biologie moléculaire
M.	LAUNOY Guy	Epidémiologie, économie de la santé
	et prévention	
M.	LE COUTOUR Xavier	Epidémiologie, économie de la santé
	et prévention	
M.	LE HELLO Simon	Bactériologie-Virologie
Mme	LE MAUFF Brigitte	Immunologie
M.	LEPORRIER Michel <small>Éméritat jusqu'au 31/08/2020</small>	Hématologie
M.	LEROY François	Rééducation fonctionnelle
M.	LOBBEDEZ Thierry	Néphrologie
M.	MANRIQUE Alain	Biophysique et médecine nucléaire
M.	MARCÉLLI Christian	Rhumatologie
M.	MARTINAUD Olivier	Neurologie
M.	MAUREL Jean	Chirurgie générale

M.	MILLIEZ Paul	Cardiologie
M.	MOREAU Sylvain	Anatomie/Oto-Rhino-Laryngologie
M.	MOUTEL Grégoire	Médecine légale et droit de la santé
M.	NORMAND Hervé	Physiologie
M.	PARIENTI Jean-Jacques	Biostatistiques, info. médicale et tech. de communication
M.	PELAGE Jean-Pierre	Radiologie et imagerie médicale
Mme	PIQUET Marie-Astrid	Nutrition
M.	QUINTYN Jean-Claude	Ophtalmologie
M.	RAVASSE Philippe	Chirurgie infantile
M.	REZNIK Yves	Endocrinologie
M.	ROD Julien	Chirurgie infantile
M.	ROUPIE Eric	Médecine d'urgence
Mme	THARIAT Juliette	Radiothérapie
M.	TILLOU Xavier	Urologie
M.	TOUZÉ Emmanuel	Neurologie
M.	TROUSSARD Xavier	Hématologie
Mme	VABRET Astrid	Bactériologie - Virologie
M.	VERDON Renaud	Maladies infectieuses
Mme	VERNEUIL Laurence	Dermatologie
M.	VIADER Fausto	Neurologie
M.	VIVIEN Denis	Biologie cellulaire

PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS

PROFESSEUR ASSOCIÉ DES UNIVERSITÉS A TEMPS PLEIN

M.	VABRET François	Addictologie
----	-----------------	--------------

PROFESSEURS ASSOCIÉS DES UNIVERSITÉS A MI-TEMPS

M.	de la SAYETTE Vincent	Neurologie
Mme	DOMPMARTIN-BLANCHÈRE Anne	Dermatologie
Mme	LESCURE Pascale	Gériatrie et biologie du vieillissement
M.	SABATIER Rémi	Cardiologie

PRCE

Mme	LELEU Solveig	Anglais
-----	---------------	---------

Année Universitaire 2018 / 2019**Doyen**

Professeur Emmanuel TOUZÉ

Assesseurs

Professeur Paul MILLIEZ (pédagogie)

Professeur Guy LAUNOY (recherche)

Professeur Sonia DOLLFUS & Professeur Evelyne EMERY (3^{ème} cycle)**Directrice administrative**

Madame Sarah CHEMTOB

**MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS
HOSPITALIERS**

M.	ALEXANDRE Joachim	Pharmacologie clinique
Mme	BENHAÏM Annie	Biologie cellulaire
M.	BESNARD Stéphane	Physiologie
Mme	BONHOMME Julie	Parasitologie et mycologie
M.	BOUVIER Nicolas	Néphrologie
M.	COULBAULT Laurent	Biochimie et Biologie moléculaire
M.	CREVEUIL Christian	Biostatistiques, info. médicale et tech. de communication
M.	DE BOYSSON Hubert	Médecine interne
Mme	DEBRUYNE Danièle <small>Éméritat jusqu'au 31/08/2019</small>	Pharmacologie fondamentale
Mme	DERLON-BOREL Annie <small>Éméritat jusqu'au 31/08/2020</small>	Hématologie
Mme	DINA Julia	Bactériologie - Virologie
Mme	DUPONT Claire	Pédiatrie
M.	ÉTARD Olivier	Physiologie
M.	GABEREL Thomas	Neurochirurgie
M.	GRUCHY Nicolas	Génétique
M.	GUÉNOLÉ Fabian	Pédopsychiatrie
M.	HITIER Martin	Anatomie - ORL Chirurgie Cervico- faciale
M.	ISNARD Christophe	Bactériologie Virologie
M.	LEGALLOIS Damien	Cardiologie
Mme	LELONG-BOULOUARD Véronique	Pharmacologie fondamentale
Mme	LEPORRIER Nathalie <small>Éméritat jusqu'au 31/10/2020</small>	Génétique

Mme	LEVALLET Guénaëlle	Cytologie et Histologie
M.	LUBRANO Jean	Chirurgie générale
M.	MITTRE Hervé	Biologie cellulaire
M.	REPESSÉ Yohann	Hématologie
M.	SESBOÜÉ Bruno	Physiologie
M.	TOUTIRAIS Olivier	Immunologie
M.	VEYSSIERE Alexis	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIÉS DES UNIVERSITÉS A MI-TEMPS

Mme	ABBATE-LERAY Pascale	Médecine générale
M.	COUETTE Pierre-André (fin 31/08/19)	Médecine générale
M.	LE BAS François (fin 31/08/19)	Médecine générale
M.	SAINMONT Nicolas (fin 31/08/19)	Médecine générale
Mme	NOEL DE JAEGHER Sophie (fin 31/08/2021)	Médecine générale

Remerciements :

Je tiens à remercier le jury pour le temps accordé à l'examen de mon travail.

Je tiens à remercier le Pr. F. Bibeau pour son soutien et sa confiance.

Je tiens à remercier le Dr. Guénaëlle Levallet pour avoir encadré ce travail et plus encore.

Je tiens à remercier le Dr. Fatemeh Dubois.

Je tiens à remercier les Docteurs C. Danel et Gaëtane Planchard pour la lecture des immunomarquages.

Je tiens à remercier mes financeurs, le Fond de recherche en santé respiratoire et la Ligue contre le cancer.

Je tiens à remercier la structure CMABIO3 et notamment Maelle Guyot pour son aide dans la réalisation des immunomarquages.

Je tiens à remercier le Dr Creveuil pour avoir réalisé l'ensemble des statistiques.

Je tiens à remercier tous les médecins séniors et juniors qui ont participé de près ou de loin à ma formation de pathologiste.

Je tiens à remercier les équipes techniques et administratives des laboratoires d'ACP du CHU de Caen, du CFB de Caen, du CHCP de Cherbourg et d'Alençon.

Liste des abréviations :

CBP : cancer broncho-pulmonaire

CBNPC : carcinomes bronchiques non à petites cellules

CBPC : carcinomes bronchiques à petites cellules

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CT : chimiothérapie standard

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

MAPS : Mesothelioma Avastin plus Pemetrexed-cisplatine Study

MPM : mésothéliome pleural malin

miARNs : micro-acide ribonucléiques

MS-PCR : PCR spécifique de méthylation

PS : performance status

RASSF1A : Ras-association domain family 1 isoform A

siARN : Small interfering acide ribonucléiques

TnTs : tunneling nanotubes

TEM : transition épithélio-mésenchymateuse

VEs : vésicules d'exosome

Liste des tableaux et figures :

PARTIE 1 : INTRODUCTION GÉNÉRALE

Figure 1 - Les six étapes de la carcinogenèse pleuro-bronchique.

Figure 2 - RASSF1A est une protéine clé de l'homéostasie cellulaire.

Figure 3 - Les membres de la voie de signalisation Hippo.

Figure 4 - Illustration des modifications induites par l'absence de RASSF1A.

Figure 5 - La perte d'expression de RASSF1A se traduit par une augmentation de la protéine Rab11, protéine clé du relargage des vésicules d'exosome.

PARTIE 2 : ARTICLE

Figure 1 - Bronchial as mesothelial cells establish both TNT1 and TNT2 and transfer mitochondria to other cells along TNT1.

Figure 2 - RASSF1A expression decreases overall TNT number and length.

Figure 3 - TNTs induced by RASSF1A depletion still occurs in either hypoxic or serum starved conditions.

Figure 4 - Vimentin and actomyosin are implicated in TNT formation after RASSF1A depletion.

Figure 5 - Exosomes released by RASSF1A depleted cells affect TNT formation.

Figure 6 - TNTs formation in the absence of RASSF1A is dependent on GEFH1 inactivation and Rab11 activation.

Figure Supplementary 1

Figure Supplementary 2 - RASSF1A expression modulates overall TNT number.

Figure Supplementary 3 - TNTs formation in the absence of RASSF1A is dependent on GEFH1 inactivation and Rab11 activation.

PARTIE 3 : DISCUSSION GÉNÉRALE

Figure 6 - Identification de marqueurs indirects de TnTs.

Figure 7 - Impact pronostic des TnTs intra-tumoraux.

Tableau 1 - Comparaison des caractéristiques des patients avec ou sans immunomarquage.

CHAPITRE 1 - INTRODUCTION GENERALE.....	1
1. Les tunneling nanotubes (TnTs).....	2
2. Les cancers pleuro-pulmonaires.....	2
2.1. Le cancer broncho-pulmonaire (CBP).....	3
2.2. Le mésothéliome pleural malin (MPM).....	3
3. RASSF1A et la carcinogénèse broncho-pulmonaire	5
4. Objectifs	8
Références	9
CHAPITRE 2 - ARTICLE.....	11
Abstract	14
Background.....	16
Methods and Materials	20
Results	27
Discussion	36
Conclusions.....	42
Abbreviations.....	43
Declarations.....	43
References	45
Figure	51
Supplementary data	58
CHAPITRE 3 - DISCUSSION GÉNÉRALE	61
1. La perte d'expression de RASSF1A : intérêts et place en clinique	62
1.1. Les mécanismes moléculaires de l'inactivation de <i>RASSF1A</i>	62
1.2. L'hyperméthylation du promoteur du gène <i>RASSF1</i> , un biomarqueur des cancers à différents égards	63
1.3. Intérêt clinique de l'identification de la méthylation du promoteur de <i>RASSF1</i>	63
1.4. Faisabilité de la recherche « en routine » du statut de méthylation du promoteur du gène <i>RASSF1</i>	65
1.5. Pourquoi la méthylation du promoteur de <i>RASSF1</i> n'est pas déjà utilisée en routine ?	67
1.6. Quelles cibles thérapeutiques faut-il envisager chez les patients porteurs d'une tumeur avec hyperméthylation du promoteur de <i>RASSF1</i> ?	68
2. Tunneling nanotubes : vers une utilité en clinique ?.....	69
2.1. Implication des TnTs dans la carcinogénèse.....	69
2.2. Identification de marqueurs de TnTs : où en sommes-nous ?	70
2.3. Identification de marqueurs de TnTs : approche <i>in vitro</i>	71
2.4. Évaluation de l'impact pronostic de la présence de TnTs dans le MPM : approche <i>ex-vivo</i>	72
2.5. Comment expliquer la disparité pronostique entre ces deux marqueurs de TnTs : connexine 43 et vimentine ?	72
2.6. TnTs et thérapeutique	74
CHAPITRE 4 – CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	77
1. Conclusion générale	78
2. Perspectives.....	79

Références	81
Annexe	85

CHAPITRE 1 - INTRODUCTION GENERALE

1. Les tunneling nanotubes (TnTs) :

Le développement d'un cancer est un processus multi-étape au cours duquel les cellules tumorales et/ou stromales communiquent entre elles. Ces moyens de communications sont multiples, relativement bien identifiés et comprennent notamment le transfert de composants cellulaires au travers des jonctions communicantes ou encore le transfert de vésicules d'exosomes et de signaux paracrines (1).

Plus récemment, l'équipe de Rustom, a décrit pour la première fois en 2004, un nouveau moyen de communication intercellulaire, appelé tunneling nanotubes (TnTs). Ce sont de longues structures membranaires, de taille nanométrique, reliant deux cellules distantes entre elles, leur permettant, comme n'importe quelle jonction communicante, de s'échanger de petites molécules (protéines membranaires, molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), récepteurs couplés aux protéines G, ions calcium, virus, prions ou encore miARNs). En revanche, à la différence des jonctions communicantes "conventionnelles", les TnTs permettent l'échange entre deux cellules éloignées, d'organites dont les mitochondries ou les vésicules de lysosomes (2), ce qui fait leur originalité.

Les TnTs sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques, mais également pathologiques et notamment l'initiation et la progression tumorale (1).

2. Les cancers pleuro-pulmonaires :

Pour mieux caractériser les TnTs, nous avons choisi d'étudier deux modèles de cancers : le cancer broncho-pulmonaire et le mésothéliome pleural malin.

2.1. Le cancer broncho-pulmonaire (CBP) :

Le cancer broncho-pulmonaire est le cancer le plus fréquent (1,8 million de cas, soit 13 % du total), et le plus meurtrier (1,6 million de décès, 19,4% au total) dans le monde (3). En France, il représente la première cause de décès chez l'homme (29 000 décès en 2011, soit 20% des décès par cancer), et également chez la femme depuis 2015 (4). Le principal facteur de risque est le tabagisme actif ou passif (5).

Les cancers broncho-pulmonaires comprennent les Carcinomes Bronchiques Non à Petites Cellules (CBNPC), les plus fréquents (près de 85% des cancers broncho-pulmonaires) et les Carcinomes Bronchique à Petites Cellules (CBPC). Les CBNPC ont une incidence et une prévalence respectivement d'environ 39 000 et 45 000 cas par an en France. Les options thérapeutiques comprennent la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie seule ou en combinaison, et dépendent de l'extension de la tumeur et de l'opérabilité du patient. Le pronostic de la maladie est sombre avec une survie nette de 16% à 5 ans. Le meilleur taux de survie est observé pour les stades précoces opérables avec une survie relative à 52% contre moins de 5% pour le stade métastatique (5). Cependant, la majorité des patients (environ 75%) présente un stade avancé, au moment du diagnostic, expliquant en partie la mortalité élevée (6).

2.2. Le mésothéliome pleural malin (MPM) :

Le mésothéliome pleural malin (MPM) est une tumeur primitive, très agressive, développée à partir des cellules mésothéliales tapissant la plèvre. La cellule mésothéliale est une cellule épithéliale particulière puisque d'origine mésodermique, elle exprime, à la différence des autres cellules épithéliales, certains marqueurs mésenchymateux tels la vimentine et la N-cadhérine (7).

Le principal facteur de risque du MPM est l'exposition à l'amiante. Malgré l'interdiction de l'utilisation de l'amiante en France depuis 1997, l'incidence du MPM, bien que faible (18 cas/million/an en France) est en constante augmentation, avec un pic d'incidence attendu autour de 2020 et au-delà, du fait d'un temps de latence très long entre exposition et survenue de la maladie, d'une exposition massive entre 1930 et 1990 et également du fait de la description de plus en plus fréquente de patients (notamment des femmes) apparemment non exposées professionnellement à l'amiante, développant un MPM (8,9).

Bien que la plupart des pays aient interdit l'utilisation de l'amiante, les pays en voie de développement ou émergents continuent massivement à l'utiliser, laissant présager une augmentation durable du nombre de cas de MPM à l'échelle mondiale (10).

Bien que certains marqueurs tumoraux solubles comme la mésothéline ou l'ostéopontine soient validés comme biomarqueur diagnostique dans un contexte clinique évocateur, le diagnostic de certitude repose toujours sur l'analyse anatomopathologique de prélèvement biopsique de plèvre, avec confirmation par un panel experts anatomo-pathologistes indépendants (groupe MESOPATH) (11,12).

Trois types histopathologiques sont observés : épithélioïde (50-70%), sarcomatoïde (10-20%) ou mixte/biphasique (20-35%). Ces deux derniers types étant de moins bons pronostics et chimio-résistants (12).

Le pronostic est sombre avec un taux de survie à 5 ans virtuellement nul (environ 7%), et une médiane de survie de 9 à 12 mois (8).

La chirurgie à visée curative, seule ou en combinaison avec une chimiothérapie (néo)adjuvante et/ou une radiothérapie (dans le cadre d'une approche multimodale) est exceptionnelle puisqu'elle est réservée aux stades très précoces et résécables,

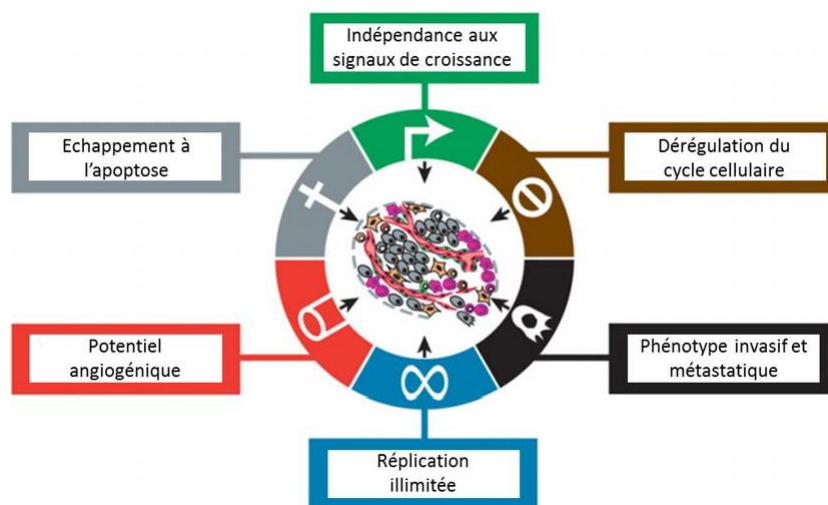


Figure 1 - Les six étapes de la carcinogénèse pleuro-bronchique (adapté de Hanahan et Weinberg, 2000).

alors que la maladie est le plus souvent diagnostiquée à un stade avancé en raison de signes d'appels cliniques et radiologiques peu spécifiques (10).

Le traitement est donc le plus souvent palliatif, permettant d'améliorer la survie de quelques mois et repose sur la chimiothérapie en première ligne à base de pemetrexed et sel de platine, associé au bevacizumab (10,13).

Comparé au CBP, le MPM est donc un cancer très agressif. Nous supposons que cela puisse en partie s'expliquer par le fait que les cellules mésothéliales, porteuses de vimentine (filament intermédiaire semblant impliqué dans la formation des TnTs (14)), puissent plus aisément établir des TnTs entre elles que les cellules épithéliales bronchiques.

Nous avons ainsi retenu ces deux modèles d'étude des TnTs parce qu'ils présentaient des aptitudes différentes à établir ces structures mais aussi parce que ces deux cancers partagent une anomalie moléculaire commune : la perte d'expression du gène suppresseur de tumeur *RASSF1A* (Ras-association domain family 1 isoform A) (15).

3. RASSF1A et la carcinogenèse broncho-pulmonaire :

La carcinogenèse broncho-pulmonaire est un processus multi-étape qui suit le schéma général de la cancérogenèse proposé par Hanahan et Weinberg (2000) à savoir que pour qu'il y ait carcinogenèse, il faut que les cellules épithéliales saines 1/ acquièrent une indépendance vis-à-vis des signaux de croissance, 2/ présentent une dérégulation du cycle cellulaire, 3/ échappent à la réponse à l'apoptose, 4/ acquièrent un potentiel réplicatif illimité, 5/ un potentiel angiogénique et 6/ un phénotype invasif et métastatique (Figure 1).

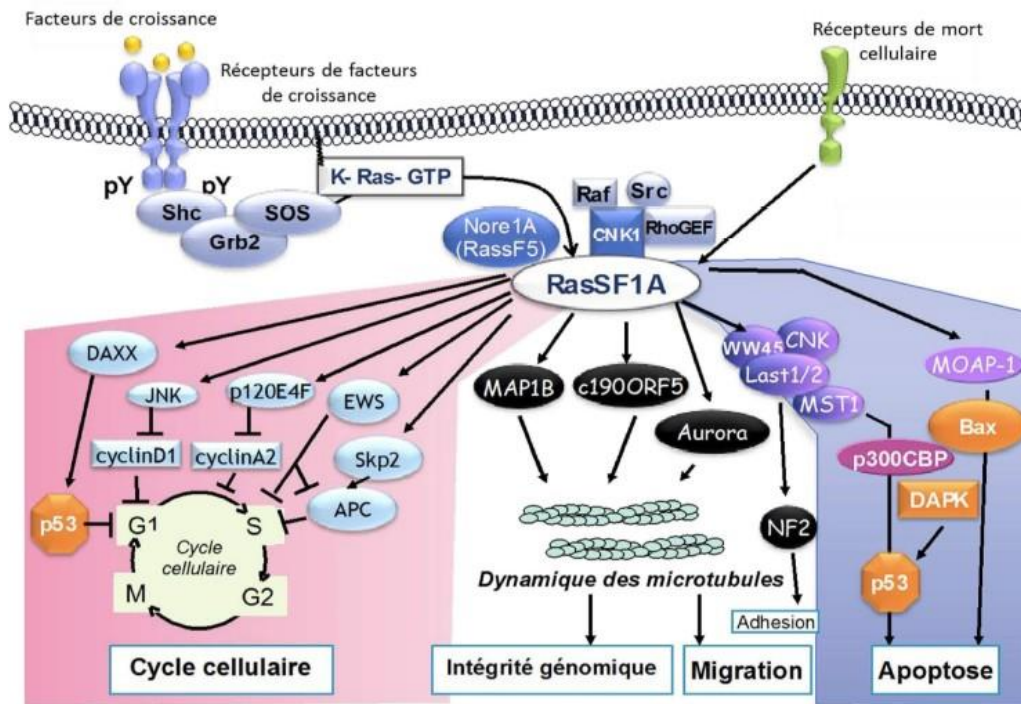


Figure 2 - RASSF1A est une protéine clé de l'homéostasie cellulaire. Grâce à ses nombreux domaines de liaisons, RASSF1A interagit avec près de 50 partenaires pour réguler différents processus tels, le cycle cellulaire, l'apoptose ou la motilité cellulaire (Inspiré de Donninger *et al.*, 2007).

L'acquisition de ces propriétés passe par l'accumulation d'altérations génétiques et épigénétiques d'oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeur. C'est l'accumulation de ces anomalies qui est responsable de la progression d'une ou d'un petit nombre de cellules vers un phénotype invasif et métastatique, une prolifération excessive et l'échappement à la mort cellulaire programmée (17).

L'altération de l'expression du gène suppresseur de tumeur RASSF1A est une altération fréquente, retrouvée dans 20 à 40% des CBNPC ou des MPM (18,19), provoquée par l'hyperméthylation du promoteur du gène et la délétion de l'allèle restant en 3p21 (20).

La protéine RASSF1A, via ses nombreux domaines d'association (domaine RA, domaine SARAH, domaine ATM, domaine C1), est capable d'interagir avec plus de 50 partenaires. Elle est impliquée dans de nombreux processus cellulaires, dont la stabilisation des microtubules, la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose et la motilité cellulaire (Figure 2), supportant son rôle suppresseur de tumeur, et faisant d'elle l'un des gardiens du phénotype épithélial (21).

En 2012, nous avons caractérisé la perte d'expression du gène suppresseur de tumeur RASSF1A chez 208 patients atteints de CBNPC de stade I/II au cours de l'essai IFCT0002 comparant deux schémas thérapeutiques néoadjuvants (paclitaxel vs. gemcitabine). L'analyse des prélèvements tumoraux a mis en évidence d'une part le rôle pronostic (médiane de survie sans progression à 5 ans divisée par 3) et d'autre part le rôle prédictif (survie sans progression plus longue chez les patients traités par paclitaxel plutôt que par gemcitabine) de l'inactivation du gène suppresseur de tumeur RASSF1A (18).

En 2016, nous avons démontré *in vitro* et *in vivo* que le moins bon pronostic des patients atteints de CBNPC s'expliquait par le fait que l'inactivation de RASSF1A

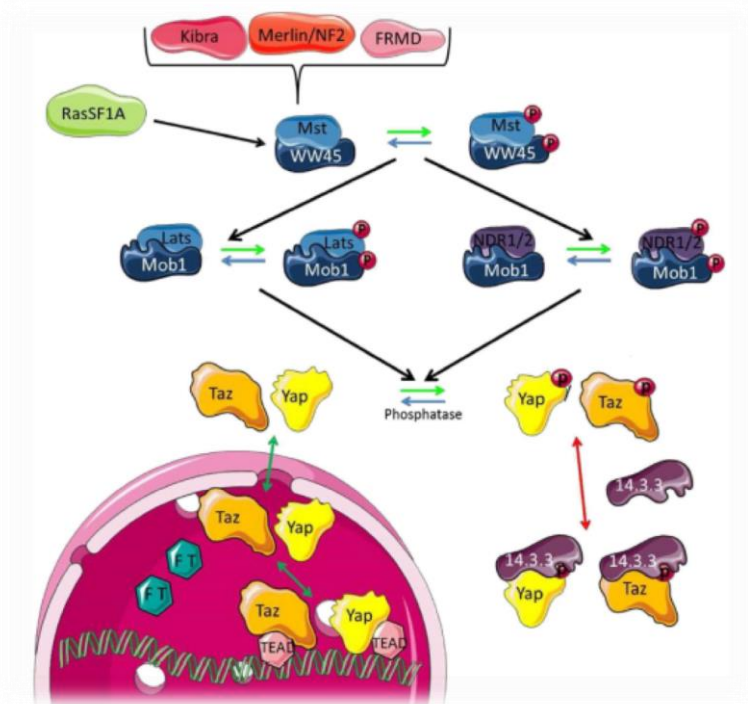


Figure 3 - Les membres de la voie de signalisation Hippo. Yap, effecteur terminal de la voie de signalisation Hippo, est séquestré dans le cytoplasme lorsque cette voie est active. Dans le cas où RASSF1A n'est pas exprimée, la voie de signalisation Hippo est inactivée et Yap est alors transloqué dans le noyau pour agir sur des gènes régulant la prolifération cellulaire et l'apoptose (Hergovich *et al.*, 2016).

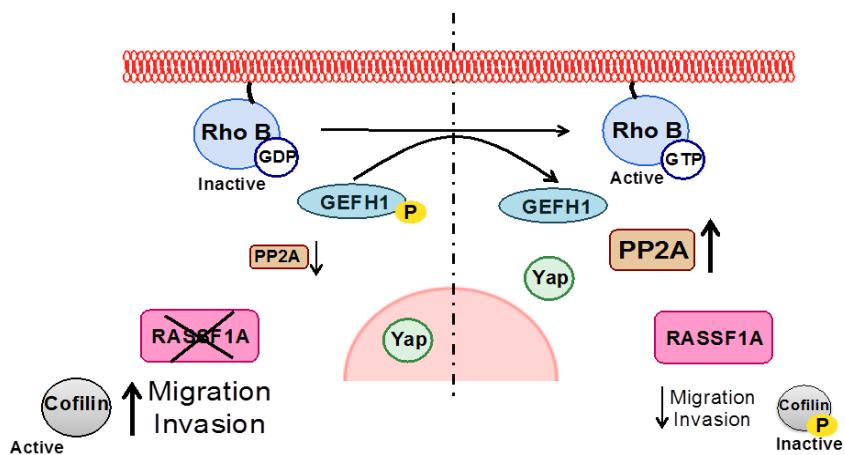


Figure 4 - Illustration des modifications induites par l'absence de RASSF1A. En absence de RASSF1A (côté gauche du cartouche), il est constaté i) une absence d'activation de RhoB (protéine Rho à l'action anti-métastasant) par sa GEF, GEFH1, elle-même inactive en l'absence de RASSF1A ii) une activité anormale de l'effecteur de la voie de signalisation Hippo, Yap, qui en absence de RASSF1A, se trouve transporté dans le noyau sous sa forme active. Ce contexte justifie qu'en absence de RASSF1A, les cellules de lignées épithéliales bronchiques humaines migrent et envahissent davantage que les cellules exprimant RASSF1A (Dubois *et al.*, 2016).

sur des modèles cellulaires de CBNPC provoque l'acquisition d'un phénotype métastatique, induit une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), augmente la vitesse de migration en 2D/3D, la migration trans-endothéliale et l'invasion de cellules de lignées épithéliales bronchiques humaines et facilite la prise de xénogreffe chez la souris immunodéficiente (22).

Ces modifications phénotypiques observées en l'absence de RASSF1A sont liées à des altérations des voies de signalisation Hippo et des RhoGTPases.

La perte d'expression de RASSF1A provoquant i) la translocation nucléaire d'un effecteur terminal de la voie de signalisation Hippo, YAP, sous forme active, responsable de la transcription de gènes favorisant la prolifération cellulaire, l'inhibition de l'apoptose et la transition épithélio-mésenchymateuse (Figure 3) et ii) la dérégulation de la voie des RhoGTPase, avec la libération d'une petite protéine G, RhoA aux propriétés migratoires et l'absence d'activation de RhoB aux propriétés anti-migratoires, par sa GEF (GEFH1), présente sous forme inactive/phosphorylée (Figure 4) (22).

Ces deux voies de signalisation sont interdépendantes ; l'hyperexpression de Rho-B empêche l'accumulation nucléaire de YAP (22).

L'inactivation de GEFH1 pourrait également avoir une autre conséquence : l'augmentation du relargage des vésicules d'exosome, relargage requis dans la formation des TnTs (23). En effet, il est connu dans la littérature que l'inactivation de GEFH1 s'accompagne d'une accumulation de Rab11 (24), une protéine clé du relargage des vésicules d'exosome, laissant penser que la formation des TnTs soit alors stimulée dans ce contexte. Des résultats préliminaires de notre groupe étayent cette hypothèse puisque nous observons bien que l'inactivation de RASSF1A (et donc

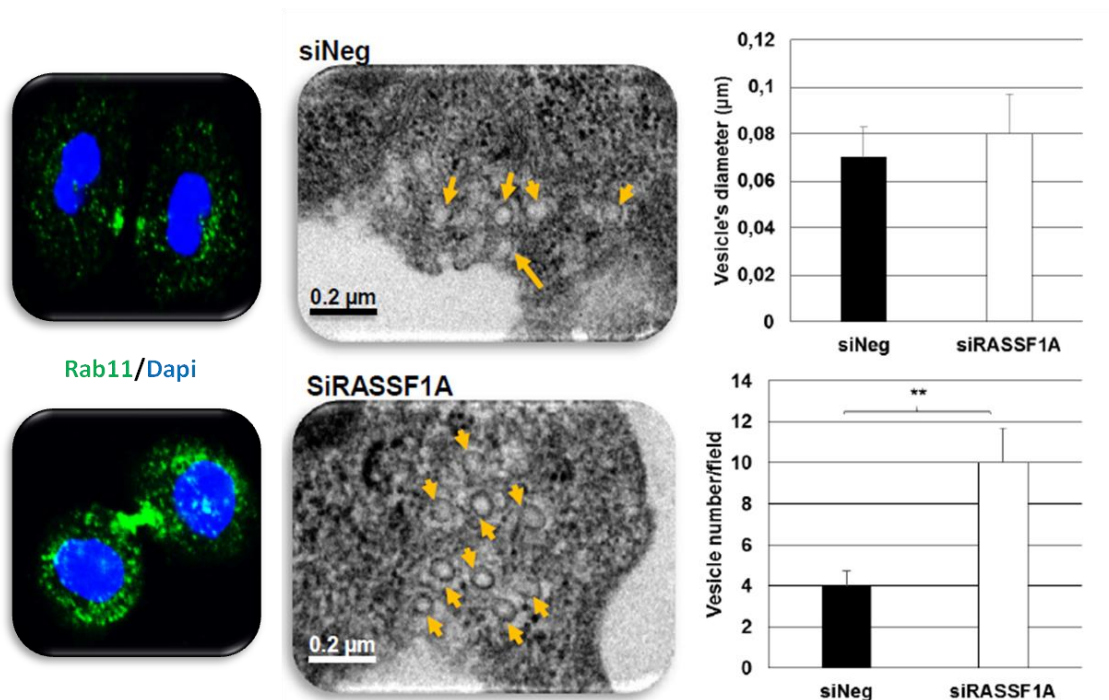


Figure 5 – La perte d'expression de RASSF1A se traduit par une augmentation de la protéine Rab11, protéine clé du relargage des vésicules d'exosome : L'inactivation de RASSF1A est ainsi associée à une augmentation du nombre de vésicule d'exosome, et une augmentation d'expression de Rab11 (Données non publiées, Thèse de Fatéméh Dubois).

l'inactivation de GEFH1) est associée à une augmentation du nombre de vésicule d'exosome, et une augmentation d'expression de Rab11 (Figure 5).

L'ensemble des éléments exposés constitue l'hypothèse de travail selon laquelle l'inactivation de RASSF1A pourrait affecter la communication intercellulaire via les TnTs.

4. Objectifs :

Les objectifs de ce travail étaient i) la caractérisation des TnTs (dans un large panel de lignées cellulaires), ii) l'identification du matériel échangé par des cellules partageant des TnTs, iii) l'étude de l'influence de RASSF1A sur la formation des TnTs, iv) l'étude de l'influence du microenvironnement sur la formation des TnTs et v) l'identification de protéines perturbés par la perte de RASSF1A, et pouvant jouer un rôle dans la formation des TnTs.

Une partie des résultats sont présentés ci-après sous forme d'article. La discussion générale, en s'appuyant sur des données de la littérature et des données non publiées issues de ce travail, aura pour but de mettre en lumière l'intérêt clinique de ce travail de thèse et les perspectives qui en découlent.

Références :

1. Sisakhtnezhad S, Khosravi L. Emerging physiological and pathological implications of tunneling nanotubes formation between cells. *Eur J Cell Biol*. 2015 Oct;94(10):429–43.
2. McCoy-Simandle K, Hanna SJ, Cox D. Exosomes and nanotubes: Control of immune cell communication. *Int J Biochem Cell Biol*. 2016 Feb;71:44–54.
3. Torre LA, Siegel RL, Jemal A. Lung Cancer Statistics. *Adv Exp Med Biol*. 2016;893:1–19.
4. Malvezzi M, Bertuccio P, Rosso T, Rota M, Levi F, La Vecchia C, et al. European cancer mortality predictions for the year 2015: does lung cancer have the highest death rate in EU women? *Ann Oncol*. 2015 Apr 1;26(4):779–86.
5. Sharma D, Newman TG, Aronow WS. Lung cancer screening: history, current perspectives, and future directions. *Arch Med Sci AMS*. 2015 Oct 12;11(5):1033–43.
6. Blandin Knight S, Crosbie PA, Balata H, Chudziak J, Hussell T, Dive C. Progress and prospects of early detection in lung cancer. *Open Biol [Internet]*. 2017 Sep 6 [cited 2019 Feb 18];7(9). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5627048/>
7. Davidson B, Nielsen S, Christensen J, Asschenfeldt P, Berner A, Risberg B, et al. The role of desmin and N-cadherin in effusion cytology: a comparative study using established markers of mesothelial and epithelial cells. *Am J Surg Pathol*. 2001 Nov;25(11):1405–12.
8. Le Stang N, Belot A, Gilg Soit Ilg A, Rolland P, Astoul P, Bara S, et al. Evolution of pleural cancers and malignant pleural mesothelioma incidence in France between 1980 and 2005. *Int J Cancer*. 2010 Jan 1;126(1):232–8.
9. Peto J, Decarli A, La Vecchia C, Levi F, Negri E. The European mesothelioma epidemic. *Br J Cancer*. 1999 Feb;79(3–4):666–72.
10. Scherpereel A. Malignant pleural mesothelioma: new treatments, new hopes? *Eur Respir J*. 2017 Mar 1;49(3):1700319.
11. Ak G, Tada Y, Shimada H, Metintas S, Ito M, Hiroshima K, et al. Midkine is a potential novel marker for malignant mesothelioma with different prognostic and diagnostic values from mesothelin. *BMC Cancer [Internet]*. 2017 Mar 23 [cited 2019 May 26];17. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5362983/>
12. Galateau-Salle F, Churg A, Roggli V, Travis WD, World Health Organization Committee for Tumors of the Pleura. The 2015 World Health Organization Classification of Tumors of the Pleura: Advances since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. 2016 Feb;11(2):142–54.
13. Zalcman G, Mazieres J, Margery J, Greillier L, Audigier-Valette C, Moro-Sibilot D, et al. Bevacizumab for newly diagnosed pleural mesothelioma in the Mesothelioma Avastin Cisplatin Pemetrexed Study (MAPS): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Lond Engl*. 2016 Apr 2;387(10026):1405–14.
14. Ady JW, Desir S, Thayanithy V, Vogel RI, Moreira AL, Downey RJ, et al. Intercellular communication in malignant pleural mesothelioma: properties of tunneling nanotubes. *Front Physiol*. 2014;5:400.
15. Destro A, Ceresoli GL, Baryshnikova E, Garassino I, Zucali PA, De Vincenzo F, et al. Gene methylation in pleural mesothelioma: correlations with clinico-pathological features and patient's follow-up. *Lung Cancer Amst Neth*. 2008

- Mar;59(3):369–76.
16. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57–70.
 17. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646–74.
 18. de Fraipont F, Levallet G, Creveuil C, Bergot E, Beau-Faller M, Mounawar M, et al. An apoptosis methylation prognostic signature for early lung cancer in the IFCT-0002 trial. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2012 May 15;18(10):2976–86.
 19. Suzawa K, Yamamoto H, Murakami T, Katayama H, Furukawa M, Shien K, et al. Establishment and molecular characterization of cell lines from Japanese patients with malignant pleural mesothelioma. *Oncol Lett*. 2016 Jan;11(1):705–12.
 20. Agathangelou A, Honorio S, Macartney DP, Martinez A, Dallol A, Rader J, et al. Methylation associated inactivation of RASSF1A from region 3p21.3 in lung, breast and ovarian tumours. *Oncogene*. 2001 Mar 22;20(12):1509–18.
 21. van der Weyden L, Adams DJ. The Ras-association domain family (RASSF) members and their role in human tumourigenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Sep;1776(1):58–85.
 22. Dubois F, Keller M, Calvayrac O, Soncin F, Hoa L, Hergovich A, et al. RASSF1A Suppresses the Invasion and Metastatic Potential of Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells by Inhibiting YAP Activation through the GEF-H1/RhoB Pathway. *Cancer Res*. 2016 Mar 15;76(6):1627–40.
 23. Thayanithy V, Babatunde V, Dickson EL, Wong P, Oh S, Ke X, et al. Tumor exosomes induce tunneling nanotubes in lipid raft-enriched regions of human mesothelioma cells. *Exp Cell Res*. 2014 Apr 15;323(1):178–88.
 24. Itoh K, Ossipova O, Sokol SY. GEF-H1 functions in apical constriction and cell intercalations and is essential for vertebrate neural tube closure. *J Cell Sci*. 2014 Jun 1;127(Pt 11):2542–53.

CHAPITRE 2 - ARTICLE

A role for RASSF1A in tunneling nanotube formation between cells through GEFH1/Rab11 pathway control

Fatéméh Dubois^{1,2}, Bastien Jean-Jacques^{1,2}, Hélène Roberge¹, Magalie Bénard³, Ludovic Galas³, Damien Schapman³, Nicolas Elie⁴, Didier Goux⁴, Maureen Keller^{1,5}, Elodie Maille^{1,6}, Emmanuel Bergot^{1,7}, Gérard Zalzman^{8,9}, Guénaëlle Levallet^{1,2,*}

1- Normandie Univ, UNICAEN, CEA, CNRS, ISTCT/CERVOxy group, F-14000 Caen, France, GIP CYCERON

2- Service d'Anatomie et Cytologie Pathologique, CHU de Caen, F-14033 Caen. France

3- Normandie Université, Rouen, SFR IRIB, Plateau PRIMACEN, F-76821 Mont-Saint-Aignan. France.

4- Normandie Université, UNICAEN, SFR ICORE, Plateau CMABio3, F-14032 Caen. France

5- Normandie Université, UNICAEN, UPRES-EA-2608, F-14032 Caen, France.

6- Normandie Université, UNICAEN, UMR 1086 INSERM, F-14032 Caen, France.

7- Service de Pneumologie, CHU de Caen, F-14033 Caen. France

8 - U830 INSERM, "Génétique et Biologie des cancers" Centre de Recherche, Institut Curie, Paris, France

9 - Service d'oncologie thoracique, Hôpital Bichat-Claude Bernard, AP-HP, Université Paris-Diderot

*** Correspondence:**

Dr. Guénaëlle Levallet

Service D'Anatomie et Cytologie Pathologique

Normandie Univ, UNICAEN, CEA, CNRS, ISTCT/CERVOxy group

CHU de Caen – Avenue de la côte de Nacre- 14032 Caen

Phone: + 33 2 31 06 31 34

Fax: +33 2 31 06 50 63

Co-author: Fatéméh Dubois, PhD,

Co-author: Bastien Jean-Jacques, M.SC,

Co-author: Hélène Roberge, M.SC,

Co-author: Magalie Bénard, PhD,

Co-author: Ludovic Galas, PhD,

Co-author: Damien Schapman, PhD,

Co-author: Nicolas Elie, PhD,

Co-author: Didier Goux, PhD,

Co-author: Maureen Keller, PhD,

Co-author: Elodie Maille, PhD,

Co-author: Emmanuel Bergot, MD, PhD,

Co-author: Gérard Zalcman, MD, PhD,

Running title: RASSF1A prevents tunneling nanotubes formation

Abstract:

Background: By allowing intercellular communication between cells, tunneling nanotubes (TNTs) could play critical role in cancer progression. If TNT formation is known to require cytoskeleton remodeling, key mechanism controlling their formation remains poorly understood.

Methods: The cells of human bronchial (HBEC-3, A549) or mesothelial (H2452, H28) lines are transfected with different siRNAs (inactive, anti-RASSF1A, anti-GEFH1 and / or anti-Rab11). At 48 h post-transfection, i) the number and length of the nanotubes per cell are quantified, ii) the organelles, previously labeled with specific tracers, exchanged *via* these structures are monitored in real time between cells cultured in 2D or 3D and in normoxia, hypoxia or in serum deprivation condition.

Results: We report that RASSF1A, a key-regulator of cytoskeleton encoded by a tumor-suppressor gene on 3p chromosome, is involved in TNTs formation in bronchial and pleural cells since controlling proper activity of RhoB guanine nucleotide exchange factor, GEF-H1. Indeed, the GEF-H1 inactivation induced by RASSF1A silencing, leads to Rab11 accumulation and subsequent exosome releasing, which in turn contribute to TNTs formation. Finally, we provide evidence involving TNT formation in bronchial carcinogenesis, by reporting that hypoxia or nutriment privation, two almost universal conditions in human cancers, fails to prevent TNTs induced by the oncogenic RASSF1A loss of expression.

Conclusions: This finding suggests for the first time that loss of RASSF1A expression could be a potential biomarker for TNTs formation, such TNTs facilitating intercellular communication favoring multistep progression of bronchial epithelial cells toward overt malignancy.

Keywords: Pleural and Lung cancer, tunneling nanotubes, intercellular communication, RASSF1A, GEF-H1, Rab11.

Background:

The tumor suppressor gene *RASSF1* (Ras-association domain family isoform) encodes one of the epithelial phenotype guardians ([Dubois *et al.*, 2016](#)), RASSF1A, a scaffold protein that maintains cellular homeostasis through control of apoptosis, cell cycle, microtubules stabilization ([Rong *et al.*, 2004](#); [Amin & Banerjee, 2012](#); [Donninger *et al.*, 2014](#)) and actin cytoskeleton organization ([Dallol *et al.*, 2005](#); [Dubois *et al.*, 2016](#)). RASSF1A silencing is a frequent and early event in numerous cancer including lung carcinoma ([Agathangelou *et al.*, 2001](#); [De Fraipont *et al.*, 2012](#)) and malignant mesothelioma ([Toyooka *et al.*, 2002](#), [Destro *et al.*, 2008](#)). In Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC), RASSF1A inactivation is also an independent marker of poor prognosis ([De Fraipont *et al.*, 2012](#)). RASSF1A depletion underlies tumor initiation and progression ([Dammann *et al.*, 2017](#)) since inducing epithelial to mesenchymal transition (EMT) in human bronchial cell lines with a pro-metastatic phenotype sustained by both *i*) guanine nucleotide exchange factor 1 (GEF-H1) inactivation and subsequent RhoB (a putative anti-metastatic small GTPase) inactivation and *ii*) nuclear accumulation of the active form of the Hippo pathway transcriptional cofactor YAP (Yes-associated protein) ([Dubois *et al.*, 2016](#)).

Among long and narrow cytoplasmic extensions induced by RASSF1A depletion, some did not seem to contact the substratum ([Dubois *et al.*, 2016](#)), which distinguish these structures from mesenchymal morphology or other cell extensions such as filopodia ([Chang *et al.*, 2016](#)). As previously described in others cell types (see review by [Gerdes *et al.*, 2007](#)), these structures reflect a defining characteristic of tunneling nanotubes (TNTs) ([Rustom *et al.*, 2004](#)). It is of note that even TNTs and filopodia share structural similarities, they are different cellular organization that form through different mechanisms ([Delage *et al.*, 2016](#)). Further, TNTs are divided in two subtypes:

Type1 TNT containing actin and tubulin filaments with a clear cytosolic tunnel that can reach the distances of up to at least 70 μm (Gerdes *et al.*, 2013), while Type2 TNT is shorter and contains only actin filaments with unclear cytosolic tunnel. The data in the literature suggest that these two types of TNT could have different functions, as large material (e.g., lysosomes, mitochondria) can only travel between cells via TNT type 1 on microtubules (Onfelt *et al.*, 2006; Bénard *et al.*, 2015; Wang & Gerdes, 2015; Vignais *et al.*, 2017).

TNT formation has been described as a result of either directed filopodia-like protrusions or from cell dislodgement mechanism (Gerdes *et al.*, 2013), although, the molecular basis of their formation still remains under active investigation. To date, actin and its associated proteins such as myosin, small GTPase RalA, filamin, M-Sec and Cdc42 are considered important regulators of TNT formation in various cells, at least in part, through recruitment of exocyst complex to the plasma membrane (Hase *et al.*, 2009; Bukoreshtliev *et al.*, 2009; Schiller *et al.*, 2012; Gousset *et al.*, 2013). In addition, p53 and the PI3K/AKT/mTOR signaling pathways have been demonstrated to be involved in stress-induced TNT formation (Wang *et al.*, 2011). Interestingly, EMT was shown to stimulate TNT formation (Lou *et al.*, 2012b). Finally, the alteration of cell-cell junctions, which occurs after RASSF1A depletion (Vlahov *et al.*, 2015; Dubois *et al.*, 2016) or the disruption of gap junction upon EMT (Huber *et al.*, 2005), is thought to support the intercellular communication *via* TNTs (Ady *et al.*, 2014).

In contrast to gap junctions or micro-vesicles that are most effective in cell communication between relatively close cells, TNTs have been proposed to connect cells located far from each other (Lou *et al.*, 2012a). TNTs are thus an emerging mode of intercellular communication between cells at both close and distant proximity, already known to facilitate direct transfer of cytosolic molecules and organelles, as well

as viral and microbial pathogens from cell to cell (Rustom *et al.*, 2004; Sisakhtnezhad & Khosravi, 2015; Reichert *et al.*, 2016). In this respect, TNTs are potential candidates in facilitating the intracellular communication within the heterogeneous tumor microenvironment and have been proposed to be involved in carcinogenesis initiation or later on, in tumor progression (Kenny *et al.*, 2007; Bissell & Hines, 2011; Rückert *et al.*, 2012). Concordantly, TNTs were identified in different solid resected tumors from patients (Vignais *et al.*, 2017) especially in lung adenocarcinoma and mesothelioma patients (Lou *et al.*, 2012a; Ady *et al.*, 2014). The authors postulate that a higher rate of formation of TNTs is associated with a higher level of local invasion of tumors (Ady *et al.*, 2014). Moreover, the transfer of mitochondria via TNT have been shown to enhance chemo-resistance between cancer cell populations (Pasquier *et al.*, 2013). It was also reported that TNT facilitate the exchange of nucleic acid such as mRNA molecules, which could induce or repress the transcription of genes implicated in cancer cell motility or even enhance the transformation of normal neighbor cells (Haimovich *et al.*, 2017).

In this regard and given the role of RASSF1A in microtubules stabilization, actin organization and maintenance of epithelial phenotype, we sought to determine how depletion of RASSF1A could affect TNTs formation. We used a various panel of lung epithelial and mesothelial cell lines to study the relation between RASSF1A gene methylation and TNT formation at the initial events leading to bronchial carcinogenesis, as well as in malignant pleural mesothelioma. We employed RASSF1A specific RNAi or a wild-type RASSF1A encoding expression plasmid to assess the consequence of RASSF1A depletion or rescuing on TNTs formation. The role of cellular stressor such as hypoxia or serum starvation has also been explored to recapitulate *in vivo* cancer microenvironment conditions. Furthermore, we looked for additional key proteins,

which are perturbed by loss of RASSF1A and could play a role in TNT formation. These experiments reveal the role of RASSF1A/GEFH1 signaling as a novel signaling module candidate required for TNTs formation, through control of Rab11 accumulation and subsequent exosome release.

Methods and Materials

Cell culture and treatments

Isogenic HBEC-3 and HBEC-3-KRasV12 bronchial epithelial cell lines were a generous gift of Dr. White (UT Southwestern Medical Center, Dallas, USA) and were cultured in KFSM (Keratinocyte-serum-free medium) complemented with 0.2 ng/ml of human recombinant EGF (Epidermal Growth Factor) and 25 µg/ml of BPE (Bovine Pituitary Extract) supplements (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). The other cell lines were purchased from ATCC. The tumorigenic epithelial cell lines BEAS-2B, BEAS-2B-RasV12, H1975, A549, H1650, H23, and H441 were cultured in DMEM (Dulbecco's modified essential medium; Gibco), while the mesothelial H2452, H2052, H28 and MSTO-211H cell lines were cultured in RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented both with 2 mM of L-glutamine. All the mediums were also complemented with 10% (vol/vol) heat-inactivated fetal bovine serum, 100U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (Gibco). The cultures were incubated at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Where indicated, cells were treated for 24h before fixation with either paclitaxel (10 nM) to induce microtubule stabilization, nocodazole (10µM) to induce microtubule depolymerization or blebbistatin (5 µM) to inhibit myosin-II ATPase. To study the influence of metabolic stress, cells were starved in a low-serum medium (0.5% of FBS) for 24h. Cells were placed in a hypoxic chamber containing 0.1% oxygen, 5% carbon dioxide, and 93% nitrogen for 24h to determine the influence of environmental stress.

RNAi, Plasmids and transfection procedures

RNAi treatment was performed at 30% confluence, using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions and analyzed 72h after treatment. The following RNAi oligonucleotides from Eurogentec® were

used: RASSF1A: si1: 5'-GACCUCUGUGGCGACUUCATT-3' (Shivakumar *et al.*, 2002) & si2: GAACGUGGACGAGCCUGU (Dubois *et al.*, 2016); GEFH1: 5'-GAAGGUAGCAGCCGUCUGU-3' (Dubois *et al.*, 2016); Rab11a: 5'-UGUCAGACAGACGCGAAAA-3' (Mackenzie *et al.*, 2016); Rab11b: 5'-GCACCUGACCUAUGAGAAC-3' (Mackenzie *et al.*, 2016); Vimentin: 5'-UCACGAUGACCUUGAAUAA-3' (Petrie *et al.*, 2017) and non-targeting control RNAi from Dharmacon. Transient transfection with plasmids encoding wild-type RASSF1A (pcDNA3-RASSF1A) and control mimic (Addgene®) were performed using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, Carlsbad, CA) following the manufacturer's instructions and analyzed 24h after transfection.

RT-PCR

The mRNA expression was assayed using RT2 Profiler™ Cell motility PCR Array (Qiagen). Briefly, RNA isolated from HBEC-3 cells transfected with siRASSF1A or siNeg was reverse transcribed and relative gene expression data was obtained using the Human Cell motility PCR Arrays. The expression profile of 84 genes relevant to cell motility as well as 5 housekeeping genes was assayed. Fold change calculations were done using SABiosciences' data analysis software which automatically calculates the fold change in gene expression between the treated and control groups.

Western blot analysis

Protein extraction were performed using a lysis buffer consisting 20 mM Tris (pH 7.0), 50 mM NaCl, 20% glycerol, 5 mM EDTA, and 0.1% TritonX100, 1mM DTT, 50mM 2-Mercaptoethanol and 1 µg/ml protease inhibitor (aprotinin, leupeptin, pepstatin A, antipain). Proteins were quantified using Bradford protein assay reagent and stored at -20°C. After denaturation (5 min at 95°C), cell lysates were electrophoresed through SDS polyacrylamide gels, and transferred to nitrocellulose membranes (Hybond-ECL Amersham®). Non-specific sites were blocked for 1h with Tris-buffered saline

containing 0.1% Tween-20 (TBST) and 5% (w/v) non-fat milk. Membranes were probed overnight with the primary antibody diluted at 1:1000 at 4°C, and then 1 hour at room temperature with the appropriate horseradish peroxidase-linked secondary antibody diluted at 1:2000 in TBST/5% milk. Proteins detected using an enhanced chemiluminescence technique with ECL kit (Promega®).

Cell labelling and Microscopy

Labelling of TNT with Alexa 488-WGA

As previously described ([Bénard *et al.*, 2015](#)), living cells were labelled with at 5 µg/ml Alexa 488-conjugated WGA (Invitrogen) for 10 min at 37°C in the CO₂ incubator. For structural studies, cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 5 min and observed in ProLong Gold antifade reagent mounting medium (Invitrogen).

Labelling of protein

The primary antibodies used in this study are as follows: anti-RASSF1A (eB114-10H1) from eBioscience, anti- α -tubulin from Sigma Aldrich (St. Louis, MO) and anti- β -actin (8H10D10), anti-cofilin (D3F9), anti-GEF-H1, anti-HIF-1 α , and anti-Rab11 from Cell Signaling Technology (Danvers, MA). Briefly, cells were seeded on coverslips at a density of 2×10^4 per well. After treatment, coverslips were washed with phosphate-buffered saline PBS and fixed with 4% paraformaldehyde for 20 minutes at 37°C. Cells were permeabilized using ice-cold methanol for 10 minutes at -20°C to preserve microtubules. After extensive washes with PBS, cells were blocked overnight with 5% bovine serum albumin and then stained with primary antibodies and counterstained with appropriate Alexa Fluor 488-, and 555-conjugated secondary antibodies (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). Coverslips were mounted with DAPI (Santa Cruz Biotechnology), and image captured with high-throughput confocal microscopy (FluoView FV1000, Olympus).

Organelle Tracker analysis

To determine whether the TNTs allow the transport of mitochondria, transfected cells were divided in two groups. Each group were labeled separately by either Green or Red MitoTracker dyes (Molecular Probes) for 30 minutes and then washed extensively with PBS before mixing the two populations in the same culture dish. After 1h of incubation, the cells were either fixed or subjected to the time-lapse imaging. We quantified the number of cells that contain both Mitotracker (yellow color).

To investigate the transfer of either lysosome or endoplasmic reticulum between the cells, Lyso Tracker™ or ER tracker™ (cell signaling) were added directly into normal growth media for a working concentration of 50 nM or 2µM respectively according to the manufactures structures and then analyzed immediately by real-time acquisition.

Confocal Imaging

For living cells, the real-time acquisitions were performed using an inverted microscope (Leica DMI8). The microscopes were enclosed in environmental chambers (Incubator i8) that were maintained at 37°C with 5% CO₂ level. The Metamorph 7.8.13.0 software used for image acquisition took a snapshot of 4 different observation fields every minute for 1 to 3 hours. The acquired images were then analyzed with the ImageJ software (version 1.50d).

For fixed cells, images were captured with high-throughput confocal microscopy (FluoView FV1000, Olympus™).

gCW STED imaging

Image acquisitions were performed with a 100× oil immersion objective (NA 1.4) through gCW STED imaging (TCS SP5-X; Leica Microsystems) with optimised parameters for Alexa-488 detection. Samples (zoom 8, pixel size = 18.95 nm) were excited with a 488 nm wavelength of a supercontinuum laser. For fixed cells, 20–30%

AOTF, conventional scanner (400 Hz, Line Average 1, Accumulation 3, 1024 × 1024) and a step size (0.13 μm) in the xyz mode were used. For living cells, 40–80% AOTF, a resonant scanner (8000 Hz, 1024 × 1024) and a step size (0.13 μm) in the xyz mode were used. Depletion was obtained with a 592 nm laser (70% AOTF). Fluorescence (500–550 nm) was collected with a hybrid detector (Gain 100) in the gated mode and a pinhole for Airy 1. The temperature of the chamber was kept at 37°C, and cells were provided with constant gas flow (95% O₂, 5% CO₂) during acquisition with living cells.

TNTs Quantification

After immunolabeling of actin or tubulin filaments, the cells were carefully analyzed for the presence of TNTs, taking into account the criteria previously described in the literature (McCoy-Simandle et al., 2016). Those parameters included (a) lack of adhesion of TNT to the substratum of tissue culture plates (b) the width of the extension estimated more than 1 micron and (c) a narrow base at the base of TNT with a triangular aspect called "in arrow". The number of TNTs for each cell line or after each treatment were counted in 10 randomly chosen fields with 20× objective, and the TNT index was calculated as the average number of TNTs per cell. The TNT lengths were quantified using ImageJ (version 1.50d).

3D collagen matrices preparation

Briefly, acid soluble collagen (Nutragen) was brought to physiologic pH on ice to a final concentration of 4 mg/mL. The first layer of the cold collagen solution was then pipetted (100 μL) onto a MatTek dishes (MatTek Co., Ashand, MA) and were then warmed into 37 °C in a cell culture incubator to allow collagen polymerization for at least 30 minutes. During the time of polymerization, the cells were resuspended in cell culture medium. 2x 10⁵ cells were added on top of the polymerized collagen layer and placed at 37°C incubator to allow attachment of the cells to collagen. One hour later, the cells were

coated with the second layer of collagen (400 μ L) for the establishment of 3D microenvironnement. After 48 hours, TNT was imaged using time-lapse microscopy.

Electron microscopy

Transmission: Cells were rinsed in PBS Buffer, fixed with 2.5% glutaraldehyde in phosphate buffer 0.1M pH 7.4 during 1h at 4°C, then rinsed in phosphate buffer 0.1 M pH 7.4 and post-fixed 1h with 1% osmium tetroxide in phosphate buffer 0.1 M pH 7.4 (at 4°C protected from light). After washing, cells were dehydrated in progressive bath of ethanol (70-100%), embedded in resin Epon and polymerized 24h at 60°C. Ultrathin sections were done and contrasted with uranyl acetate and lead citrate. The cells were observed with transmission electron microscope JEOL 1011 and image were taken with Camera Gatan Orius 200 and digital micrograph software. The number of vesicles was quantified by counting the vesicles present for each treatment condition in 10 fields taken from 10 distinct cells. The diameter of all these vesicles was measured using the digital micrograph software linked to the electron microscope.

Scanning: Cells, seeded on coverslips, are fixed with 2.5% glutaraldehyde overnight. The coverslips then undergo three rinses of ten minutes with the sodium cacodylate buffer solution pH 7.4 at 0.1M. The samples are then dehydrated with successive alcohol baths at 70, 95 and 100%, 3 times 10 min each. A final bath of absolute alcohol will be carried out in the critical point apparatus. A critical point apparatus (Leica CPD 030) is used to replace the alcohol with liquid CO₂ in the cells. After bypassing the critical point of CO₂ (31°C and 73 atmospheres), there is a transition from the liquid state to the gaseous state. This technique preserves the surface structure of the samples. The CO₂ gas is then gently removed and the samples are brought back to room temperature.

The lamellae are glued to a metal plate covered with conductive tape. The samples are then covered with a thin layer of platinum using a dedicated device (JFC1300 JEOL).

Exosome vesicles quantification

Exosome vesicles released into the culture medium were assayed following the EXOCET kit (exosome quantitation assay kit) and ExoQuick-TC procedures. Cell media were centrifuged at 3000xg for 15 minutes to remove any cell debris. The supernatant (5 ml) were transferred to a sterile container, to which 1 ml of ExoQuick-TC was added. The mixed solution was incubated at 4°C overnight and then centrifuged at 1500xg for 5 minutes. The pellet was resuspended in 1 ml of PBS. An aliquot of the suspension (20 µL) was mixed with 80 µL of Exosome Lysis Buffer then was incubated at 37°C for 5 minutes to release the exosome proteins, vortexed 15 seconds and centrifuged 1500xg for 5 minutes to remove debris. Supernatants were transferred into a 96-well plate well to which are added 50 µl of a mixture 1:1 of the EXOCET reaction buffer reagents A and B before being incubated at room temperature for 20 minutes. Absorbance at 405 nm was read using a spectrophotometer.

Statistical analysis.

Data are represented as the mean \pm SEM of experiments performed independently at least three times. To determine statistical significance, a Student's unpaired *t* test was applied to all experiments. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

Characterization of the TNTs structure, formation and intercellular exchange in bronchial or mesothelial cells lines.

We first wonder whether the nanotubes were observed in various human epithelial bronchial or mesothelial cells lines, supporting their ubiquitous nature. We cultured a panel of immortalized tumorigenic and non-tumorigenic epithelial lung cell lines HBEC-3, HBEC-3-RasV12, BEAS-2B, BEAS-2B-RasV12, lung cancer cells lines H1975, A549, H1650, H23 and H441, as well as mesothelioma cell lines H2452, H2052, H28 and the immortalized MSTO-211H cells, such cell lines being categorizing according their ability to express or not RASSF1A, depending on RASSF1A gene methylation status (**Figure S1A**). The TNTs are considered not attached to the substrate as they hover freely in medium and we can observe the bodies of cells and the middle of TNTs in two different optical sections and not with the same focus through microscope ([Lou et al., 2012a](#), [Ady et al., 2014](#); [Bénard et al., 2015](#)). To ensure that it is the case, we either used the time laps (we thus can see that TNTs are even capable of passing above the other attached cells as showed on **Movie. 1**) or observed TNTs on fixed cells with confocal microscope and not with an epifluorescence microscope to allow discrimination of cells extension touching the substrates from cell bridge (**Movie. 2**). We report that each cell type exhibited TNTs independently of their genetic background or their tumorigenicity. As illustrated, for one epithelial lung cell line, HBEC-3, and one mesothelial cell line, H28, the observed structures, displayed either the specific characteristics of TNT-1 (type1) with the presence of actin and microtubule structures (**Figure 1A**) or filopodia-like TNT-2 (type2), which contains only actin filaments (**Figure 1B**) ([Bénard et al., 2015](#)). For more elucidation, we have performed the immunofluorescence experiments with Fascin antibody, which is a known filopodia

marker (Vignjevic *et al.*, 2006). We have systematically observed the presence of fascin along actin filaments through thin structure of filopodia (**Figure S1B**); however, the results with TNTs remained more variable, where fascin has been detected along TNT in some cells but not others (**Figure S1C**). These results are better explained by the two different scenario of TNT formation (Abounit & Zurzolo, 2012). Accordingly, we postulate that fascin is present in TNT when they are formed by “actin driven protrusion”, while it is absence when the TNT are issued of “cell dislodgement mechanism”.

For further extended demonstration of TNT membrane and morphological structures, we used subsequently STimulated Emission Depletion (STED) nanoscopy, which provides higher lateral resolution. In this regard, the clear cytosolic tunnel, with wider tip on donor cell side and thinner end point on acceptor cell side, was confirmed in TNT1 (**Figure 1C**). A cytosolic tunnel was not distinguishable in TNT2 (**Figure 1D**), as previously reported (Bénard *et al.*, 2015). To evaluate TNT formation in a more physiologically relevant microenvironment, the cells were seeded between two layers of type I collagen matrices (see Materials and Methods), which has been reported to induce a switch from a 2D to a 3D morphology and to mimic *in vivo* cellular environment (Artym & Matsumoto, 2010). Consequently, we further confirmed TNT formation in a 3D environment by staining the cells with Alexa 488-wheat germ agglutinin (WGA) (**Figure 1E**), a lectin commonly used to stain TNTs (Pasquier *et al.*, 2013; Bénard *et al.*, 2015). The use of scanning electron microscopy makes it possible to better assess the appearance of TNT formation and its anchoring to the target cell for H28 cells (**Figure 1F**) such as HBEC-3 cells (**Figure 1G**).

Finally, subsequent studies with time-lapse imaging supported the intercellular communication between cultured HBEC-3 cells *via* TNTs (**Movie 3**), as it was also

observed by transport of vital mitochondrial dye (MitoTracker) along TNTs in HBEC-3 (**Figure 1H**) as H28 (**Figure 1I**). The functional activity of TNTs was further reinforced upon transfer of vesicles along TNT using lysosome (LysoTracker, **Figure S1D & Movie 4**) and endoplasmic reticulum (ER-Tracker, **Figure S1E**) fluorescent dyes.

RASSF1A decreases overall TNTs number and length.

As RASSF1A was shown to modulate both tubulin- and actin- related structures ([Liu et al., 2003](#); [Dallol et al., 2004](#); [Dubois et al., 2016](#)), we then looked for the role of RASSF1A in TNTs formation. We predominantly focused on TNT type 1 (TNT-1) as they are responsible for the transfer of materials between the cells ([Onfelt et al., 2006](#); [Wang & Gerdes, 2015](#)). We report that all RASSF1A-depleted cell lines (**Table S1**) except one, displayed significantly higher number of TNT-1 as compared to the cells with normal basal RASSF1A expression (**Figure 2A-B & Figure S2A**). There was only one exception for the H1975 cell line which exhibited numerous numbers of TNT-1 structures despite a wild type RASSF1A expression (**Figure 2A & Figure S1A**).

To confirm whether influencing RASSF1A expression *in vitro* could also modulate the occurrence of TNTs formation, RASSF1A knockdown or re-expression was achieved, respectively, in two cell lines with wild type expression of RASSF1A (HBEC-3 and H2452), and two other cell lines (H28 and A549), which RASSF1A epigenetic silencing (**Table S1 & Figure S1A**). We observed that extinction of RASSF1A expression in nontumorigenic HBEC-3 cells, using two different RNA interference ([Dubois et al., 2016](#)) (**Figure S2B**), increased the average number of TNT-1 per cell (2-fold, $p < 0.01$, **Figure 2C & E & Figure S2C**), as compared to the cells treated with control RNAi. Besides, after RASSF1A depletion, the mean cell-to-cell length of TNT-1 was 1.5 fold higher and could reach up to about 250 microns in length,

while control HBEC-3 cells transfected with non-relevant siRNA exhibited TNT-1 reaching not more than 170 microns in length ($p < 0.01$, **Figure 2D-E**). For clarity, only the data with one RASSF1A RNAi is shown. The same result was also observed in malignant mesothelioma H2452 cells line after RASSF1A depletion (**Figure S2D, Figure 2F**).

Next, we investigated whether RASSF1A depletion was able to induce functional TNT-1, which allow long distance communication between cells. In this regard, transfected cells were divided in two groups. Each group were labeled separately by either Green or Red MitoTracker dyes (Molecular Probes) before being reseeded together. Time lapse imaging of siNeg or siRASSF1A treated HBEC-3 cells revealed the enhanced transfer of mitochondria after RASSF1A depletion, quantified by cells which contain double labeled MitoTracker dye (**Figure 2G-H**). Interestingly, intercellular transfers of cytoplasmic content through TNT-1 occurred similarly between the co-culture of RASSF1A-depleted HBEC-3 cells with different cell line, as shown with the Mitotracker labeled epithelial BEAS-2B cells or mesothelial H28 cells and even healthy lung fibroblast cells (**Figure 2I**).

Concordantly, transfection of the plasmid encoding wild type RASSF1A in malignant mesothelioma H28 cell line and lung epithelial A549 (**Figure S2F**), decreased significantly not only TNT-1 formation, but also their length and intracellular transfers of mitochondria, compared to the cells transfected with the control plasmid (**Figure 2J-N & Figure S2E**). Taken together, these data provide evidence of the role of RASSF1A in TNTs formation and support the existence of a specific signaling pathway, which leads to an increase of functional TNT-1 after RASSF1A depletion.

RASSF1A knockdown increases TNTs formation in either hypoxic or serum starved conditions.

Environmental or metabolic stresses, such as hypoxia or nutriment starvation, are characteristic of the aggressive tumor microenvironment and have been identified as a hallmark of malignant tumors (Yokoi & Fidler, 2004; Samanta *et al.*, 2014). The lack of oxygen or nutriments is known to stimulate TNTs formation that serves as an adaptive response to facilitate the connection of the cells at the long distance for the exchange of cytoplasmic materials in order to survive in such hostile conditions (Wang *et al.*, 2011; Lou *et al.*, 2012a; Désir *et al.*, 2016). To investigate whether RASSF1A depletion could still enhance TNT-1 occurrence in these conditions, 48h after transfection, the HBEC-3 cell lines were exposed for another 24h to either hypoxic environment with 0.1% oxygen or starved in a low-serum medium (0.5% FBS).

To confirm the oxygen deprivation in culture, hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) expression was examined by immunofluorescence in the cells exposed to either normoxic or hypoxic conditions, since HIF-1 α is known to maintain cellular homeostasis in low oxygen levels and thus can serve as an effective molecular marker of hypoxia (Vukovic *et al.*, 2001). We actually found a nuclear HIF-1 α signal in HBEC-3 cell in hypoxic culture condition as compared to the cells cultured in normoxic condition, in which no HIF-1 α signal was detected (**Figure 3A**). The effect of serum deprivation is also confirmed by the increase of altered-nucleus cells after DAPI staining compared to control cells with intact nuclei (**Figure 3B**).

As stated earlier in the cells cultured in standard medium conditions (10% fetal bovine serum and normoxic environment), RASSF1A depletion did increase the number of TNT-1. In either hypoxic environment or in the cells exposed to serum deprivation, RASSF1A depletion still enhanced significantly TNT-1 formation

compared to the cells transfected with control RNAi (**Figure 3C-D**). These data suggest that RASSF1A promoter methylation, observed at the early pre-invasive stage of cancer development ([De Fraipont et al., 2012](#)), may actually be beneficial for cell survival during environmental or metabolic stresses.

Vimentin and actomyosin are needed for TNTs formation after RASSF1A depletion.

We then sought to determine whether RASSF1A depletion increased the number and length of the functional TNTs by influencing cytoskeletal elements. Indeed, in line with the role of RASSF1A in maintaining epithelial phenotype ([Dubois et al., 2016](#)), increase of vimentin expression (marker of mesenchymal cells ([Mendez et al., 2010](#))) in RASSF1A depleted HBEC-3 epithelial cells was concordant with the increase of TNT-1 formation (**Figure 4A-B**), while RASSF1A re-expression in A549 cells, significantly reduced both vimentin and TNT-1 number (**Figure 4C-D**). Similarly, depletion of vimentin by RNAi, decreased significantly the ability of RASSF1A-knockdown cells to form TNT-1 (**Figure 4E-F**). These observations suggest a role for vimentin in TNTs genesis.

We also sought to study the role of other cytoskeletal components, and 48h after RASSF1A knockdown, HBEC-3 cells were incubated with cytoskeleton disrupting drugs during 24h, before fixation. Despite the well-known role of RASSF1A in microtubules stabilization ([Dalloi et al., 2004](#); [El-Kalla et al., 2010](#)), stabilization of the microtubule by paclitaxel (10 nM) or their depolymerization with nocodazole (10 μ M) did not affect the enhancement of TNT-1 formation induced by RASSF1A knockdown (**Figure 4G-H**). In contrast, inhibition of myosin II ATPase with blebbistatin (5 μ M) increased not only the TNT-1 formation in control cells, but also showed an

additive effect with RASSF1A depletion on enhancement of TNT-1 genesis (**Figure 4G-H**). We also find that RASSF1A knockdown reduced the mRNA expression of Myosin 9 and 10 heavy chains mRNAs and increased the expression of Myosin 9 light chain transcript (**Figure 4I**). These data confirm the previously identified role of the loss actin bundles in TNTs formation ([Gurke *et al.*, 2008](#); [Osteikoetxea-Molnàr *et al.*, 2016](#)), while conversely supporting a new role for RASSF1A as a modulator of TNTs formation, through control of myosin expression and actin filaments contractility.

Exosomes released by RASS1A depleted cells affect TNT formation.

To gain further insight in the singular role of RASSF1A depletion on TNTs formation, we investigated how TNTs formation was triggered. Recently, vesicles from exosomes were also determined as mediators of TNTs formation in mesothelioma cells ([Thayanithy *et al.*, 2014b](#)). Interestingly, our preliminary observations also revealed the presence of multiple vesicles-like structures in the cytoplasm of RASSF1A-knockdown cells (**Movie 5**). A closer look on the images captured by electron microscopy (**Figure 5A**), confirmed that RASSF1A depletion did increase the number of vesicles (**Figure 5B**), without affecting their diameters (**Figure 5C**). To our surprise, the quantification of the exosome released in culture media by RASSF1A knockdown cells did not differ from the control cells (**Figure 5D**). Therefore, we postulated that exosome production and content might be influenced by RASSF1A expression. In line with this hypothesis, the immunofluorescence staining of cofilin, a protein implicated in exosome biogenesis and function ([Théry *et al.*, 2001](#)), confirmed a clear increase in cofilin content within exosome structures upon RASSF1A depletion (**Figure 5E**).

To test whether the exosome contents can modulate TNT-1 formation, 48 hours after transfection, the medium from siNeg- or siRASSF1A-transfected HBEC-3 cells

was collected and transferred to the parental non-treated HBEC-3 cells. Remarkably, 24 hours after medium transfer, we noticed a significant increase of TNT-1 formation in HBEC-3 cells incubated with the medium issued from RASSF1A-depleted cells (**Figure 5F-G**). This data reveals that the increase of TNT-1 formation after RASSF1A depletion could occur, at least in part, by the secretion-dependent mechanisms and by the release of exocytic vesicles in the extracellular medium.

TNTs formation induced by RASSF1A silencing simultaneously depends on GEF-H1 inactivation and Rab11 activation.

Next, we investigated which potential mechanistic pathway was essential for TNTs formation in RASSF1A-depleted cells. Recently, our group demonstrated that RASSF1A depletion inhibits the anti-metastatic RhoB GTPase *via* phosphorylation and inactivation of GEF-H1, with potential implications to delay the progression of RASSF1A-hypermethylated lung tumors ([Dubois et al., 2016](#)). Interestingly, GEF-H1 was also reported to be required for endocytic and exocytic vesicle trafficking ([Pathak & DerMardirossian, 2013](#)). Therefore, we wondered whether the increase of TNT-1 formation in RASSF1A-depleted cells was actually mediated by GEF-H1 inactivation.

In this respect, GEF-H1 inactivation was achieved by siRNA in either HBEC-3 or H2452 cell lines with normal RASSF1A basal expression (**Figure S3A-C**). In line with our hypothesis, in both cell types, GEF-H1 depletion significantly elevated the TNT-1 formation in control cells, comparable to the level of TNT-1 number in the cells depleted for RASSF1A (**Figure 6A-B and Figure S3D-E**). Therefore, these data support the idea that the effect of RASSF1A could be mediated by GEF-H1 signaling.

Furthermore, it is known in the literature that loss of GEF-H1 induces the accumulation of Rab11 ([Pathak et al., 2012](#)), a small GTPases regulating exocytosis

at the plasma membrane (Takahashi *et al.*, 2012). Rab11a and Rab11b are two closely related Rab11 isoforms, which are ubiquitously expressed in most tissue (Campa & Hirsch, 2017). Previously, Rab11a was also implicated in the TNTs formation (Zhu *et al.*, 2016). Accordingly, we observed increased expression of Rab11a/b in the absence of RASSF1A (**Figure S3F-G**). In this context, we aimed to determine if elevated amount of Rab11 was also involved in the induction of TNTs observed in RASSF1A depleted cells. Hence, by using both Rab11a and Rab11b RNAi in HBEC-3 and H2452 cell lines (**Figure S2H-J**), we observed that loss of Rab11a or Rab11b induced a clear and significant reduction in the number of TNT-1 in RASSF1A-knockdown cells, compared with cells treated with siRASSF1A alone (**Figure 6C-D and Figure S2K-L**).

In addition, by quantifying mitochondria transfer between the cells, using MitoTracker, we tested whether altering either GEF-H1 or Rab11 expression, coincided with the modulation of functional TNTs formation, to allow long distance cell-cell communication. Consistent with above data, confocal and time-lapse imaging showed that loss of GEF-H1 in HBEC-3 cell line, led to an increased number of double positive cells, indicative of effective organelle transfer (**Figure 6E-F**). Conversely, double knockdown of both RASSF1A and Rab11a, or Rab11b, which decreased significantly the TNT-1 induction, repressed the intercellular mitochondria transfer (**Figure 6G-H**). It is of note that the absence of double-labeled mitochondria in individual cell, which did not show any contact *via* TNTs during time-lapse imaging, argues against the passive dye transfer between the cells. Overall, these results indicate the role of GEF-H1/Rab11 signaling in association with RASSF1A expression, in the control of intercellular communication, by modulating TNTs formation.

Discussion

We previously showed that the loss of expression of the tumor suppressor gene RASSF1A was a factor of poor prognosis in patient with non-small cell lung cancer (De Fraipont *et al.*, 2012) since the inactivation of RASSF1A, by altering both the Hippo and Rho signaling pathways, led to the acquisition of a metastatic phenotype by the tumor cells. Here, we hypothesized that the RASSF1A knockdown could also affect intercellular communication *via* tunneling nanotubes (TNTs), since TNT-1 contains actin and microtubules (Bénard *et al.*, 2015), two elements of the cytoskeleton influenced by RASSF1A cell content (Dubois *et al.*, 2016). With the present work, we now provide-evidence that RASSF1A, by controlling proper GEF-H1/Rab11 activities and cytoskeleton architecture, also prevents TNTs formation in bronchial epithelial or pleural mesothelial cells.

TNTs were first described *in vitro* in 2004 in the rat pheochromocytoma PC12 cells (Rustom *et al.*, 2004), before being observed in several other cell types (fibroblasts, epithelial cells, immune cells, cardiomyocytes, hippocampal astrocytes, mesenchymal stem cells), as well as in primary cancer cell lines (from ovarian, breast, pancreatic, prostate or colon cancers) (Lou *et al.*, 2012a). TNTs have then been described *ex-vivo* in tumor samples from patients with malignant pleural mesothelioma or lung adenocarcinoma (Sisakhtnezhad & Khosravi, 2015). Here, by using a panel of different lung epithelial and mesothelioma cell lines, we confirm that TNTs are ubiquitous cellular structures, since all the cell lines studied displayed cell extensions with the specific characteristics of TNTs (**Figure 1**). We also observed that these TNTs enhanced intercellular exchange, time-lapse imaging revealing the presence of organelles such as mitochondria, lysosome or endoplasmic reticulum along TNTs going from one donor to one acceptor cell (**Figure 1 and supplementary Figure 1**).

The analysis of the different native lung epithelial and mesothelioma cell lines, as the analysis of lung and mesothelial cells upon RASSF1A silencing, or conversely re-expression pointed out the preferential formation of TNT-1 in RASSF1A-depleted cells, compared to cells with normal RASSF1A expression (**Figure 2**). Only H1975 cell line, despite a normal expression of RASSF1A, exhibited numerous numbers of TNTs formation which could be explained by the activating mutation of PI3K on these cells (Nukaga *et al.*, 2017), since PI3K was previously implicated in TNTs induction (Wang *et al.*, 2011; Sisakhtnezhad & Khosravi, 2015).

We demonstrate here that RASSF1A prevents TNT-1 by its control on both actin cytoarchitecture and intermediate filaments components. Indeed, while microtubule and actin are the main building blocks of TNTs genesis and stabilization (Gerdes *et al.*, 2007), we provide evidence that TNT-1 induced by RASSF1A silencing in bronchial epithelial or mesothelial cells did not depend on microtubules since TNT-1 were insusceptible to either pharmacologic stabilization of microtubules by paclitaxel or further depolymerization by nocodazole (**Figure 4**). While some studies showed the involvement of the microtubules in the formation of TNTs (Wang & Gerdes, 2015), others did not find such a role (Roberts *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2017), suggesting that the role of microtubule in TNTs formation, may vary depending on the cells type. Conversely, in line with previous reports, we confirmed the involvements of actin, because the loss of actomyosin filaments network induced by blebbistatin treatment impaired TNTs formation in our cells (Gerdes *et al.*, 2007; Gurke *et al.*, 2008; Osteikoetxea-Molnàr *et al.*, 2016; Hanna *et al.*, 2017). RASSF1A depletion enhanced synergistically the effects of blebbistatin to drive extension of TNTs protrusions (**Figure 4**). Accordingly, RASSF1A depletion also influenced different myosin's chains expression. A potential explanation for these results might come from our previous

data where RASSF1A depletion was found to influence actin structure through modulating both Rho GTPase and LIMK/Cofilin signaling pathways (Sit & Manser, 2011; Dubois *et al.*, 2016), proteins largely linked to modulation of actomyosin assembly (Arnold *et al.*, 2017; Wiggan *et al.*, 2017). In addition, we revealed that increase of intermediate filament vimentin, after acquisition of EMT in RASSF1A depleted cells (Dubois *et al.*, 2016), might also contribute to the TNTs formation. Few reports have characterized the presence of intermediate filament such as vimentin along the length of TNTs (Veranic *et al.*, 2008; Ady *et al.*, 2014). Here, we confirmed not only the presence of vimentin along TNTs, but also, we found out that the increase of vimentin expression was concomitant with TNTs formation while vimentin silencing by siRNA decreases TNT-1 formation (**Figure 4**). Besides, it is of note that EMT was shown to be a favorable factor to induce TNTs formation (Lou *et al.*, 2012b).

The TNTs induced by the loss of RASSF1A in bronchial epithelial or mesothelial cells are functional and allow the exchange of organelles and in particular of mitochondrial, lysosome or endoplasmic reticulum between cells (**Figure 2**). As RASSF1A methylation occurs at the early stage of numerous human cancers and its inactivation is associated with more aggressive tumor phenotype (Donninger *et al.*, 2007; Hesson *et al.*, 2007), increase of TNT-1 formation in the absence of RASSF1A, could act by stimulating metabolic adaptation of cancer cells at the early stage, and could further participates to the emergence of resistance during drug treatment. Tumor microenvironment is often hypoxic, inflammatory and nutrient-poor during cancer growth. The transfer of different cytoplasmic components including oncogenic genetic materials or nutrients, *via* TNT-1 has already been suggested to be responsible for the acquisition of functional benefits and phenotypic modifications helping cell survival during environmental or metabolic stresses (Ady *et al.*, 2014), and even to be

responsible for causing and/or maintaining drug resistance ([Ambudkar et al., 2005](#), [Pasquier et al., 2013](#)). For instance, it has been shown that hypoxia can also induce TNTs-mediated communication ([Desir et al., 2016](#)), and active transfers of mitochondria through TNTs was suggested to rescue aerobic respiration in cells with dysfunctional mitochondria ([Spees et al., 2016](#)). Importantly, increase of TNT-1 formation in the absence of RASSF1A still occur in either hypoxic or serum starved conditions (**Figure 3**). Further, an increased release of exosome was found to be triggered by environmental or metabolic stress ([Azmi et al., 2013](#); [Kucharzewska & Belting, 2013](#)) as it was observed in a similar way for TNTs formation ([Wang et al., 2011](#); [Lou et al., 2012a](#); [Désir et al., 2016](#)).

Given the ability of RASSF1A to influence LIMK/Cofilin activity ([Dubois et al., 2016](#)) and the identified role of cofilin in exosome release ([Wolf et al., 2015](#)), another interesting insight was to explore the simultaneous implication of both RASSF1A and exocytosis in TNTs formation. We have observed that the addition of the media issued from RASSF1A-depleted cells was sufficient to enhance the TNT-1 formation in non-treated cells (**Figure 5**). Considering this result and in line with previous reports ([Ohno et al., 2010](#); [Mukerji et al., 2012](#); [Schiller et al., 2013](#)), we postulated that the increase of secretion or uptake of exosomes after RASSF1A knockdown could also be introduced as potential chemotactic stimuli acting as paracrine effectors to induce TNT formation. They encapsulate the cytosol of the producing cell containing various effector molecules such as proteins and microRNAs as well as cytoskeleton components including microtubule and actin binding proteins. However, it is still not established whether exosome itself or cytosolic signaling molecules carried within are responsible for the role of exosomes in TNTs formation ([Hood et al., 2009](#) ; [Mineo et al., 2012](#) ; [Thayanithy et al., 2014b](#)). Moreover, we cannot completely exclude the

possibility that secretion of cytokine and chemokine-based signaling molecules, could act in concert with exosomes to increase TNT formation. In this regard, it has also been shown that TNT stimulate the secretion of prosurvival cytokines (Polak *et al.*, 2015). In addition, exosomes are also able to affect cytokines expression profiles (Hood *et al.*, 2009; Whiteside, 2016). It is of note that characterizing key players of the exosomes or other freely diffusible signals in TNT formation is the main subject of ongoing work in our laboratory.

Mechanistically, we finally demonstrate that RASSF1A prevents TNTs by regulating both the cytoskeleton and exocytosis, since controls proper GEF-H1 and Rab11 activities. Our group has previously demonstrated that RASSF1A knockdown can induce EMT and increase of invasiveness, at least in part, through GEF-H1 inactivation (Dubois *et al.*, 2016). Besides, it is known that GEF-H1 is a microtubule binding protein, which can also influence the dynamics of the actin filaments by modulating either Rac or Rho activities (Birkenfeld *et al.*, 2008). Using confocal and time-lapse imaging, we reported that GEF-H1 depletion actually increased both TNTs formation and intercellular transfer between the cells (**Figure 6**). Accordingly, RalGPS2, an independent GEF for the Ral GTPase, was also shown to promote the TNTs formation through rearrangement of actin cytoskeleton in bladder cancer (D'Aloia *et al.*, 2018). While previously described in Hela cells (Pathak *et al.*, 2012), we confirmed here in bronchial epithelial or pleural mesothelial cells that GEF-H1 depletion did induce Rab11 accumulation (**Supplementary Figure 3**). However, from our results, we suggest that GEF-H1 depletion increase exosome secretion, whereas, Pathak *et al.*, indicate a negative role for GEH-H1 depletion in regulation of exocytosis. Two different hypotheses have been put forward to reconcile these disparate observations. The first, these conflicting data may be explained by context-dependent

expression of GEF effectors or their modification. Indeed, the GEF-H1 inactivation induced by RASSF1A silencing, leads only to the decrease of RhoB expression and activity, without affecting RhoA levels (Dubois *et al.*, 2016). On the contrary, the former study show RhoA activation in response to RalA-Sec5 signaling (Pathak *et al.*, 2012). Alternatively, differences in cell type or the experimental design in the two studies may be another reason for the opposing results. On the other hands, Rab11 knockdown in RASSF1A-depleted cells, actually decreased the induction of TNTs and subsequent organelle transfer. In line with our results, a recent study demonstrated that downregulation of Rab11 in Schwann cells decreased the formation of functional TNTs and vesicle transfer between the cells (Zhu *et al.*, 2016). Thus, decrease of GEF-H1 activity, in addition to Rab11 accumulation after RASSF1A knockdown, induces the increase of TNTs formation, possibly by altering exocytosis. In agreement with the role of exocytosis in TNTs formation reported here and by others (Mukerji *et al.*, 2012; Schiller *et al.*, 2013), it is interesting to note that accumulation of Rab11 induced by GEF-H1 depletion (Pathak *et al.*, 2012; Pathak & DerMardirossian, 2013) was previously shown to regulates exocytosis at the plasma membrane (Takahashi *et al.*, 2012).

Taken together, we provide evidence here that RASSF1A depletion increased the number and length of functional TNTs. It occurred mechanistically because of *i*) increase of vimentin expression upon the induction of EMT *ii*) loss of actomyosin network through modulating both Rho GTPase and LIMK/Cofilin signaling pathways and *iii*) control of exosome release possibly by inducing GEF-H1 inactivation and RAB11 upregulation (**Figure 7**).

Conclusions

To our knowledge, this study represents the first evidence for a role of RASSF1A in TNTs formation. Thus, we postulate that RASSF1A methylation within the complex and heterogeneous tumor microenvironment would allow the cancer cells to transmit cytoplasmic components (proteins and genetic material) over a long-range distance through TNTs to neighbor cells. Accordingly, targeting TNTs formation appears to consist of a promising therapeutic strategy for preventing development of chemotherapy resistance cancer cells. However, further in-depth preclinical and clinical studies are warranted to investigate the physiologic impact of TNTs within the tumor-stromal matrix and the role of RASSF1A alteration in such phenomenon.

Abbreviations

EMT: epithelial-mesenchymal transition

GEF-H1: guanine nucleotide exchange factor 1

NSCLC: Non-Small Cell Lung Cancer

RASSF1: Ras-association domain family isoform

TNTs: Tunneling nanotubes

Declarations

Ethics approval and consent to participate:

Not applicable.

Consent for publication:

Not applicable.

Declaration of Interests:

The authors declare that they have no competing interest.

Funding:

F. Dubois and M. Keller were recipients of PhD. grants from the Association des Insuffisants Respiratoire de Basse-Normandie (AIR) and from Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). E Maille was recipient of PhD. grants from both AIR and Région Basse-Normandie, B. Jean-Jacques received a master grant from the Fondation du Souffle. This work was supported by research grants from the “Ligue contre le Cancer de Normandie” (Comité du Calvados (to EB and GL) and from the Rouen Institute of Research and Innovation In Biomedicine (IRIB) (to LG and GL).

Authors contributions:

FD, GZ & GL conceived and designed the experiments. FD, BJJ, HR, MB, DS, MK, EM, and GL performed the experiments. LG, MB, DS, NE, DG and EB provided

technical and scientific support. FD, BJJ and GL wrote the manuscript with the help of all the authors. All authors approved the final manuscript.

Acknowledgments:

We are indebted to Dr. Michael White for providing the HBEC-3 cell line. We are grateful to members of the CERVOxy laboratory for their helpful suggestions and discussions. We are grateful to Pr Romain Ghérardi for its helpful recommendation and lighting.

References:

- Abounit S**, Zurzolo C. (2012). Wiring through tunneling nanotubes--from electrical signals to organelle transfer. *J Cell Sci.* 1;125(Pt 5):1089-98. doi: 10.1242/jcs.083279. Epub 2012 Mar 7. Review.
- Ady JW**, Desir S, Thayanithy V, Vogel RI, Moreira AL, Downey RJ, Fong Y, Manova-Todorova K, Moore MA, Lou E. (2014). Intercellular communication in malignant pleural mesothelioma: properties of tunneling nanotubes. *Front Physiol.* 31;5:400.
- Ady JW**, Desir S, Thayanithy V, Vogel RI, Moreira AL, Downey RJ, et al. (2016). Intercellular communication in malignant pleural mesothelioma: properties of tunneling nanotubes. *Front Physiol.* 5: 400.
- Agathangelou A**, Honorio S, Macartney DP, Martinez A, Dallol A, Rader J, Fullwood P, Chauhan A, Walker R, Shaw JA, Hosoe S, Lerman MI, Minna JD, Maher ER, Latif F. (2001). Methylation associated inactivation of RASSF1A from region 3p21.3 in lung, breast and ovarian tumours. *Oncogene.* 22; 20(12):1509-18.
- Ambudkar SV**, Sauna ZE, Gottesman MM, Szakacs G. (2005). A novel way to spread drug resistance in tumor cells: functional intercellular transfer of P-glycoprotein (ABCB1). *Trends Pharmacol Sci.* 26(8): 385-7.
- Amin KS**, Banerjee PP. (2012). The cellular functions of RASSF1A and its inactivation in prostate cancer. *J Carcinog.* 11:3.
- Arnold TR**, Stephenson RE, Miller AL. (2017). Rho GTPases and actomyosin: Partners in regulating epithelial cell-cell junction structure and function. *Exp Cell Res.* 1;358(1):20-30. doi: 10.1016/j.yexcr.2017.03.053.
- Artym VV**, Matsumoto. (2010). Imaging Cells in Three Dimensional Collagen Matrix. *Curr Protoc Cell Biol.* Chapter 10 : Unit 10.18.1-20. doi: 10.1002/0471143030.cb1018s48.
- Azmi AS**, Bao B, Sarkar FH. (2013). Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review. *Cancer Metastasis Rev.* 32(3-4):623-42. Review.
- Bénard M**, Schapman D, Lebon A, Monterroso B, Bellenger M, Le Foll F, et al. (2015). Structural and functional analysis of tunneling nanotubes (TNTs) using gCW STED and gconfocal approaches. *Biol Cell.* 107(11): 419–25.
- Birkenfeld J**, Nalbant P, Yoon SH, Bokoch GM. (2008). Cellular functions of GEF-H1, a microtubule-regulated Rho-GEF: is altered GEF-H1 activity a crucial determinant of disease pathogenesis? *Trends Cell Biol.* 18: 210-9.
- Bissell MJ**, Hines WC. (2011). Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat Med.* 17(3):320-9.
- Bukoreshtliev NV**, Wang X, Hodneland E, Gurke S, Barroso JF, Gerdes HH. (2009). Selective block of tunneling nanotube (TNT) formation inhibits intercellular organelle transfer between PC12 cells. *FEBS Lett.* 583(9):1481-8.
- Campa CC**, Hirsch E. (2017). Rab11 & phosphoinositides: A synergy of signal transducers in the control of vesicular trafficking. *Adv Biol Regul.* 63:132-139.

- Chang K**, Baginski J, Hassan SF, Volin M, Shukla D, Tiwari V. (2016). Filopodia and Viruses: An Analysis of Membrane Processes in Entry Mechanisms. *Front Microbiol.* 10; 7:300.
- D'Aloia A**, Berruti G, Costa B, Schiller C, Ambrosini R, Pastori V, Martegani E, Ceriani M. (2018). RalGPS2 is involved in tunneling nanotubes formation in 5637 bladder cancer cells. *Exp Cell Res.* 15;362(2):349-361.
- Dalloi A**, Agathangelou A, Fenton SL, Ahmed-Choudhury J, Hesson L, Vos MD, Clark GJ, Downward J, Maher ER, Latif F. (2004). RASSF1A interacts with microtubule-associated proteins and modulates microtubule dynamics. *Cancer Res.* 15; 64(12):4112-6.
- Dalloi A**, Agathangelou A, Tommasi S, Pfeifer GP, Maher ER, Latif F. (2005). Involvement of the RASSF1A tumor suppressor gene in controlling cell migration. *Cancer Res.* 65:7653- 9.
- Dammann RH**, Richter AM, Jiménez AP, Woods M, Küster M, Witharana C. (2017). Impact of Natural Compounds on DNA Methylation Levels of the tumor Suppressor Gene RASSF1A in Cancer. *Int J Mol Sci.* 17;18(10). pii: E2160.
- De Fraipont F**, Levallet G, Creveuil C, Bergot E, Beau-Faller M, Mounawar M, et al. (2012). An apoptosis methylation prognostic signature for early lung cancer in the IFCT-0002 trial. *Clin Cancer Res.* 15; 18(10):2976–86.
- Delage E**, Cervantes DC, Pénard E, Schmitt C, Syan S, Disanza A, Scita G, Zurzolo C. (2016). Differential identity of Filopodia and Tunneling Nanotubes revealed by the opposite functions of actin regulatory complexes. *Sci Rep.* 23;6:39632. doi: 10.1038/srep39632.
- Desir S**, Dickson EL, Vogel RI, Thayanithy V, Wong P, Teoh D, Geller MA, Steer CJ, Subramanian S, Lou E. (2016). Tunneling nanotube formation is stimulated by hypoxia in ovarian cancer cells. *Oncotarget.* 12;7(28):43150-43161.
- Destro A**, Ceresoli GL, Baryshnikova E, Garassino I, Zucali PA, De Vincenzo F, et al. (2008) Gene methylation in pleural mesothelioma: correlations with clinico-pathological features and patient's follow-up. *Lung Cancer.* 59(3):369–76.
- Donninger H**, Vos MD, Clark GJ. (2007). The RASSF1A tumor suppressor. *J Cell Sci.*15; 120 (Pt 18):3163-72.
- Donninger H**, Clark JA, Monaghan MK, Schmidt ML, Vos M, Clark GJ. (2014). Cell cycle restriction is more important than apoptosis induction for RASSF1A protein tumor suppression. *J Biol Chem.* 7;289(45):31287-95.
- Dubois F**, Keller M, Calvayrac O, Soncin F, Hoa L, Hergovich A, et al. (2016). RASSF1A Suppresses the Invasion and Metastatic Potential of Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells by Inhibiting YAP Activation through the GEF-H1/RhoB Pathway. *Cancer Res.* 15; 76(6):1627–40.
- EI-Kalla M**, Onyskiw C, Baksh S. (2010). Functional importance of RASSF1A microtubule localization and polymorphisms. *Oncogene*, 29:5729–40.
- Gerdes HH**, Bukoreshtliev NV, Barroso JF. (2007). Tunneling nanotubes: a new route for the exchange of components between animal cells. *FEBS Lett.* 581: 2194–2201.
- Gerdes HH**, Rustom A, Wang X. (2013). Tunneling nanotubes, an emerging intercellular communication route in development. *Mech Dev.* 130(6-8):381-7.

- Gousset K**, Marzo L, Commere PH, Zurzolo C. (2013). Myo10 is a key regulator of TNT formation in neuronal cells. *J Cell Sci.* 1; 126(Pt 19): 4424-35.
- Gurke S**, Barroso JF, Hodneland E, Bukoreshtliev NV, Schlicker O, Gerdes HH. (2008). Tunneling nanotube (TNT)-like structures facilitate a constitutive, actomyosin-dependent exchange of endocytic organelles between normal rat kidney cells. *Exp Cell Res.* 10; 314 (20):3669-83.
- Haimovich G**, Ecker CM, Dunagin MC, Eggan E, Raj A, Gerst JE, Singer RH. (2017). Intercellular mRNA trafficking via membrane nanotube-like extensions in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 14; 114(46):E9873-E9882. doi: 10.1073/pnas.1706365114.
- Hanna SJ**, McCoy-Simandle K, Miskolci V, Guo P, Cammer M, Hodgson L, Cox D. (2017). The Role of Rho-GTPases and actin polymerization during Macrophage Tunneling Nanotube Biogenesis. *Sci Rep.* 17;7(1):8547.
- Hase K**, Kimura S, Takatsu H, Ohmae M, Kawano S, Kitamura H, Ito M, Watarai H, Hazelett CC, Yeaman C, Ohno H. (2009). M-Sec promotes membrane nanotube formation by interacting with Ral and the exocyst complex. *Nat Cell Biol.* 11:1427–32.
- Hesson LB**, Cooper WN, Latif F. (2007). The role of RASSF1A methylation in cancer. *Dis. Markers.* 23, 73-87.
- Hood JL**, Pan H, Lanza GM, Wickline SA; Consortium for Translational Research in Advanced Imaging and Nanomedicine (C-TRAIN). (2009). Paracrine induction of endothelium by tumor exosomes. *Lab Invest.* 89(11):1317-28. doi: 10.1038/labinvest.2009.94.
- Huber MA**, Kraut N, Beug H. (2005). Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol.* 17(5):548-58.
- Kenny PA**, Lee GY, Myers CA, Neve RM, Semeiks JR, Spellman PT, Lorenz K, Lee EH, Barcellos-Hoff MH, Petersen OW, Gray JW, Bissell MJ. (2007). The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Mol Oncol.* 1(1):84-96.
- Kucharzewska P**, Belting M. (2013). Emerging roles of extracellular vesicles in the adaptive response of tumour cells to microenvironmental stress. *J Extracell Vesicles.* 5;2.
- Kumar A**, Kim JH, Ranjan P, Metcalfe MG, Cao W, Mishina M, Gangappa S, Guo Z, Boyden ES, Zaki S, York I, García-Sastre A, Shaw M, Sambhara S. (2017). Influenza virus exploits tunneling nanotubes for cell-to-cell spread. *Sci Rep.* 6;7:40360.
- Liu L**, Tommasi S, Lee DH, Dammann R, Pfeifer GP. (2003). Control of microtubule stability by the RASSF1A tumor suppressor. *Oncogene.* 6;22(50):8125-36.
- Lou E**, Fujisawa S, Barlas A, Romin Y, Manova-Todorova K, Moore MA, Subramanian S. (2012a). Tunneling Nanotubes: A new paradigm for studying intercellular communication and therapeutics in cancer. *Commun Integr Biol.* 1;5(4):399-403.
- Lou E**, Fujisawa S, Morozov A, Barlas A, Romin Y, Dogan Y, Gholami S, Moreira AL, Manova-Todorova K, Moore MA. (2012b). Tunneling nanotubes provide a unique conduit for intercellular transfer of cellular contents in human malignant pleural mesothelioma. *PLoS One.* 7: e33093.

Mendez MG, Kojima S, Goldman RD. (2010) Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J.* 24(6):1838-51. doi: 10.1096/fj.09-151639.

Mineo M, Garfield SH, Taverna S, Flugy A, De Leo G, Alessandro R, Kohn EC. (2012). Exosomes released by K562 chronic myeloid leukemia cells promote angiogenesis in a Src-dependent fashion. *Angiogenesis.* 15(1):33-45. doi: 10.1007/s10456-011-9241-1.

Mukerji J, Olivieri KC, Misra V, Agopian KA, Gabuzda D. (2012). Proteomic analysis of HIV-1 Nef cellular binding partners reveals a role for exocyst complex proteins in mediating enhancement of intercellular nanotube formation. *Retrovirology.* 22;9:33.

Polak R, de Rooij B, Pieters R, den Boer ML. (2015). B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells use tunneling nanotubes to orchestrate their microenvironment. *Blood.* 19;126(21):2404-14. doi: 10.1182/blood-2015-03-634238.

Ohno H, Hase K, Kimura S. (2010). M-Sec: Emerging secrets of tunneling nanotube formation. *Commun Integr Biol.* 3(3):231-3.

Okafo G, Prevedel L, Eugenin E. (2017). Tunneling nanotubes (TNT) mediate long-range gap junctional communication: Implications for HIV cell to cell spread. *Sci Rep.* 30;7(1):16660.

Onfelt B, Nedvetzki S, Benninger RK, Purbhoo MA, Sowinski S, Hume AN, Seabra MC, Neil MA, French PM, Davis DM. (2006). Structurally distinct membrane nanotubes between human macrophages support long-distance vesicular traffic or surfing of bacteria. *J Immunol.* 15; 177(12):8476-83.

Osteikoetxea-Molnár A, Szabó-Meleg E, Tóth EA, Oszvald Á, Izsépi E, Kremlitzka M, Biri B, Nyitray L, Bozó T, Németh P, Kellermayer M, Nyitrai M, Matko J. (2016). The growth determinants and transport properties of tunneling nanotube networks between B lymphocytes. *Cell Mol Life Sci.* 73(23):4531-4545

Mackenzie K, Foot NJ, Anand S, Dalton HE, Chaudhary N, Collins BM, Mathivanan S, Kumar S. (2016). Regulation of the divalent metal ion transporter via membrane budding. *Cell Discov.* Jun 21;2:16011.

Nukaga S, Yasuda H, Tsuchihara K, Hamamoto J, Masuzawa K, Kawada I, Naoki K, Matsumoto S, Mimaki S, Ikemura S, Goto K, Betsuyaku T, Soejima K. Amplification of EGFR Wild-Type Alleles in Non-Small Cell Lung Cancer Cells Confers Acquired Resistance to Mutation-Selective EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors. *Cancer Res.* 2017 Apr 15;77(8):2078-2089.

Pasquier J, Guerrouahen BS, Al Thawadi H, Ghiabi P, Maleki M, Abu-Kaoud N, Jacob A, Mirshahi M, Galas L, Rafii S, Le Foll F, Rafii A. (2013). Preferential transfer of mitochondria from endothelial to cancer cells through tunneling nanotubes modulates chemoresistance. *J Transl Med.* 10; 11:94.

Pathak R, Delorme-Walker VD, Howell MC, Anselmo AN, White MA, Bokoch GM, Dermardirossian C. (2012). The microtubule-associated Rho activating factor GEF-H1 interacts with exocyst complex to regulate vesicle traffic. *Dev. Cell* 23, 397–411.

Pathak R, Dermardirossian C. (2013). GEF-H1: orchestrating the interplay between cytoskeleton and vesicle trafficking. *Small GTPases.* 4(3): 174-9.

Petrie R, Harlin H, Korsak L, Yamada K. (2017). Activating the nuclear piston mechanism of 3D migration in tumor cells. *J Cell Biol.* Jan 2; 216(1): 93–100.

- Reichert D**, Scheinpflug J, Karbanová J, Freund D, Bornhäuser M, Corbeil D. (2016). Tunneling nanotubes mediate the transfer of stem cell marker CD133 between hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol.* 44(11):1092-1112.e2.
- Roberts KL**, Manicassamy B, Lamb RA. (2015). Influenza A virus uses intercellular connections to spread to neighboring cells. *J Virol.* 89(3):1537-49.
- Rong R**, Jin W, Zhang JM, Sheikh MS, Huang Y. (2004). Tumor suppressor RASSF1A is a microtubule-binding protein that stabilizes microtubules and induces G2/M arrest. *Oncogene.* 23: 8216–30.
- Rückert F**, Grützmann R, Pilarsky C. (2012). Feedback within the intercellular communication and tumorigenesis in carcinomas. *PLoS One.*;7(5): e36719.
- Rustom A**, Saffrich R, Markovic I, Walther P, Gerdes H-H. (2004). Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science.* Feb 13;303(5660):1007–10.
- Samanta D**, Gilkes DM, Chaturvedi P, Xiang L, Semenza GL. (2014). Hypoxia-inducible factors are required for chemotherapy resistance of breast cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111:E5429–5438.
- Schiller C**, Diakopoulos KN, Rohwedder I, Kremmer E, von Toerne C, Ueffing M, Weidle UH, Ohno H, Weiss EH. (2012). LST1 promotes the assembly of a molecular machinery responsible for tunneling nanotube formation. *J Cell Sci.* 126:767–77.
- Schiller C**, Huber JE, Diakopoulos KN, Weiss EH. (2013). Tunneling nanotubes enable intercellular transfer of MHC class I molecules. *Hum Immunol.* 74(4) :412-6. doi: 10.1016 /j. humimm.2012.11.026.
- Shivakumar**, L., Minna, J., Sakamaki, T., Pestell, R., White, M. A. (2002). The RASSF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation. *Molec. Cell. Biol.* 22: 4309-4318.
- Sisakhtnezhad S**, Khosravi L. (2015). Emerging physiological and pathological implications of tunneling nanotubes formation between cells. *Eur J Cell Biol.* 94:429-43.
- Sit ST**, Manser E. (2011). Rho GTPases and their role in organizing the actin cytoskeleton. *J Cell Sci.* 124: 679-683.
- Spees JL**, Lee RH, Gregory CA. (2016). Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Res Ther.* 31;7(1):125.
- Takahashi S**, Kubo K, Waguri S, Yabashi A, Shin HW, Katoh Y, Nakayama K. (2012). Rab11 regulates exocytosis of recycling vesicles at the plasma membrane. *J Cell Sci.* 1; 125(Pt 17):4049-57.
- Thayanithy V**, Babatunde V, Dickson EL, Wong P, Oh S, Ke X, Barlas A, Fujisawa S, Romin Y, Moreira AL, Downey RJ, Steer CJ, Subramanian S, Manova-Todorova K, Moore MA, Lou E. (2014a). Tumor exosomes induce tunneling nanotubes in lipid raft-enriched regions of human mesothelioma cells. *Exp Cell Res.* 323:178–188.
- Thayanithy V**, Dickson EL, Steer C, Subramanian S, Lou E. (2014b). Tumor-stromal cross talk: direct cell-to-cell transfer of oncogenic microRNAs via tunneling nanotubes. *Transl Res.* 164(5):359–65.
- Théry C**, Boussac M, Véron P, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Garin J, Amigorena S. (2001). Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol.* 15;166(12):7309-18.

- Toyooka S**, Carbone M, Toyooka KO, Bocchetta M, Shivapurkar N, Minna JD, Gazdar AF. (2002). Progressive aberrant methylation of the RASSF1A gene in simian virus 40 infected human mesothelial cells. *Oncogene*. 20;21(27):4340-4.
- Veranic P**, Iokar M, Schutz GJ, Weghuber J, Wieser S, Hagerstrand H. (2008) Different types of cell-to-cell connections mediated by nanotubular structures. *Biophys J*. 95:4416-4425.
- Vignais ML**, Caicedo A, Brondello JM, Jorgensen C. (2017). Cell Connections by Tunneling Nanotubes: Effects of Mitochondrial Trafficking on Target Cell Metabolism, Homeostasis, and Response to Therapy. *Stem Cells Int*. 2017:6917941. doi: 10.1155/2017/6917941.
- Vignjevic D**, Kojima S, Aratyn Y, Danciu O, Svitkina T, Borisy GG. (2006). Role of fascin in filopodial protrusion. *J Cell Biol*. 11;174(6):863-75.
- Vlahov N**, Scrace S, Soto MS, Grawenda AM, Bradley L, Pankova D, Papaspyropoulos A, Yee KS, Buffa F, Goding CR, Timpson P, Sibson N, O'Neill E. (2015). Alternate RASSF1 Transcripts Control SRC Activity, E-Cadherin Contacts, and YAP-Mediated Invasion. *Curr Biol*. 7;25(23):3019-34. doi: 10.1016/j.cub.2015.09.072.
- Vukovic V**, Haugland HK, Nicklee T, Morrison AJ, Hedley DW. (2001). Hypoxia inducible Factor-1 α Is an Intrinsic Marker for Hypoxia in Cervical Cancer Xenografts. *Cancer Res*. 15;61(20):7394-8.
- Wang Y**, Cui J, Sun X, Zhang Y. (2011). Tunneling-nanotube development in astrocytes depends on p53 activation. *Cell Death Differ*. 18(4):732-42.
- Wang X**, Gerdes H-H. (2015). Transfer of mitochondria via tunneling nanotubes rescues apoptotic PC12 cells. *Cell Death Differ*. 22(7): 1181–91.
- Whiteside TL**. (2016) Tumor Derived Exosomes and Their Role in Cancer Progression. *Adv Clin Chem*. 2016; 74:103-41. doi: 10.1016/bs.acc.2015.12.005. Epub 2016 Apr 7. Review.
- Wiggin O**, Schroder B, Krapf D, Bamberg JR, DeLuca JG. (2017). Cofilin Regulates Nuclear Architecture through a Myosin-II Dependent Mechanotransduction Module. *Sci Rep*. 19; 7:40953. doi: 10.1038/srep40953.
- Wolf M**, Zimmermann AM, Görlich A, Gurniak CB, Sassoè-Pognetto M, Friauf E, Witke W, Rust MB. (2015). ADF/Cofilin Controls Synaptic Actin Dynamics and Regulates Synaptic Vesicle Mobilization and Exocytosis. *Cereb Cortex*. 25(9):2863-75. doi: 10.1093/cercor/bhu081. Epub 2014 Apr 25.
- Yokoi K**, Fidler IJ. (2004). Hypoxia increases resistance of human pancreatic cancer cells to apoptosis induced by gemcitabine. *Clin Cancer Res*. 10:2299–2306.
- Zhu H**, Xue C, Xu X, Guo Y, Li X, Lu J, Ju S, Wang Y, Cao Z, Gu X. (2016). Rab8a/Rab11a regulate intercellular communications between neural cells via tunneling nanotubes. *Cell Death Dis*. 22;7(12): e2523.

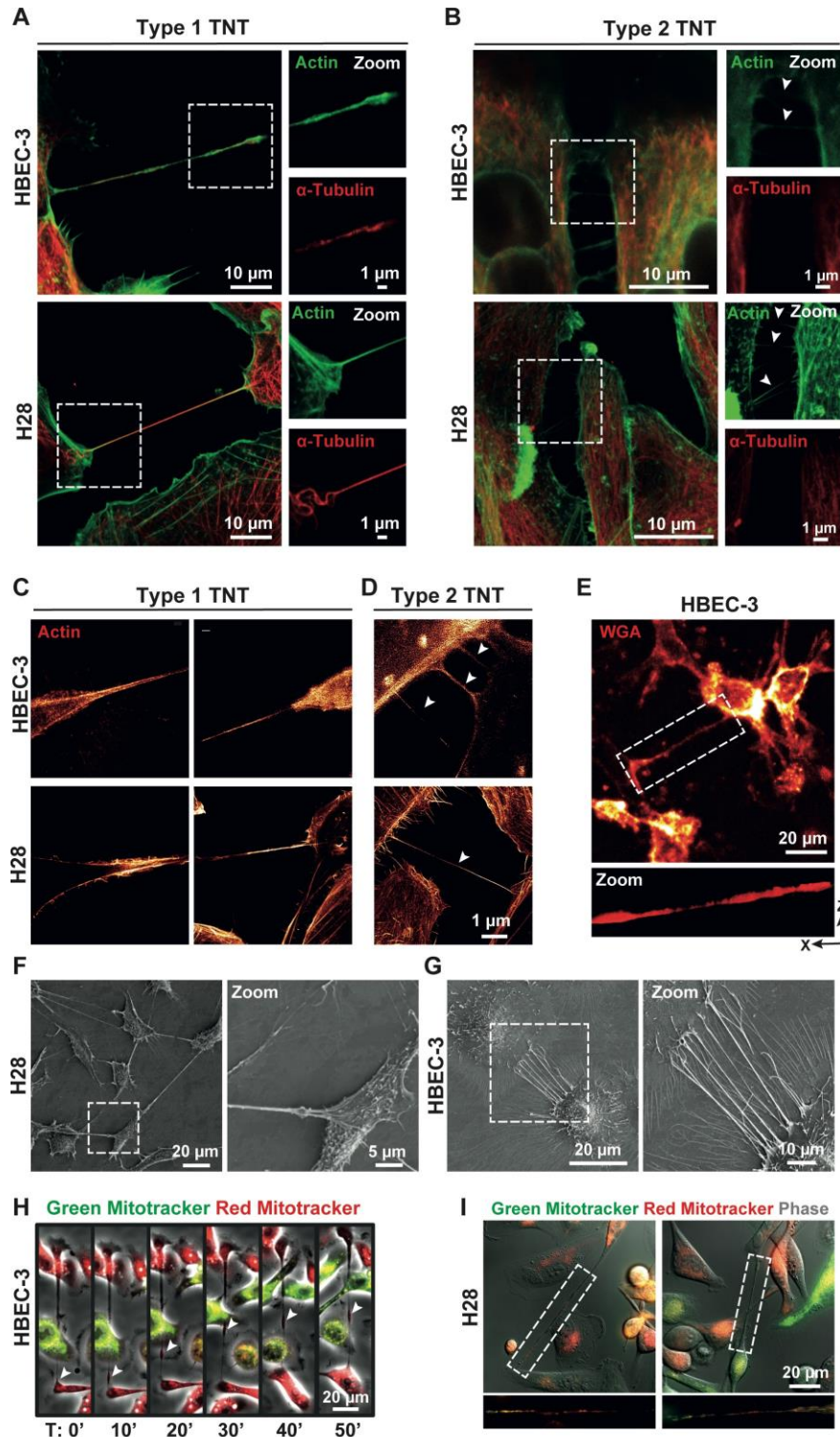


Figure 1 - Bronchial as mesothelial cells establish both TNT1 and TNT2 and transfer mitochondria to other cells along TNT1.

(A-B) Representative images of cytoskeletal elements presented in either TNT1 or TNT2. HBEC-3 and H28 cells were fixed and labelled with actin (green) and tubulin (red). Boxed regions were used for the zoom of each channel. **(C-D)** Structural analysis of TNTs subtypes in HBEC-3 and H28 cells through deconvoluted gCW STED nanoscopy. The cells were fixed and stained with Phalloidin for actin filaments. Arrowheads indicate the TNT2. **(E)** Representative image of TNT between HBEC-3 cells cultivated in 3D collagen matrix along with an optical sections reconstructed in three dimensions. **(F-G)** Representative image of TNT between H28 **(F)** and HBEC-3 **(G)** using scanning electron microscopy. **(H-I)** Montage of MitoTracker dye movement (arrow heads) along TNT in live HBEC-3 **(H)** and H28 **(I)** cells using time-lapse fluorescence video microscopy. Cells were imaged every min for 1 h. See *Materials and Methods* for protocol details.

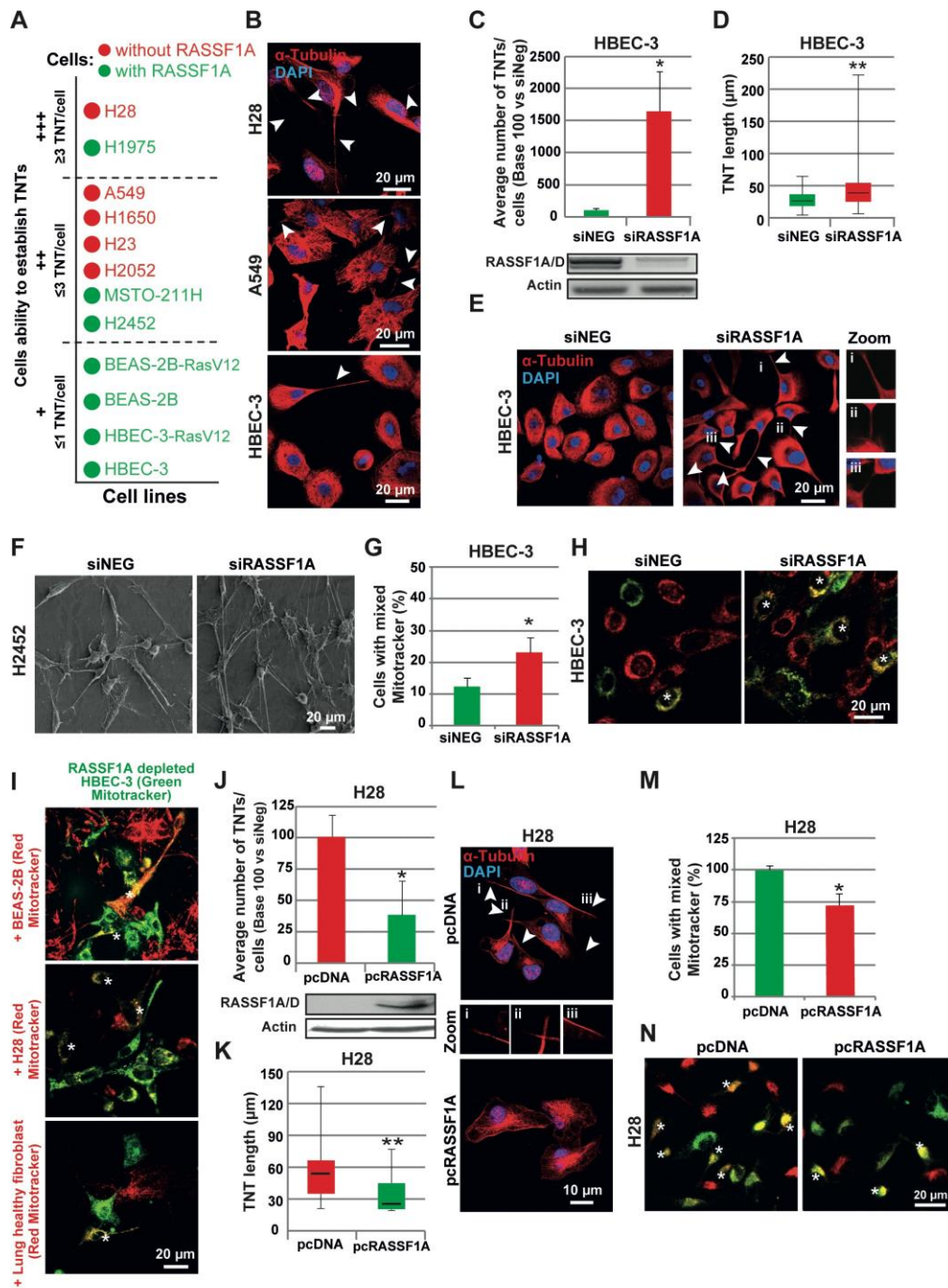


Figure 2 - RASSF1A expression decreases overall TNT number and length.

(A) Quantitative description of the average number of TNTs established for each cell line. TNT's number was classified as low (+), moderate (++) or high (+++) if there were observed ≤ 1 , $1 \leq 3$ or > 3 TNT per cell respectively (B) Representative images of TNT in HBEC-3, A549 and H28 cell lines fixed and stained with tubulin. (C) Quantification of the TNT number and (D) length (μm) in HBEC-3 cell line along with (E) representative images. The HBEC-3 cells were treated with control or RASSF1A RNAi as indicated. Western blot showing the efficiency of RASSF1A depletion in HBEC-3 cells 72h after RNAi treatment. Arrowheads indicate the TNTs. Roman numerals mark the examples of the TNT in the zoomed images. (F) Representative image of TNT between H2452 expressing or not (siRASSF1A) RASSF1A using scanning electron microscopy (G) Quantification and (H) representative images of HBEC-3 cells contained both green and red MitoTracker dyes after RNAi treatment as indicated. (I) Representative images of the double labeled MitoTracker dyes in co-culture of RASSF1A-depleted HBEC-3 cells with BEAS-2B, H28 or healthy lung fibroblast cells (J) Quantification of the TNT number and (K) length (μm) in H28 cell line along with (L) representative images. The H28 cells were transfected with construct encoding wild-type RASSF1A as indicated. The TNTs are show with arrowheads. Western blot showing the efficiency of RASSF1A transfection in H28 cells 24h after treatment. (M) Quantification and (N) representative images of H28 cells contained both green and red MitoTracker dyes after pcDNA transfection as indicated. Values are the mean \pm SEM of three independent experiments in almost 200 cells. Statistical significance was calculated and p value are indicated by asterisks: * $p < 0,05$. See *Materials and Methods* for quantification details of each experiments.

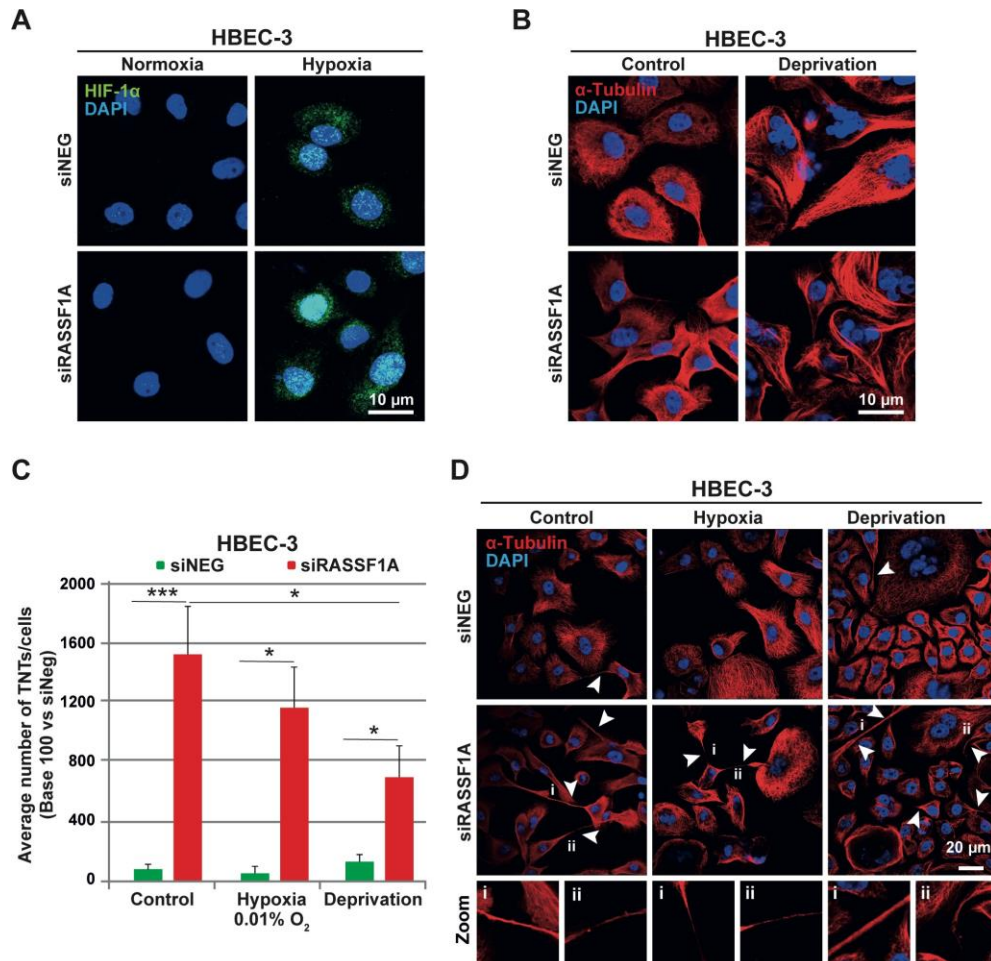


Figure 3 - TNTs induced by RASSF1A depletion still occurs in either hypoxic or serum starved conditions.

(A) Representative images of HIF-1α in HBEC-3 cells incubated for 24h in normoxic or hypoxic (0.1% O₂) condition after transfection with either control or RASSF1A RNAi. (B) Representative images of the increased number of multi-nucleus HBEC-3 cells, as the result of serum deprivation compared to the cells incubated in normal condition with intact nuclei. (C) Quantification of TNT number in control and RASSF1A depleted HBEC-3 cells after incubation in either hypoxic or serum starved conditions and (D) Representative images. The TNTs are show with arrowheads. Roman numerals mark the examples of the TNT in the zoomed images. Values are the mean ± SEM of three independent experiments in approximately 200 cells. Statistical significance was calculated and p value are indicated by asterisks: *p<0.05, **p<0.01; ***<0.001.

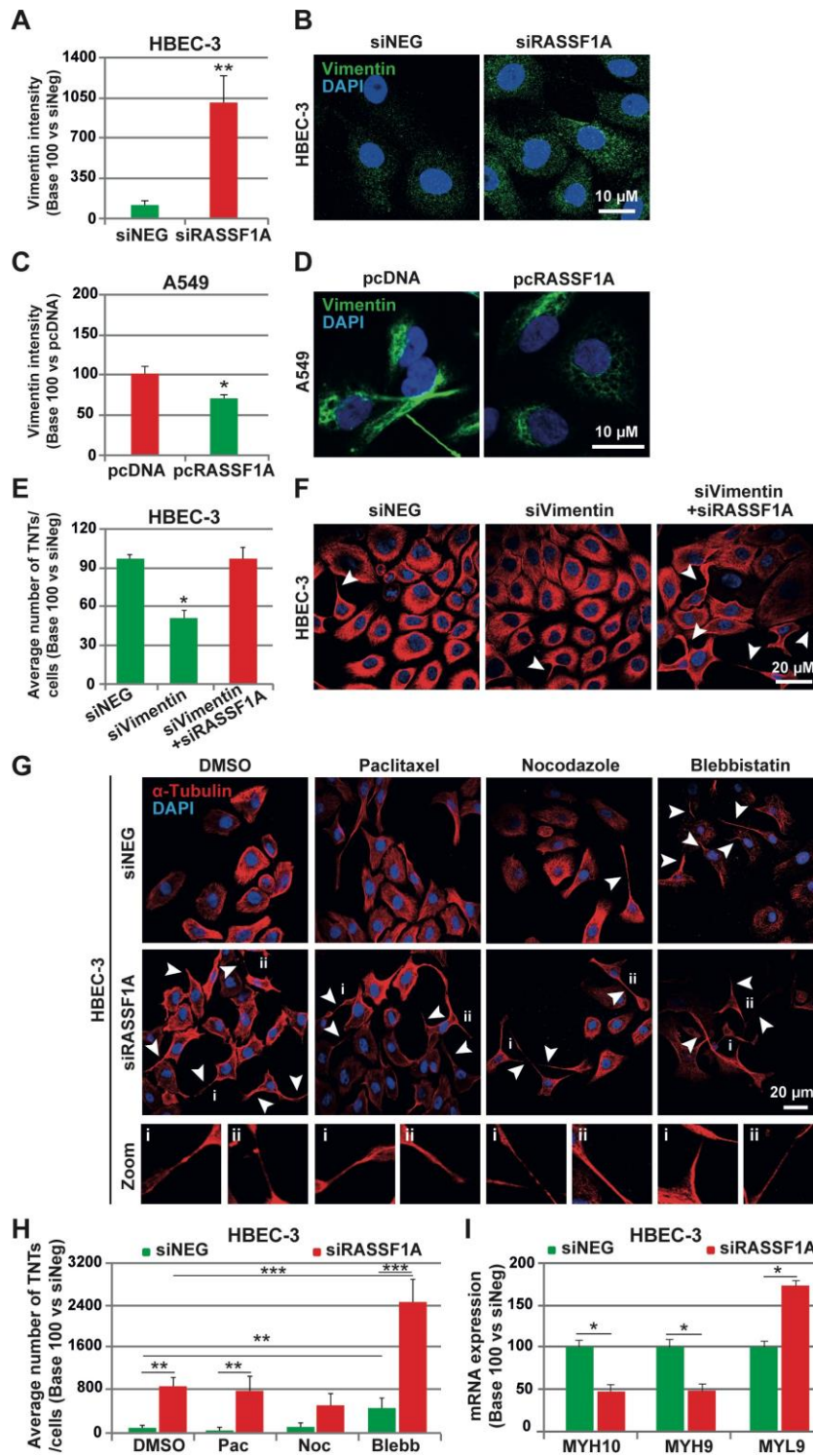


Figure 4 - Vimentin and actomyosin are implicated in TNT formation after RASSF1A depletion.

(A) Quantification and (B) representative images of Vimentin expression in HBEC-3 cells transfected with siNEG or siRASSF1A. (C) Quantification and (D) representative images of Vimentin expression in A549 cells transfected with pcDNA control or RASSF1A. (E) Quantification and (F) representative images of TNT formation in HBEC-3 cells transfected with either siVimentin alone or in combination with siRASSF1A. (G) Representative images and (H) quantification of TNT number in control and RASSF1A depleted HBEC-3 cells after incubation with paclitaxel (10 nM), nocodazole (10 μ M) or blebbistatin (5 μ M) for 24 h before fixation and staining with α -tubulin. The TNTs are shown with arrowheads. Roman numerals mark the examples of the TNT in the zoomed images. (I) The mRNA expression was assayed using RT2 ProfilerTM Cell motility PCR Array (Qiagen). β_2 -microglobulin was used as an internal control. Values are the mean \pm SEM of three independent experiments in almost 200 cells. Statistical significance was calculated and p value are indicated by asterisks: * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001.

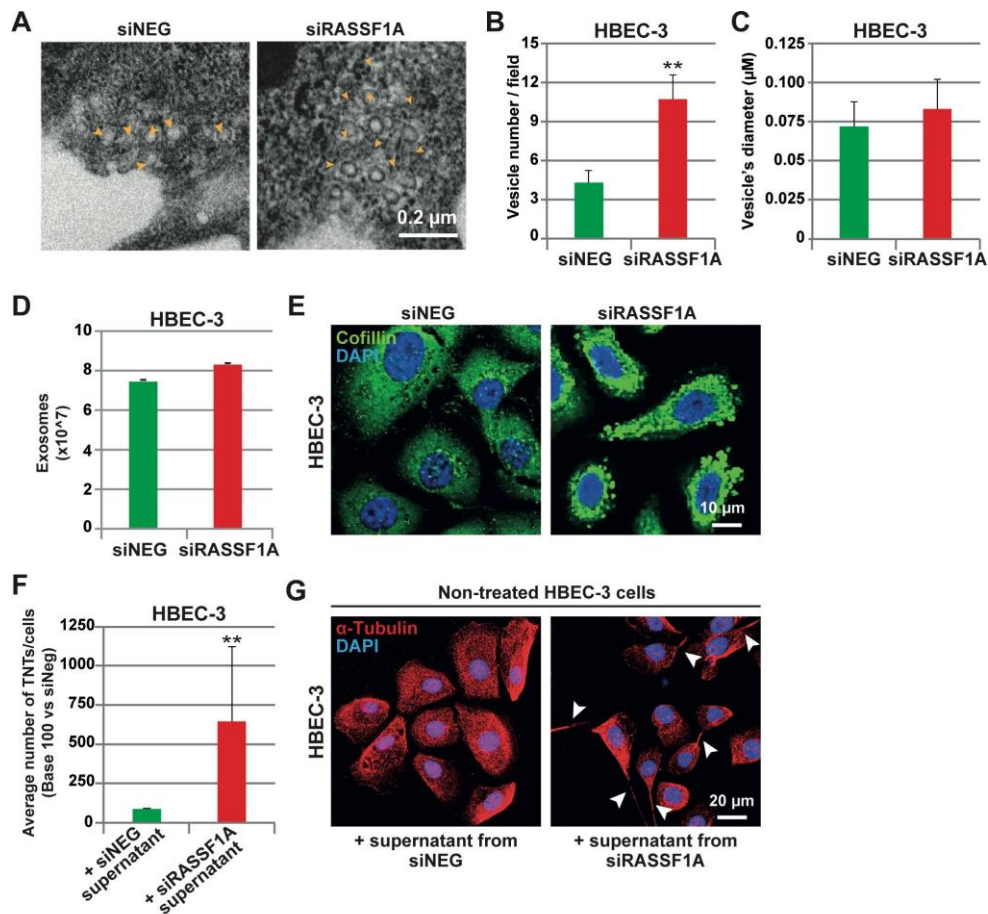


Figure 5 - Exosomes released by RASSF1A depleted cells affect TNT formation.

(A) Representative images and (B-C) quantification of cytoplasmic vesicles number and diameter (μm) by electron microscopy in HBEC-3 cells after transfection with control or RASSF1A RNAi. The vesicles are show with yellow arrowheads. (D) Quantification of the exosome release in control and RASSF1A knockdown HBEC-3 cells. (E) Representative images of cofilin staining in cells transfected with RNAi as indicated. (F) Quantification and (G) representative images of the TNT formation in non-treated HBEC-3 cells incubated with supernatant obtained from siNEG or siRASSF1A treated cells during 24h. The TNTs are show with arrowheads. Values are the mean \pm SEM of three independent experiments in approximately 200 cells. Statistical significance was calculated and p value are indicated by asterisks: ** $p < 0.01$.

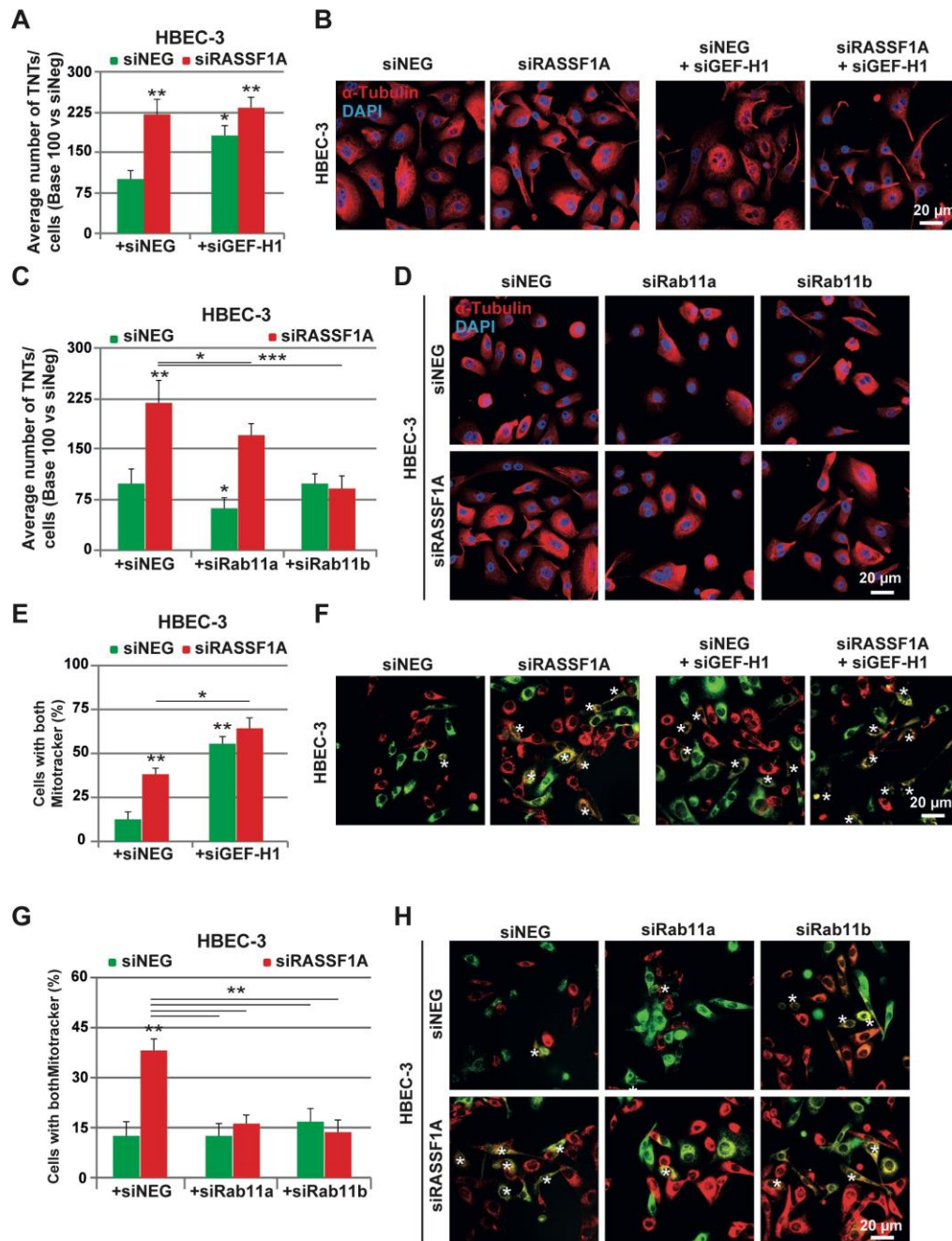


Figure 6 - TNTs formation in the absence of RASSF1A is dependent on GEFH1 inactivation and Rab11 activation.

(A) Quantification and (B) representative images of the TNT formation in HBEC-3 cells transfected with siNEG or siRASSF1A in combination with siGEFH1. (C) Quantification and (D) representative images of the TNT formation in HBEC-3 cells transfected with siNEG or siRASSF1A in combination with either siRab11a or siRab11b. (E and G) Quantification and (F and H) representative images of HBEC-3 cells labeled with both green and red MitoTracker dyes after RNAi treatment as indicated. Values are the mean \pm SEM of three independent experiments in at least 200 cells. Statistical significance was determined by Student's t-test and p value are indicated by asterisks: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. The TNTs are shown with arrowheads.

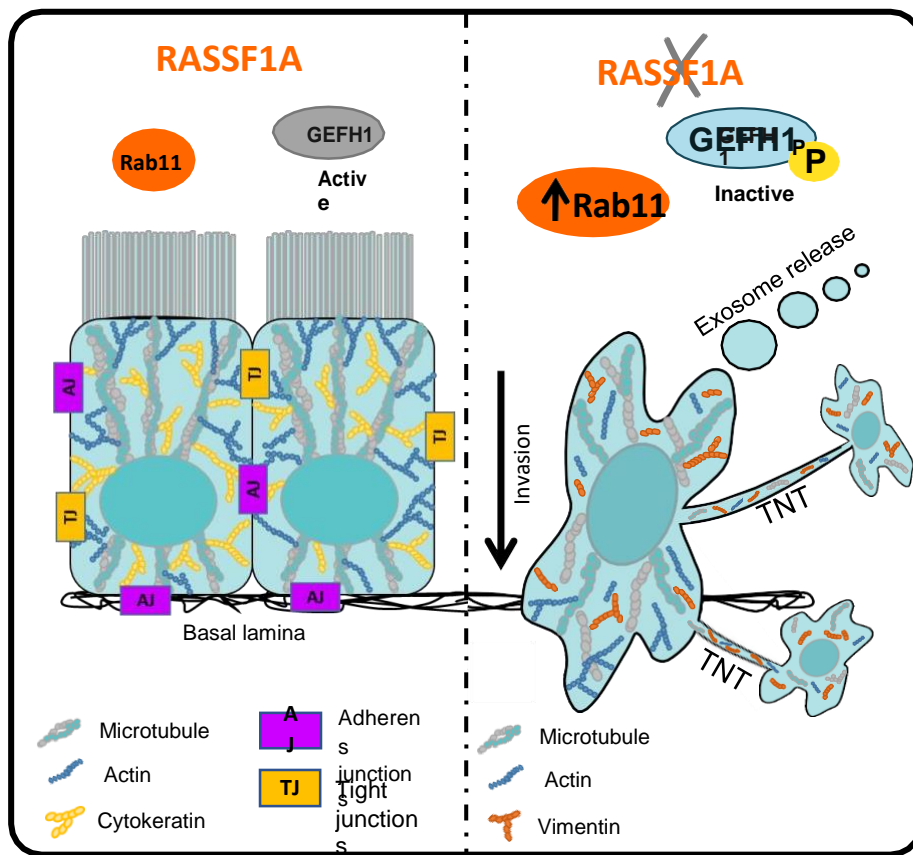


Figure 7 – RASSF1A prevents tunneling nanotube formation between cells through GEFH1/Rab11 pathway control.

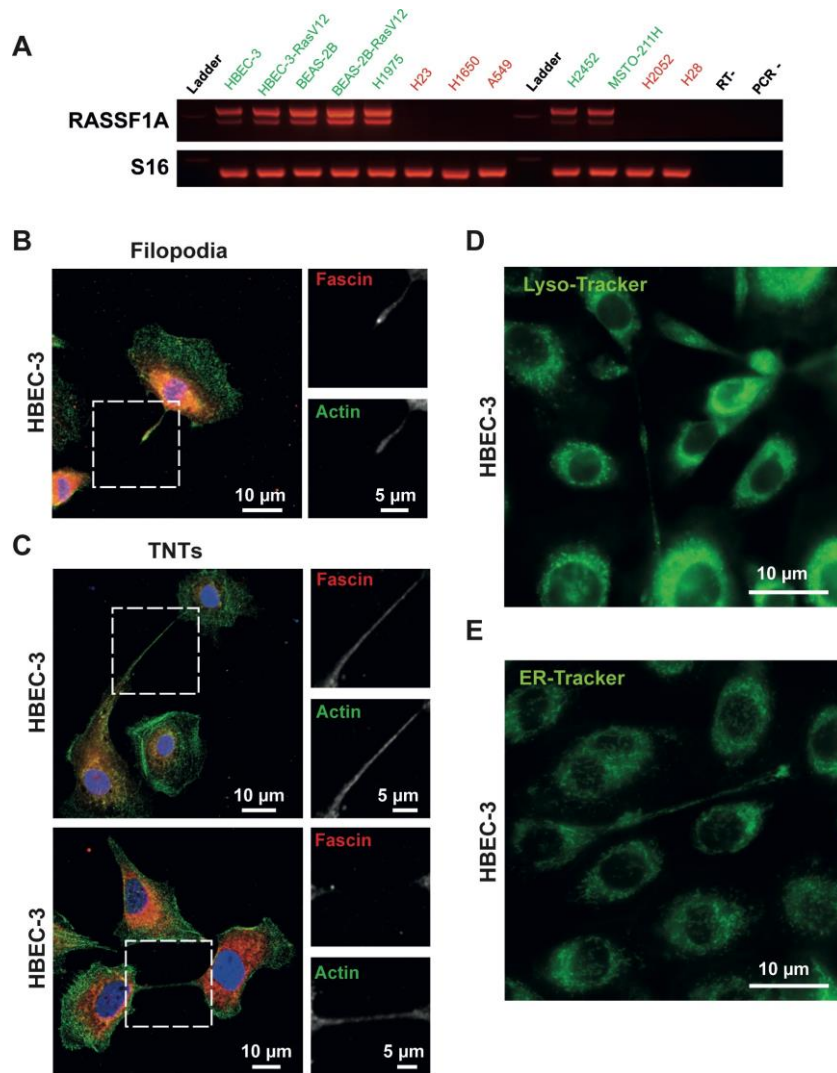


Figure Supplementary 1 – (A) The panel of RASSF1A expression in all the cell lines used in this work by RT-PCR. **(B-C)** Representative images of fascin co-staining along actin in both filopodia and TNTs structure. **(D-E)** Representative images of (D) Lysosome (LysoTracker) and (E) endoplasmic reticulum (ER-Tracker) along TNT in HBEC-3 epithelial cells.

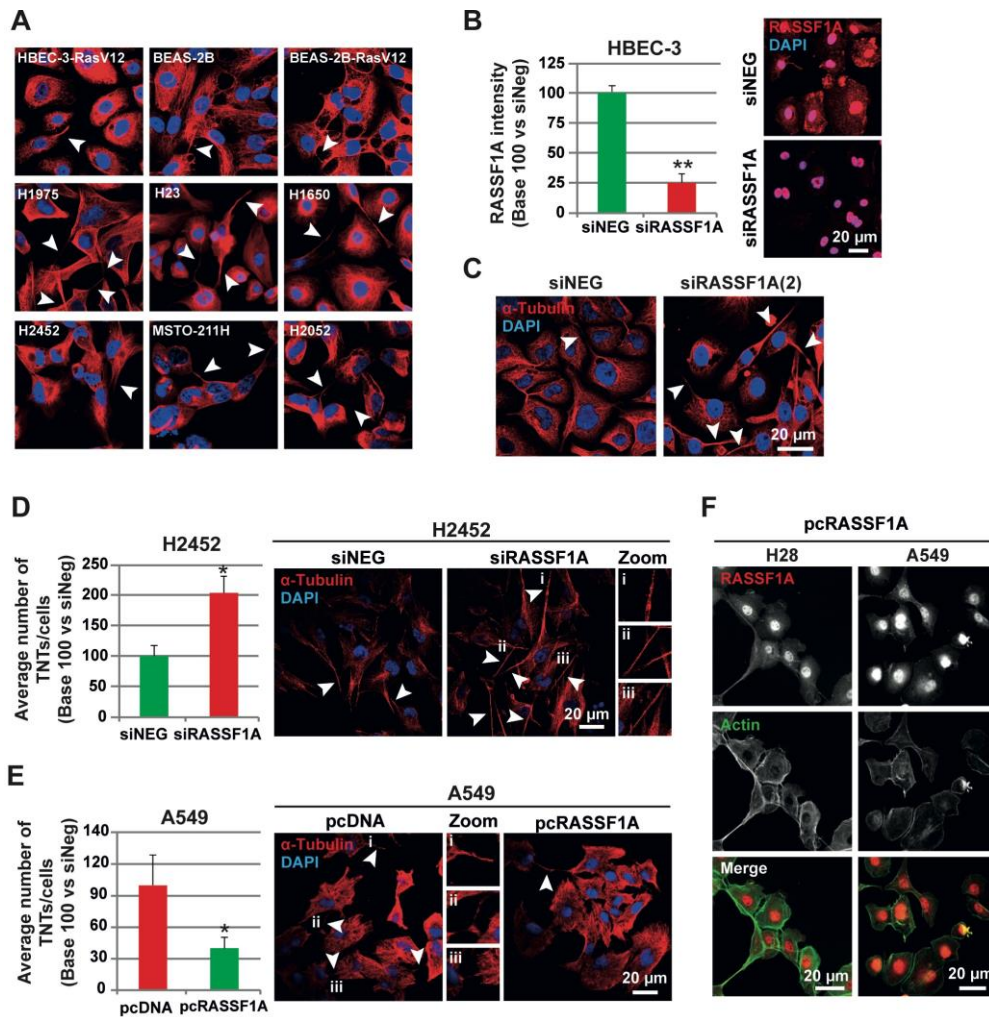


Figure Supplementary 2 - RASSF1A expression modulates overall TNT number.

(A) Representative images of TNT-1 in the cell lines, as indicated (B) immunofluorescence quantification and images indicating a reduction of RASSF1A expression after knockdown (C) Representative image of TNT-1 after RASSF1A depletion by siRASSF1A(2) (D) Quantification of the TNT number along with representative images of H2452 cells transfected with either control or RASSF1A RNAi as indicated. (E) Quantification of the TNT number in A549 cell line along with representative images. The H28 cells were transfected with construct encoding wild-type RASSF1A as indicated. Arrowheads indicate the TNTs. Roman numerals mark the examples of the TNT in the zoomed images. (F) Representative image of RASSF1A and actin immunostaining showing the efficiency of pcRASSF1A transfection in H28 and A549 cells with methylated RASSF1A. Statistical significance was determined by Student's t-test and p value are indicated by asterisks: * $p < 0.05$.

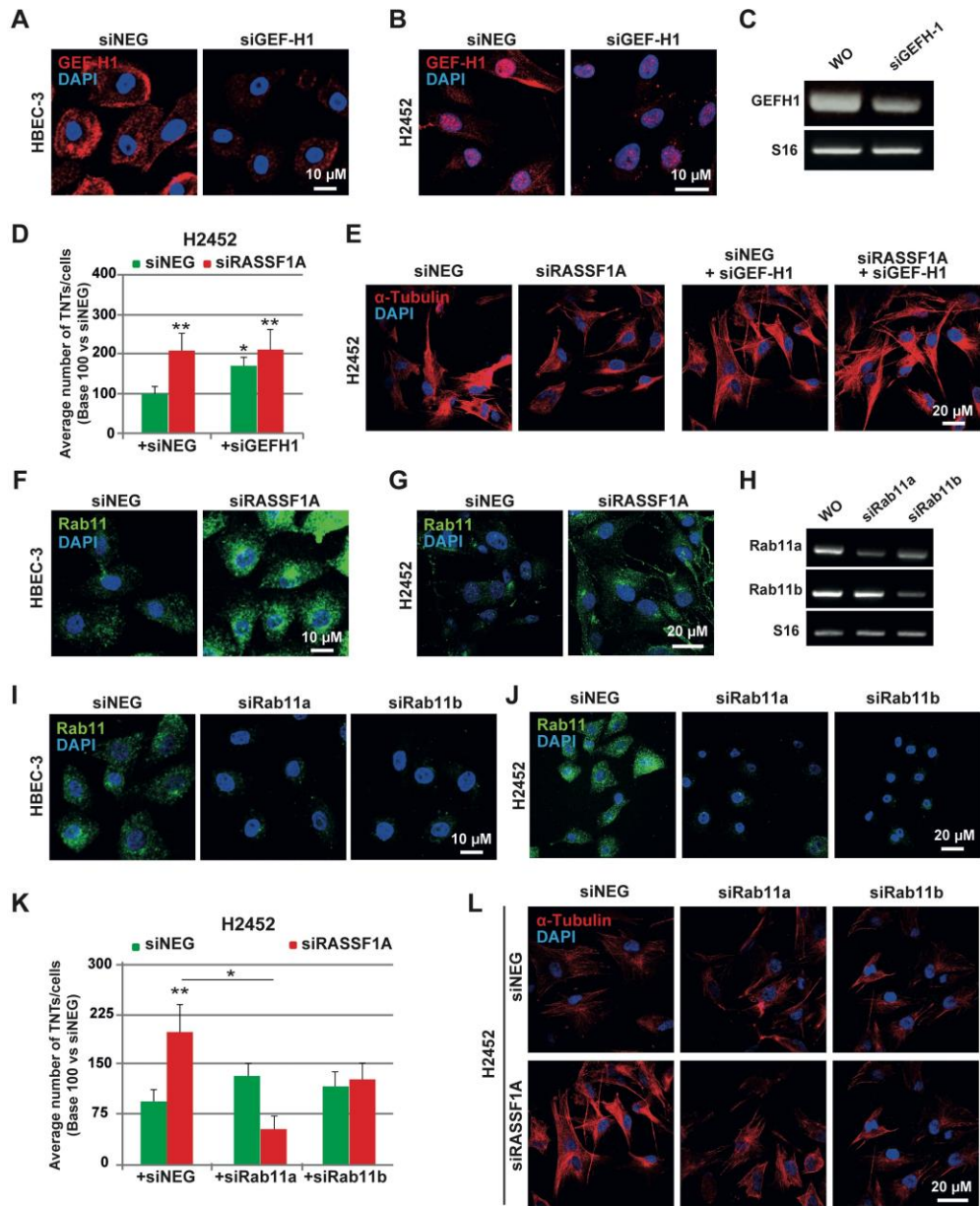


Figure Supplementary 3 - TNTs formation in the absence of RASSF1A is dependent on GEFH1 inactivation and Rab11 activation.

(A-B) Immunofluorescence and (C) RT-PCR images showing the efficiency of GEFH1 depletion in cells 72h after RNAi treatment. (D) Quantification and (E) representative images of the TNT formation in H2452 cells transfected with siNEG or siRASSF1A in combination with siGEFH1. (F-G) Immunofluorescence images showing the increase of Rab11 expression after RASSF1A depletion. (H) RT-PCR and (I-J) Immunofluorescence images showing the efficiency of Rab11 depletion in cells 72h after RNAi treatment.

(K) Quantification and (L) representative images of the TNT formation in H2452 cells transfected with siNEG or siRASSF1A in combination with either siRab11a or siRab11b. Values are the mean \pm SEM of three independent experiments. Statistical significance was determined by Student's t-test and p value are indicated by asterisks: *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001. The TNTs are show with arrowheads.

CHAPITRE 3 - DISCUSSION GÉNÉRALE

En apportant la première preuve de l'implication de RASSF1A dans la communication entre cellules tumorales et/ou cellules du microenvironnement, via les TnTs, et la probable adaptation de la tumeur à son microenvironnement, cet article conforte le rôle prêté à RASSF1A de suppresseur de tumeur et de métastase. L'inactivation de son expression par hyperméthylation du promoteur de son gène constitue de fait un biomarqueur des cancers.

1. La perte d'expression de RASSF1A : intérêts et place en clinique.

1.1. Les mécanismes moléculaires de l'inactivation de *RASSF1A* :

La perte d'expression de RASSF1A par les cellules cancéreuses est un événement précoce et fréquent dans de nombreux cancers (1). Elle est due à la délétion du bras court du chromosome 3 (comprenant le locus du gène *RASSF1* (3p21.3) (2)) et à la méthylation *de novo* des îlots CpG de la région du premier promoteur de *RASSF1* de l'allèle restante (2). Dans la pathogénie du cancer du poumon, la délétion du bras court du chromosome 3, est également un événement de survenue précoce, puisqu'elle est retrouvée à la fois dans les lésions préneoplasiques et néoplasiques infiltrantes, avec des fréquences de 78% et 96% respectivement (3).

Les mutations inactivatrices du gène *RASSF1A* sont quant à elles rares (4). En revanche, certains microARNs, tels les miR-602, miR-181a/b et miR-214-3p, peuvent également inhiber l'expression de RASSF1A dans différents cancers (5–7).

1.2. L'hyperméthylation du promoteur du gène *RASSF1*, un biomarqueur des cancers à différents égards :

Si la méthylation *de novo* des îlots CpG de la région du premier promoteur du gène *RASSF1* est fréquemment retrouvée dans de nombreux cancers, elle l'est rarement dans les tissus normaux ; elle constitue de fait, un biomarqueur diagnostique des cancers (1,8).

Dans certains cancers, tel le cancer bronchique non à petites cellules, la méthylation du promoteur de *RASSF1* constitue également un biomarqueur pronostique et prédictif. En effet, la méthylation du promoteur de *RASSF1* est associée à des caractéristiques clinico-pathologiques d'agressivité, comme le caractère peu différencié de la tumeur, le stade avancé, la survenue de récurrence locale ou de métastase à distance et la faible survie globale et sans progression, définissant un sous-groupe plus agressif susceptible de progresser vers un stade métastatique (8,9). Enfin, la méthylation du promoteur de *RASSF1* a été rapportée comme prédisant la réponse aux chimiothérapies à base de platine, notamment dans des cohortes de patients atteints de carcinome bronchique non à petites cellules (9–11).

1.3. Intérêt clinique de l'identification de la méthylation du promoteur de *RASSF1* :

Malgré le développement de nouvelles thérapies, le cancer du poumon représente encore un problème majeur de santé publique, avec une mortalité qui reste élevée, du fait que la majorité des patients (environ 75%) présente au moment du diagnostic, un stade localement avancé ou métastatique, non opérable. La chirurgie étant le traitement le plus efficace, la détection des stades précoces est indispensable pour améliorer la mortalité de la maladie (12). C'est pourquoi la communauté scientifique discute de la pertinence du dépistage organisé du cancer du poumon. La

tomodensitométrie à faible dose chez des personnes fortement exposées au tabac, ou l'ayant été, est l'un des tests de dépistage envisagé, qui a démontré son efficacité en réduisant la mortalité des patients dépistés (13). Cependant, la sensibilité et la spécificité de ce test de dépistage, ne semble pas optimale, puisqu'il persiste un risque de surdiagnostic, de faux positif (conduisant à des procédures diagnostiques invasives) et que les effets d'expositions répétées à des intervalles réguliers d'un tel test de dépistage ne sont pas connus. Pour ces raisons, l'intérêt de la tomodensitométrie à faible dose comme test de dépistage organisé du cancer du poumon ne fait pas l'objet d'un consensus au niveau international, et particulièrement en Europe.

Ainsi, l'identification de nouveaux biomarqueurs, telle la méthylation du promoteur de *RASSF1*, pourrait permettre non seulement de détecter ces lésions plus précocement, mais aussi d'adapter la prise en charge de ces lésions susceptibles d'évoluer vers une maladie métastatique.

Dans le cadre d'un dépistage de lésions débutantes, chez des personnes fortement exposées au tabac ou l'ayant été, pour lesquelles l'imagerie peu spécifique est prise à défaut, et afin d'augmenter la proportion de patients opérables au moment du diagnostic, la recherche de la méthylation du promoteur de *RASSF1* pourrait se faire à partir d'un prélèvement sanguin (biopsie liquide). Certaines études ont en effet démontré une association entre la détection de la méthylation du promoteur de *RASSF1* dans le sang et depuis la pièce de carcinome bronchique non à petites cellules, avec une sensibilité et spécificité élevée, respectivement de 85,7% et 100% (14). Ce test présenterait une bonne sensibilité et une spécificité, un coût acceptable, peut être répété à intervalle régulier en toute innocuité, et s'applique à une pathologie grave et fréquente, pouvant faire l'objet d'un traitement efficace.

En termes d'intérêt pronostic et théranostic, l'identification de la méthylation du promoteur de *RASSF1* sur matériel biopsique, chez les patients de stade précoce, s'intégrant à la démarche diagnostique et théranostique préexistante, permettrait d'identifier un sous-groupe de patients de mauvais pronostic et d'adapter la prise en charge en discutant une chimiothérapie adjuvante. Dans ce sens, de Fraipont *et al.* (9) rapporte dans une cohorte de 528 patients atteints de carcinome bronchique non à petites cellules de stade précoce, une meilleure réponse au paclitaxel-carboplatine comparé au gemcitabine-cisplatine, chez les patients méthylés pour le promoteur de *RASSF1*. Cependant, s'agissant d'une étude rétrospective, des études prospectives (avec comme critère de jugement principal la survie globale) apparaissent nécessaire afin d'évaluer l'efficacité du doublet paclitaxel-carboplatine chez les patients atteints d'une tumeur présentant une hyperméthylation du promoteur de *RASSF1*, en comparaison au vinorelbine-cisplatine, traitement actuel de référence en adjuvant dans les stades précoces possédant le meilleur niveau de preuve (15) ; mais également en comparaison aux autres molécules du doublet à base de platine (étoposide, gemcitabine) encore largement utilisées en pratique, du fait de leurs toxicités moindres, permettant par la suite l'inclusion des patients dans des essais thérapeutiques novateurs, dont le bénéfice attendu serait supérieur.

1.4. Faisabilité de la recherche « en routine » du statut de méthylation du promoteur du gène *RASSF1* :

La recherche du statut de méthylation du promoteur du gène *RASSF1* peut aisément être réalisée en routine dans les laboratoires par PCR spécifique de méthylation (MS-PCR), puisqu'il s'agit d'une technique peu onéreuse, reproductible, rapide et facile à mettre en œuvre (ne nécessitant pas d'équipements lourds). Toutefois, cette technique présente plusieurs limites.

En effet, alors que de nombreux travaux de la littérature confèrent une fonction de biomarqueur des cancers à la présence d'une méthylation du promoteur de *RASSF1*, certaines études ne retrouvent pas d'association significative entre cancer et méthylation du promoteur de *RASSF1* (16–19). Or, dans ces études, i) le statut "méthylé" ou "non méthylé" du promoteur de *RASSF1*, déterminé par MS-PCR, ne s'intéressait pas strictement aux mêmes îlots CpG puisque le couple d'amorce utilisé pour amplifier la séquence méthylée différait de celui utilisé dans les études rapportant un impact pronostic et/ou prédictif de la perte d'expression de *RASSF1A* et ii) l'appréciation de la présence de la méthylation n'est que qualitative, évaluée subjectivement sur gel d'agarose, sans contrôle de la réelle perte d'expression de *RASSF1A* (8,20). Ces deux points constituent des biais majeurs.

Afin d'envisager la recherche en routine du statut de méthylation du promoteur du gène *RASSF1*, il est donc crucial i) de clarifier les îlots CpG du promoteur de *RASSF1* responsables des caractéristiques clinico-pathologiques observées, d'autant plus que le promoteur de *RASSF1* est relativement grand, et comporte de nombreux îlots CpG (8), et ii) d'harmoniser la méthodologie et le choix des techniques à mettre en œuvre. Il convient ainsi d'envisager l'utilisation de technique plus spécifique et précise que la MS-PCR, tel le pyroséquençage, qui représente une technique de choix, permettant de quantifier cette fois la méthylation (20), et ayant fait ses preuves dans une précédente étude s'intéressant à la méthylation du promoteur de *RASSF1* dans le cancer du poumon (9). Dans un avenir proche, les séquenceurs haut débit de 3^{ème} génération pourront également nous permettre des analyses robustes du méthylome.

En pratique à Caen, le pyroséquençage apparaît à ce jour, être la méthode appropriée, d'autant plus qu'il s'agit d'une méthode maîtrisée et utilisée en routine dans le service d'Anatomie et Cytologie Pathologique du CHU, pour la recherche de

méthylation du promoteur de *MGMT*, chez les patients de plus de 55 ans porteurs d'un glioblastome. Sa mise au point et sa mise en place en pratique de routine, à la fois sur matériel biopsique (bloc de paraffine) et sur prélèvement sanguin, paraît relativement simple.

1.5. Pourquoi la méthylation du promoteur de *RASSF1* n'est pas déjà utilisée en routine ?

La méthylation du promoteur de *RASSF1* n'étant pas exclusive vis à vis des principales altérations moléculaires retrouvées dans le CBNPC (8), son identification n'a de sens qu'en parallèle du profilage moléculaire (déjà effectué dans les stades métastatiques).

En effet, devant l'efficacité relative des chimiothérapies adjuvantes (ne permettant qu'une amélioration de 5% de la survie globale à 5 ans) et le succès des thérapies ciblées et de l'immunothérapie dans les stades métastatiques, plusieurs études évaluent l'intérêt de telles thérapies en adjuvant dans les stades précoces (21).

Ainsi, intégrer l'identification de la méthylation du promoteur de *RASSF1* au profilage moléculaire dans les stades précoces, permettrait de balayer l'ensemble des altérations moléculaires et de proposer une thérapie adjuvante adaptée (dont l'efficacité reste à prouver en adjuvant).

Cependant, cette approche soulève en pratique la problématique de la quantité de matériel disponible pour effectuer ce profilage moléculaire, d'autant plus vraie dans ces lésions précoces difficilement accessibles. La biopsie liquide (prélèvement sanguin), déjà indiquée dans la détection des mutations de résistance de l'EGFR dans les stades métastatiques (15), pourrait représenter une bonne alternative à la biopsie tissulaire (22). Ainsi, elle permettrait de réaliser le profilage moléculaire de la tumeur en recherchant les principales mutations oncogéniques "drivers", des facteurs

prédictifs de réponse à l'immunothérapie (notamment la charge mutationnelle), mais également d'évaluer ou de conforter la pertinence de nouveaux biomarqueurs, et notamment de la méthylation du promoteur de *RASSF1*.

1.6. Quelles cibles thérapeutiques faut-il envisager chez les patients porteurs d'une tumeur avec hyperméthylation du promoteur de *RASSF1* ?

La perte d'expression de *RASSF1A* est responsable de l'altération de deux voies de signalisation : la voie des RhoGTPases et la voie Hippo, pour lesquelles des cibles thérapeutiques ont déjà été identifiées, offrant une perspective thérapeutique pour les patients atteints de CBNPC méthylé pour le promoteur de *RASSF1*.

Parmi ces cibles thérapeutiques, des inhibiteurs pharmacologiques de ROCK, l'un des effecteurs majeurs de RhoA, sont actuellement développés et testés chez des patients atteints de pathologies variées (23) ; des inhibiteurs de YAP sont également en développement (24,25).

Cependant, aucun médicament pouvant endiguer les effets de l'altération concomitante de ces deux voies de signalisation n'a été identifié. C'est pourquoi, nous recherchons une nouvelle cible thérapeutique, notamment parmi les acteurs de la communication intercellulaire, puisque les voies de signalisation Hippo et des Rho GTPases contribuent à réguler le trafic cellulaire/vésiculaire (26,27). Rechercher une cible thérapeutique parmi les acteurs de cette communication et notamment des TnTs constitue une approche originale et innovante ; l'implication de la communication intercellulaire dans la carcinogenèse étant encore peu évaluée.

Après avoir discuté de la place et de l'intérêt en pratique clinique de l'hyperméthylation du promoteur de *RASSF1* comme biomarqueur des cancers, à

visée diagnostique, pronostique et théranostique, nous allons discuter de l'intérêt de l'identification des TnTs dans les cancers, indépendamment de l'expression de RASSF1A.

2. Tunneling nanotubes : vers une utilité en clinique ?

2.1. Implication des TnTs dans la carcinogenèse :

Bien que la communication intercellulaire via les TnTs ne soit pas spécifique aux cellules cancéreuses, le fait qu'ils soient retrouvés en nombre augmenté dans ces dernières, plaide en faveur de leur implication dans la carcinogenèse. En effet, la formation des TnTs est favorisée par un environnement hostile (inflammation, hypoxie...), permettant à la cellule tumorale, en adressant différents signaux aux cellules avoisinantes, de modifier son environnement de prime abord hostile afin de le rendre plus propice à la formation d'une niche tumorale (28,29).

Plusieurs types de signaux/cargos transitent par les TnTs (30). Les cellules du microenvironnement tumoral et notamment les cellules souches mésenchymateuses, transfèrent par exemple, des mitochondries aux cellules cancéreuses, via ces TnTs. Ce transfert de mitochondries aux cellules tumorales, leur permettent de développer une plasticité métabolique, décrite comme une des caractéristiques des tumeurs, afin d'acquérir des propriétés de migration, de prolifération et de résistance au traitement, notamment au cisplatine et au paclitaxel (31,32). Autre exemple : le transfert horizontal, via les TnTs, de protéines KRAS mutées entre des cellules de cancer colorectale *KRAS* mutées et sauvages. Ce second type d'échange via les TnTs contribuerait à l'hétérogénéité tumorale observée vis à vis du mutant KRAS dans les cellules receveuses comportant un gène *KRAS* endogène sauvage et serait responsable de l'acquisition d'un phénotype invasif de ces cellules receveuses (33).

L'ensemble de ces données rapporte l'implication des TnTs dans la carcinogenèse, indépendamment de l'expression de RASSF1A et supporte le concept que la présence de TnTs dans une tumeur pourrait avoir une valeur pronostique péjorative, et ainsi constituer une caractéristique clinico-pathologique d'agressivité (au même titre que le caractère peu différencié d'une tumeur).

2.2. Identification de marqueurs de TnTs : où en sommes-nous ?

Les TnTs ont été rapportés *in vitro*, *in vivo* et *ex vivo*, notamment dans des prélèvements tumoraux de patients atteints de mésothéliome pleural malin (MPM) et d'adénocarcinome (34), mais leur identification reste fastidieuse, reposant principalement sur l'identification visuelle de caractéristiques morphologique et/ou fonctionnelle (par la mise en évidence d'un transfert de cargo intercellulaire). La difficulté dans leur identification réside dans le fait i) qu'il s'agisse de structure fragile, sensible à la lumière, au stress oxydatif et à la fixation chimique (35) et ii) qu'aucun marqueur spécifique et universel n'ait encore été rapporté, s'expliquant par l'hétérogénéité de ces structures, révélée par le nombre croissant de publications sur le sujet, dans lesquelles la plupart des candidats moléculaires étudiés était probablement plus spécifique du type cellulaire que des TnTs (36).

Cependant, la description de protéines retrouvées dans plusieurs type cellulaire et impliquées dans la formation des TnTs, plaide en faveur de leur spécificité envers les TnTs. Ainsi, l'identification de plusieurs protéines, constituant une signature moléculaire, témoignant de la présence des TnTs, apparaît plus appropriée. Parmi ces protéines, deux d'entre elles ont retenu notre attention : la connexine 43 et la vimentine.

La connexine 43, un marqueur de jonction communicante, a plus récemment été décrite comme impliquée dans la communication intercellulaire via les TnTs et

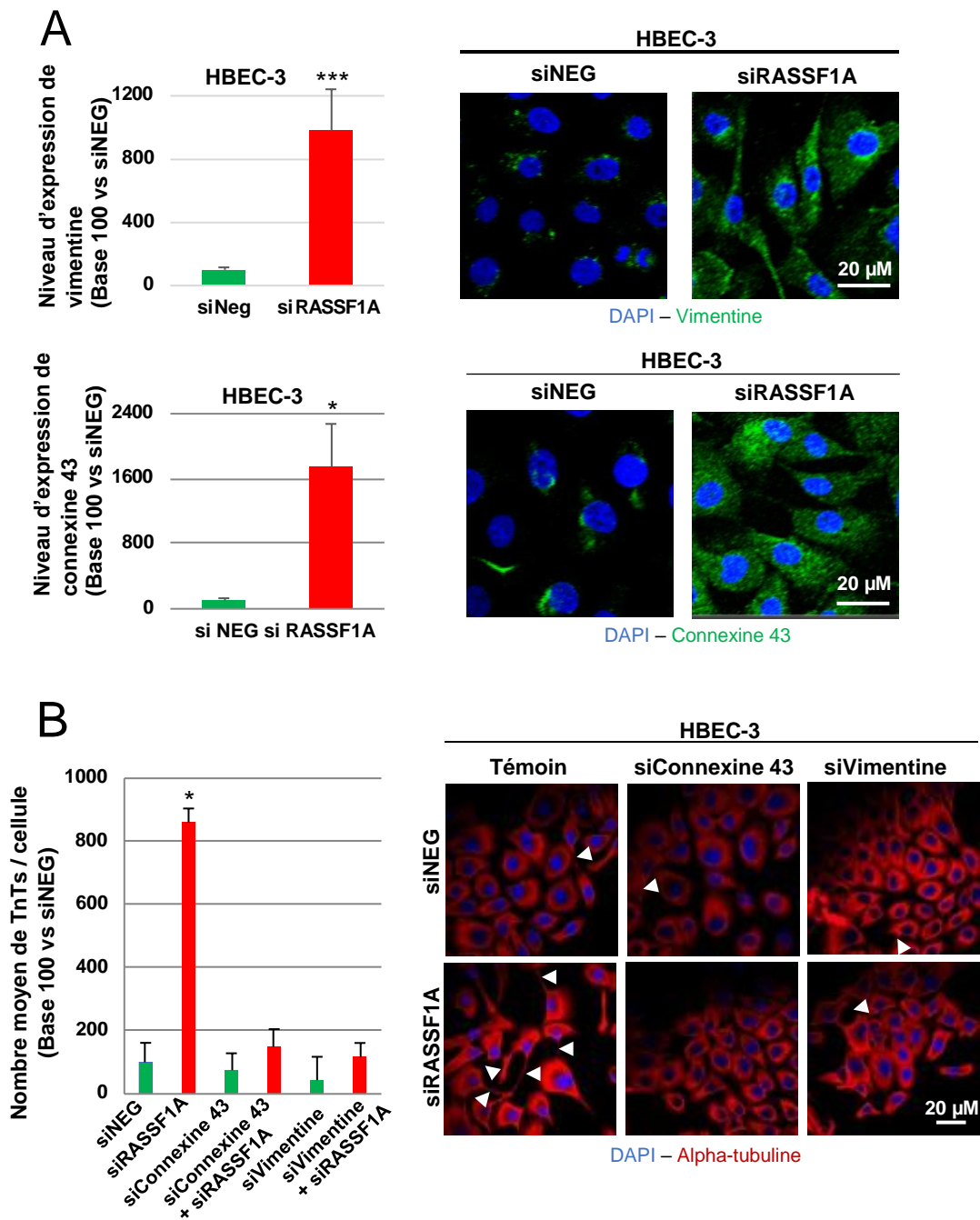


Figure 6 – Identification de marqueurs indirects de TnTs. (A) Quantification et illustration de l'expression (immunofluorescence) de la vimentine et de la connexine 43 dans des cellules HBEC-3 exprimant ou non le gène suppresseur de tumeur *RASSF1A*. **(B)** Quantification et illustration de TnTs dans des cellules HBEC-3 transfectées avec un siConnexine43, un siVimentine, associé ou non à un siRASSF1A. p-value : *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

dans plusieurs types cellulaires. Bien que les données de la littérature soient controversées, il semblerait que la connexine 43 soit plus spécifique des TnTs comportant une extrémité fermée, autorisant uniquement le passage de petites molécules ou de signaux électriques via des jonctions communicantes (37).

La vimentine, un marqueur de la transition épithélio-mésenchymateuse, est également suspectée d'être impliquée dans la communication intercellulaire via les TnTs. Son implication est supportée par la mise en évidence de sa localisation immunohistochimique à l'interface tumeur-stroma dans des prélèvements tumoraux d'adénocarcinome pulmonaire (38).

Nous présentons ci-après des données non publiées, d'une approche *ex vivo*, faisant l'objet d'un mémoire de DES, supportant les observations rapportées et répondant à la problématique de l'identification des TnTs dans des prélèvements *ex vivo*.

2.3. Identification de marqueurs de TnTs : approche *in vitro* :

Par une approche *in vitro*, nous avons démontré que parmi les protéines présentes au sein des TnTs (26), la connexine 43 et la vimentine étaient impliquées dans leur formation.

En effet, l'expression de la connexine 43 et de la vimentine augmentait significativement avec la capacité des cellules bronchiques humaines (HBEC-3) à former des TnTs (Figure 6A) (capacité induite par la perte d'expression du gène suppresseur de tumeur *RASSF1A* (26)).

De plus, la capacité de ces mêmes cellules à former des TnTs était perdue lorsque l'expression de ces protéines était inhibée (à l'aide de siARN ciblant les messagers de la connexine 43 ou de la vimentine et/ou de *RASSF1A*) (Figure 6B).

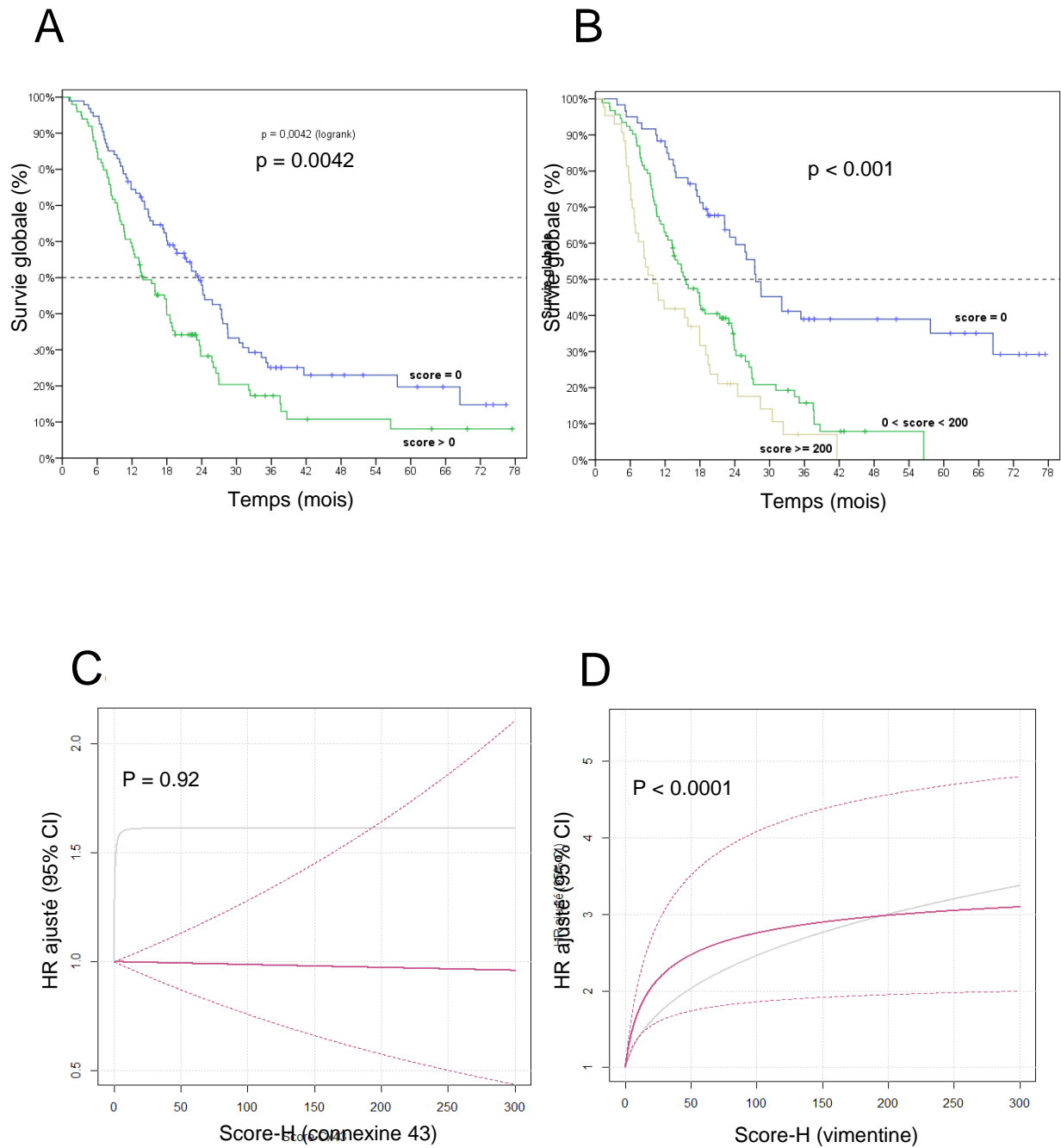


Figure 7 – Impact pronostic des TnTs intra-tumoraux. A : Courbe de survie Kaplan-Meier pour la connexine 43 associée à la survie globale ; **B :** Courbe de survie Kaplan-Meier pour la vimentine associée à la survie globale ; **C :** Hazard ratio en fonction du niveau d'expression de connexine 43 ajusté sur le niveau d'expression de vimentine ; **D :** Hazard ratio en fonction du niveau d'expression de vimentine ajusté sur le niveau d'expression de connexine 43.

Ces éléments supportent les données de la littérature et démontrent que la connexine 43 et la vimentine constituent des marqueurs indirects de la présence de TnTs.

2.4. Évaluation de l'impact pronostic de la présence de TnTs dans le MPM : approche *ex-vivo* :

Afin d'évaluer l'impact pronostic de la présence de TnTs intra-tumoraux, par une approche *ex vivo*, nous avons caractérisé l'expression immunohistochimique, des protéines connexine 43 et vimentine (marqueurs indirects de TnTs), sur des prélèvements tumoraux de patients atteints de MPM, et enrôlés dans l'essai clinique MAPS (Mesothelioma Avastin plus Pemetrexed-cisplatine Study) de phase 3. Les résultats révèlent sur cette cohorte de 197 patients atteints de MPM que la surexpression de vimentine était un facteur indépendant de mauvais pronostic sur la survie globale (HR 3 (2 ; 4.6) (variation de 200 du score-H) ; $p < 0.0001$) et sans progression (HR 2 (1.5 ; 2.7) (variation de 200 du score-H) ; $p < 0.0001$) en analyse multivariée (Figure 7A), c'est à dire ajustée sur les principales caractéristiques clinico-biologiques (Tableau 1 en Annexe). Bien que l'expression de connexine 43 (et quel que soit son niveau) ait également une valeur pronostique péjorative en analyse multivariée (Figure 7B), l'analyse bivariée révèle qu'elle est dépendante du niveau d'expression de vimentine (Figure 7C-D).

2.5. Comment expliquer la disparité pronostique entre ces deux marqueurs de TnTs : connexine 43 et vimentine ?

Nous avons démontré que la connexine 43 et la vimentine constituaient des marqueurs indirects de TnTs, et qu'il existait bien une relation significative entre les

immunomarquages connexine 43 et vimentine (chez les patients atteints de MPM) (r de Spearman = 0,22 ; p -value = 0,0019).

Les données de la littérature désignent la connexine 43 comme plus spécifique des TnTs que la vimentine, mais plusieurs limites sont à noter pouvant expliquer que l'expression de la connexine 43, contrairement à celle de la vimentine, n'est pas de valeur pronostique :

- i)** L'évaluation de l'intensité et du pourcentage d'expression immunohistochimique de la connexine 43 s'avère délicat en pratique. En effet, la faible intensité et le faible différentiel entre une intensité faible (score 1) et élevée (score 3) pose la question de la pertinence de ce marquage.
- ii)** Bien que l'étude ait été réalisée sur 197 patients, on ne peut exclure un manque de puissance.
- iii)** La connexine 43 n'est pas qu'un marqueur des TnTs, comme évoqué dans ce manuscrit ; ainsi les immunomarquages positifs révèlent également la présence des jonctions communicantes et peuvent introduire un biais dans l'interprétation des immunomarquages.
- iv)** La connexine 43 présente un rôle ambivalent : elle induirait des marqueurs épithéliaux tel l'E-cadherine dans plusieurs types cellulaires (39), mais jouerait également un rôle crucial dans la régulation de cellules souches mésenchymateuses participant à la formation de niches tumorales (40).

La vimentine n'est pas qu'un marqueur indirect de la présence des TnTs, elle est aussi le reflet d'une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) bien que cela soit moins le cas des cellules mésothéliales qui l'expriment nativement du fait de leur origine mésodermique. De fait, il semble que l'impact pronostic de la surexpression de

la vimentine est plus le reflet de la présence de TnTs dans la tumeur, que de la TEM dans ce contexte, bien que nous ne puissions pas exclure que la TEM ne joue pas un rôle dans la valeur pronostique de la surexpression de vimentine dans le MPM.

D'autres études devront confirmer la valeur pronostique de l'expression de connexine 43, et la prévalence du rôle des TnTs dans la valeur pronostique péjorative de la surexpression de vimentine mise en évidence dans cette étude.

Aux vues des éléments discutés, il apparaît nécessaire de limiter l'utilisation de la vimentine, comme marqueur de TnTs aux études s'intéressant aux tumeurs de phénotype mésenchymateux, ayant déjà au moins entamé une TEM, afin de conférer une certaine spécificité à ce marqueur, en limitant le rôle potentiel de la TEM dans la surexpression de vimentine.

2.6. TnTs et thérapeutique :

La communication intercellulaire, via les TnTs, renforce l'hétérogénéité tumorale, décrit comme une caractéristique d'agressivité dans différents types de cancer (33,36). A ce jour, aucun traitement n'est capable de cibler l'ensemble des composants cellulaires d'une tumeur. En effet, les traitements anti-cancer existants, en ciblant, notamment des mutations oncogéniques dites "drivers", exercent de fait une pression de sélection responsable de l'émergence de clone cellulaire de résistance, aboutissant à la survenue de récurrence locale ou de métastase à distance.

Une approche thérapeutique ciblant les TnTs permettrait de toucher l'ensemble des composants cellulaires (tumoraux ou stromales) d'une tumeur.

Trois approches thérapeutiques basées sur les TnTs sont actuellement envisagées, et impliquent :

- i) l'inhibition de leur fonction ou de leur formation.** Cette approche est particulièrement développée dans la lutte contre les pathologies

infectieuses et notamment le VIH. Plusieurs molécules, ciblant différentes voies de signalisation (notamment mTOR, NF-KB, Rac1, ou inhibant la polymérisation de l'actine ou l'assemblage des microtubules), permettant l'inhibition des TnTs ont été décrit (everolimus, metformin, cytochalasin D, nocodazole CK-666, ML-141, 6-thio-GTP, latrunculin A, latrunculin B, cytarabine, daunorubicin, BAY-117082, AGA et octanol) (41). Cette approche apparaît tout à fait transposable aux thérapies anti-cancer, en limitant le transfert de matériel biologique entre cellules cancéreuses et/ou cellules du microenvironnement. Dans ce sens, une étude démontre dans un modèle cellulaire de leucémie aiguë lymphoblastique T que l'inhibition d'ICAM-1, une molécule d'adhésion diminue le transfert mitochondrial médié par les cellules souches mésenchymateuses via les TnTs, responsable d'une augmentation de la mort cellulaire induite par la chimiothérapie associée (42).

D'autres études similaires utilisant également des modèles cellulaires de leucémie, suggèrent que limiter le transfert de mitochondries entre cellules cancéreuses en agissant de concert avec des thérapies ciblant le métabolisme oxydatif (OXPHOS) pourrait aboutir à la mort de ces cellules leucémiques (43,44).

L'inhibition de la formation des TnTs pourrait également limiter l'hétérogénéité tumorale observée dans les cancers du côlon *KRAS* muté, évoqués précédemment.

ii) l'utilisation des TnTs comme vecteur de médicament. En effet, il a été démontré que les nanoparticules polymériques, un dispositif médical

de délivrance de principes actifs, pouvait être internalisées et transférées d'une cellule à l'autre via les TnTs. Cette approche, couplant nanoparticules polymériques comme vecteur de thérapie anti-cancer, permettrait d'homogénéiser la distribution du médicament à l'ensemble des composants cellulaires de la tumeur, particulièrement dans un contexte hypoxique (45).

iii) l'utilisation d'une fonction dite "bénéfique" propre aux TnTs favorisant la survie cellulaire. Cette dernière approche concerne les thérapies cellulaires ou greffe de cellules souches, traitement des leucémies et certains lymphomes non hodgkiniens, dont la principale limite est la sénescence acquise par les cellules greffées limitant leur efficacité dans le temps. Une étude a démontré que la culture de ces cellules souches mésenchymateuse dans des structures en trois dimensions (sphéroïdes) en comparaison à la culture en deux dimensions, favorisait la formation de TnTs, les échanges intercellulaires de composants cytoplasmiques, et permettait de moduler l'expression de marqueurs de sénescence, et *in fine* d'améliorer la survie de ces cellules à greffer (46).

L'ensemble de ces approches thérapeutiques basé sur les TnTs offre un nouveau paradigme thérapeutique, en permettant de cibler l'ensemble des composants cellulaire d'une tumeur, de lutter contre l'hétérogénéité tumorale, responsable de l'émergence de clones cellulaires de résistance sélectionnés par les thérapies ciblées et responsable de récurrence locale ou de métastase à distance.

CHAPITRE 4 – CONCLUSION GÉNÉRALE

ET PERSPECTIVES

1. Conclusion générale :

En apportant la première preuve de l'implication de RASSF1A dans la communication intercellulaire via les TnTs, ce travail a conforté le rôle prêté à RASSF1A de suppresseur de tumeur et de métastase : l'hyperméthylation du promoteur de *RASSF1* constitue de fait un biomarqueur des cancers, d'intérêt diagnostic, pronostic et théranostic, dans le cancer du poumon.

L'intérêt clinique de l'identification de la méthylation du promoteur de *RASSF1* est i) diagnostic, réalisée à partir d'un simple prélèvement sanguin (biopsie liquide), elle pourrait permettre la détection des lésions précoces, pour lesquelles l'exérèse représente le seul traitement efficace susceptible d'améliorer la mortalité de la maladie, constituant un bon candidat comme test de dépistage ; ii) pronostic et théranostic, réalisée sur matériel biopsique, elle permettrait d'adapter la prise en charge de ces patients susceptibles d'évoluer vers une maladie métastatique, d'autant plus que des cibles thérapeutiques ont été identifiées.

En pratique de routine, l'identification de la méthylation du promoteur de *RASSF1* est faisable, par technique de pyroséquençage. Cependant, n'étant pas exclusive, son identification n'a de sens que si elle est effectuée en parallèle du profilage moléculaire (déjà effectué dans les stades métastatiques). La biopsie liquide apparaît être une bonne alternative, pour ces lésions difficilement accessibles.

L'implication des TnTs dans la carcinogenèse est rapportée dans de nombreux cancers, indépendamment de l'expression de RASSF1A, supportant le concept que la présence de TnTs dans une tumeur pourrait avoir une valeur pronostique péjorative. Aucun marqueur spécifique et universel de TnTs n'a été rapporté dans la littérature, rendant l'identification des TnTs difficile *ex-vivo*. Nous nous sommes donc intéressés

à l'identification d'une signature moléculaire des TnTs (connexine 43/vimentine) et à l'évaluation de leur impact pronostic dans le MPM.

Par une approche *in vitro*, nous avons confirmé que la connexine 43 et la vimentine sont des marqueurs indirects de la présence de TnTs. Par une approche *ex vivo*, nous avons démontré dans une cohorte de 197 patients atteints de MPM, que la surexpression de vimentine était un facteur de mauvais pronostic sur la survie globale et sans progression, témoignant de la présence de TnTs dans le MPM et dans une moindre mesure probablement de la TEM. Des biais de technique et de puissance sont probablement responsables de l'absence de valeur pronostique de l'expression de connexine 43, marqueur indirect de TnTs, dans le MPM.

La communication intercellulaire, via les TnTs, est la base de nombreuses approches thérapeutiques novatrices, offrant un nouveau paradigme thérapeutique, en permettant (à la différence des traitements conventionnels) de cibler l'ensemble des composants cellulaires d'une tumeur, de lutter contre l'hétérogénéité tumorale, responsable de l'émergence de clones cellulaires de résistance sélectionnés par les thérapies ciblées et responsable de récurrence locale ou de métastase à distance.

2. Perspectives :

En dehors des cancers pleuro-pulmonaires, l'hyperméthylation du promoteur de *RASSF1* est retrouvée dans de nombreux cancers (1), notamment dans les cancers colo-rectaux, où une méta-analyse rapporte sa potentielle valeur diagnostique (47). Ainsi, étendre la caractérisation de la perte d'expression de *RASSF1A*, des altérations des voies de signalisation qui en résultent, ainsi que l'implication des TnTs dans la pathogénie notamment des cancers colo-rectaux apparaît être une piste pertinente.

L'étude des TnTs n'en est qu'à ses balbutiements et le nombre croissant de publication sur le sujet laisse présager pour ce domaine d'étude novateur de nombreuses applications que ce soit dans les thérapies de lutte contre le cancer mais également contre les maladies infectieuses, neuro-dégénérative, ou cardio-vasculaire. En effet, les TnTs pourrait jouer un rôle dans la sauvegarde/restauration cellulaire via le transfert de mitochondrie dans un contexte de dommage cellulaire ischémique lié à un d'infarctus (41).

Références :

1. Hesson LB, Cooper WN, Latif F. The Role of RASSF1A Methylation in Cancer. *Dis Markers*. 2007;23(1–2):73–87.
2. Agathangelou A, Honorio S, Macartney DP, Martinez A, Dallol A, Rader J, et al. Methylation associated inactivation of RASSF1A from region 3p21.3 in lung, breast and ovarian tumours. *Oncogene*. 2001 Mar 22;20(12):1509–18.
3. Wistuba II, Behrens C, Virmani AK, Mele G, Milchgrub S, Girard L, et al. High resolution chromosome 3p allelotyping of human lung cancer and preneoplastic/preinvasive bronchial epithelium reveals multiple, discontinuous sites of 3p allele loss and three regions of frequent breakpoints. *Cancer Res*. 2000 Apr 1;60(7):1949–60.
4. Kim D-H, Kim JS, Ji Y-I, Shim YM, Kim H, Han J, et al. Hypermethylation of RASSF1A promoter is associated with the age at starting smoking and a poor prognosis in primary non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 2003 Jul 1;63(13):3743–6.
5. Bräuer-Hartmann D, Hartmann J-U, Wurm AA, Gerloff D, Katzerke C, Verga Falzacappa MV, et al. PML/RAR α -Regulated miR-181a/b Cluster Targets the Tumor Suppressor RASSF1A in Acute Promyelocytic Leukemia. *Cancer Res*. 2015 Aug 15;75(16):3411–24.
6. He Z, Wang X, Huang C, Gao Y, Yang C, Zeng P, et al. The FENRRR/miR-214-3P/TET2 axis affects cell malignant activity via RASSF1A methylation in gastric cancer. *Am J Transl Res*. 2018;10(10):3211–23.
7. Yang L, Ma Z, Wang D, Zhao W, Chen L, Wang G. MicroRNA-602 regulating tumor suppressive gene RASSF1A is overexpressed in hepatitis B virus-infected liver and hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol Ther*. 2010 May 15;9(10):803–8.
8. Grawenda AM, O'Neill E. Clinical utility of RASSF1A methylation in human malignancies. *Br J Cancer*. 2015 Jul 28;113(3):372–81.
9. de Fraipont F, Levallet G, Creveuil C, Bergot E, Beau-Faller M, Mounawar M, et al. An apoptosis methylation prognostic signature for early lung cancer in the IFCT-0002 trial. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2012 May 15;18(10):2976–86.
10. Fischer JR, Ohnmacht U, Rieger N, Zemaitis M, Stoffregen C, Manegold C, et al. Prognostic significance of RASSF1A promoter methylation on survival of non-small cell lung cancer patients treated with gemcitabine. *Lung Cancer Amst Neth*. 2007 Apr;56(1):115–23.
11. Szejniuk WM, Robles AI, McCulloch T, Falkmer UGI, Røe OD. Epigenetic predictive biomarkers for response or outcome to platinum-based chemotherapy in non-small cell lung cancer, current state-of-art. *Pharmacogenomics J*. 2019;19(1):5–14.
12. Blandin Knight S, Crosbie PA, Balata H, Chudziak J, Hussell T, Dive C. Progress and prospects of early detection in lung cancer. *Open Biol [Internet]*. 2017 Sep 6 [cited 2019 Feb 18];7(9). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5627048/>
13. National Lung Screening Trial Research Team, Aberle DR, Adams AM, Berg CD, Black WC, Clapp JD, et al. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *N Engl J Med*. 2011 Aug 4;365(5):395–409.
14. Wang B, Li Y, Han J, Zhou L, Lv Y, Zhang H, et al. Gene methylation as a powerful biomarker for detection and screening of non-small cell lung cancer in blood. *Oncotarget*. 2017 Mar 6;8(19):31692–704.

15. Majem M, Juan O, Insa A, Reguart N, Trigo JM, Carcereny E, et al. SEOM clinical guidelines for the treatment of non-small cell lung cancer (2018). *Clin Transl Oncol*. 2019;21(1):3–17.
16. Brock MV, Hooker CM, Ota-Machida E, Han Y, Guo M, Ames S, et al. DNA methylation markers and early recurrence in stage I lung cancer. *N Engl J Med*. 2008 Mar 13;358(11):1118–28.
17. Chen H, Suzuki M, Nakamura Y, Ohira M, Ando S, Iida T, et al. Aberrant methylation of RASGRF2 and RASSF1A in human non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*. 2006 May;15(5):1281–5.
18. Niklinska W, Naumnik W, Sulewska A, Kozłowski M, Pankiewicz W, Milewski R. Prognostic significance of DAPK and RASSF1A promoter hypermethylation in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Folia Histochem Cytobiol*. 2009;47(2):275–80.
19. Safar AM, Spencer H, Su X, Coffey M, Cooney CA, Ratnasinghe LD, et al. Methylation profiling of archived non-small cell lung cancer: a promising prognostic system. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2005 Jun 15;11(12):4400–5.
20. Quillien V, Lavenu A, Karayan-Tapon L, Carpentier C, Labussière M, Lesimple T, et al. Comparative assessment of 5 methods (methylation-specific polymerase chain reaction, MethyLight, pyrosequencing, methylation-sensitive high-resolution melting, and immunohistochemistry) to analyze O6-methylguanine-DNA-methyltransferase in a series of 100 glioblastoma patients. *Cancer*. 2012 Sep 1;118(17):4201–11.
21. Ye T, Chen H. Adjuvant targeted therapy for resected NSCLC: to be or not to be? *J Thorac Dis*. 2018 Sep;10(Suppl 26):S3297–9.
22. Santarpia M, Liguori A, D'Aveni A, Karachaliou N, Gonzalez-Cao M, Daffinà MG, et al. Liquid biopsy for lung cancer early detection. *J Thorac Dis*. 2018 Apr;10(Suppl 7):S882–97.
23. Wei L, Surma M, Shi S, Lambert-Cheatham N, Shi J. Novel Insights into the Roles of Rho Kinase in Cancer. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2016;64:259–78.
24. Abylkassov R, Xie Y. Role of Yes-associated protein in cancer: An update. *Oncol Lett*. 2016 Oct;12(4):2277–82.
25. Zanconato F, Cordenonsi M, Piccolo S. YAP/TAZ at the Roots of Cancer. *Cancer Cell*. 2016 13;29(6):783–803.
26. Dubois F, Jean-Jacques B, Roberge H, Bénard M, Galas L, Schapman D, et al. A role for RASSF1A in tunneling nanotube formation between cells through GEFH1/Rab11 pathway control. *Cell Commun Signal CCS*. 2018 Oct 11;16(1):66.
27. Dubois F, Keller M, Calvayrac O, Soncin F, Hoa L, Hergovich A, et al. RASSF1A Suppresses the Invasion and Metastatic Potential of Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells by Inhibiting YAP Activation through the GEF-H1/RhoB Pathway. *Cancer Res*. 2016 Mar 15;76(6):1627–40.
28. Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, Meijer D, Gainche L, Sena-Esteves M, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and protein that promote tumor growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol*. 2008 Dec;10(12):1470–6.
29. Zhang Y, Wang X-F. A niche role for cancer exosomes in metastasis. *Nat Cell Biol*. 2015 Jun;17(6):709–11.
30. McCoy-Simandle K, Hanna SJ, Cox D. Exosomes and nanotubes: Control of immune cell communication. *Int J Biochem Cell Biol*. 2016 Feb;71:44–54.
31. Hekmatshoar Y, Nakhle J, Galloni M, Vignais M-L. The role of metabolism and tunneling nanotube-mediated intercellular mitochondria exchange in cancer drug

- resistance. *Biochem J*. 2018 Jul 31;475(14):2305–28.
32. Vignais M-L, Caicedo A, Brondello J-M, Jorgensen C. Cell Connections by Tunneling Nanotubes: Effects of Mitochondrial Trafficking on Target Cell Metabolism, Homeostasis, and Response to Therapy. *Stem Cells Int* [Internet]. 2017 [cited 2019 Feb 18];2017. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5474251/>
 33. Desir S, Wong P, Turbyville T, Chen D, Shetty M, Clark C, et al. Intercellular Transfer of Oncogenic KRAS via Tunneling Nanotubes Introduces Intracellular Mutational Heterogeneity in Colon Cancer Cells. *Cancers*. 2019 Jun 26;11(7).
 34. Sisakhtnezhad S, Khosravi L. Emerging physiological and pathological implications of tunneling nanotubes formation between cells. *Eur J Cell Biol*. 2015 Oct;94(10):429–43.
 35. Panasiuk M, Rychłowski M, Derewońko N, Bieńkowska-Szewczyk K. Tunneling Nanotubes as a Novel Route of Cell-to-Cell Spread of Herpesviruses. *J Virol*. 2018 15;92(10).
 36. Lou E, Gholami S, Romin Y, Thayanithy V, Fujisawa S, Desir S, et al. Imaging Tunneling Membrane Tubes Elucidates Cell Communication in Tumors. *Trends Cancer*. 2017 Oct 1;3(10):678–85.
 37. Ribeiro-Rodrigues TM, Martins-Marques T, Morel S, Kwak BR, Girão H. Role of connexin 43 in different forms of intercellular communication – gap junctions, extracellular vesicles and tunnelling nanotubes. *J Cell Sci*. 2017 Nov 1;130(21):3619–30.
 38. Dauphin M, Barbe C, Lemaire S, Nawrocki-Raby B, Lagonotte E, Delepine G, et al. Vimentin expression predicts the occurrence of metastases in non small cell lung carcinomas. *Lung Cancer Amst Neth*. 2013 Jul;81(1):117–22.
 39. Xu H-T, Li Q-C, Zhang Y-X, Zhao Y, Liu Y, Yang Z-Q, et al. Connexin 43 recruits E-cadherin expression and inhibits the malignant behaviour of lung cancer cells. *Folia Histochem Cytobiol*. 2008;46(3):315–21.
 40. Genet N, Bhatt N, Bourdieu A, Hirschi KK. Multifaceted Roles of Connexin 43 in Stem Cell Niches. *Curr Stem Cell Rep*. 2018;4(1):1–12.
 41. Mittal R, Karhu E, Wang J-S, Delgado S, Zukerman R, Mittal J, et al. Cell communication by tunneling nanotubes: Implications in disease and therapeutic applications. *J Cell Physiol*. 2019 Feb;234(2):1130–46.
 42. Wang J, Liu X, Qiu Y, Shi Y, Cai J, Wang B, et al. Cell adhesion-mediated mitochondria transfer contributes to mesenchymal stem cell-induced chemoresistance on T cell acute lymphoblastic leukemia cells. *J Hematol Oncol* *J Hematol Oncol* [Internet]. 2018 Jan 22 [cited 2019 Jul 20];11. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5778754/>
 43. Moschoi R, Imbert V, Nebout M, Chiche J, Mary D, Prebet T, et al. Protective mitochondrial transfer from bone marrow stromal cells to acute myeloid leukemic cells during chemotherapy. *Blood*. 2016 Jul 14;128(2):253–64.
 44. Sukanuma K, Miwa H, Imai N, Shikami M, Gotou M, Goto M, et al. Energy metabolism of leukemia cells: glycolysis versus oxidative phosphorylation. *Leuk Lymphoma*. 2010 Nov;51(11):2112–9.
 45. Sáenz-de-Santa-María I, Bernardo-Castiñeira C, Enciso E, García-Moreno I, Chiara JL, Suarez C, et al. Control of long-distance cell-to-cell communication and autophagosome transfer in squamous cell carcinoma via tunneling nanotubes. *Oncotarget*. 2017 Mar 28;8(13):20939–60.
 46. Whitehead J, Zhang J, Harvestine JN, Kothambawala A, Liu G-Y, Leach JK. Tunneling Nanotubes Mediate the Expression of Senescence Markers in

- Mesenchymal Stem/Stromal Cell Spheroids. Stem Cells Dayt Ohio. 2019 Jul 12;
47. Hu H, Zhou C, Li B, Chen Y, Dai J, Mao Y, et al. Diagnostic value of RASSF1A hypermethylation in colorectal cancer: a meta-analysis. *Pathol Res Pract*. 2018 Oct;214(10):1572–8.

Annexe :

Tableau 1 – Comparaison des caractéristiques des patients avec ou sans immunomarquage. Les caractéristiques sont comparables au sein de la cohorte MAPS.

*193 patients avec immunomarquage connexine 43, 195 avec immunomarquage vimentine, 191 avec les deux

CT : chimiothérapie standard

PS : performance statut

		Immunomarquage connexine 43 et/ou vimentine				p
		avec (n = 197*)		sans (n = 238)		
		n	%	n	%	
Groupe	CT	96	48,7%	125	52,5%	0,43
	CT+bevacizumab	101	51,3%	113	47,5%	
Age à l'inclusion [m (sd)]		66,0	7,2	64,1	7,2	0,0062
Sexe	homme	150	76,1%	179	75,2%	0,82
	femme	47	23,9%	59	24,8%	
PS	0	100	50,8%	109	45,8%	0,57
	1	91	46,2%	120	50,4%	
	2	6	3,0%	9	3,8%	
Histologie	épithélioïde	164	83,2%	187	78,6%	0,22
	sarcomatoïde / mixte	33	16,8%	51	21,4%	
Tabac	non fumeur	87	44,2%	100	42,0%	0,65
	fumeur	110	55,8%	138	58,0%	
Globules blancs (x10 ³ /mm ³) [m (sd)]		8,5	2,5	8,5	2,8	0,83
Hémoglobine (g/dL) [m (sd)]		13,3	1,6	13,1	1,6	0,095
Plaquettes (x10 ³ /mm ³) [m (sd)]		344,9	142,7	344,4	131,0	0,97

« Par délibération de son Conseil en date du 10 Novembre 1972, l'Université n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ou mémoires. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs ».

VU, le Président de Thèse

VU, le Doyen de la Faculté

VU et permis d'imprimer
en référence à la délibération
du Conseil d'Université
en date du 14 Décembre 1973

Pour le Président
de l'Université de CAEN et P.O

Le Doyen

ANNEE DE SOUTENANCE : 2019

NOM ET PRENOM DE L'AUTEUR : JEAN-JACQUES Bastien

TITRE DE LA THESE : Méthylation du promoteur de RASSF1 et tunneling nanotubes : Intérêt clinique dans les cancers pleuro-pulmonaires

RESUME DE LA THESE EN FRANÇAIS :

En apportant la première preuve de l'implication de RASSF1A dans la communication intercellulaire *via* les tunneling nanotubes (TnTs), ce travail a conforté le rôle prêté à RASSF1A de suppresseur de tumeur et de métastase. L'hyperméthylation du promoteur de *RASSF1* constitue un biomarqueur des cancers, dont l'identification dans le cancer bronchique non à petites cellules présente un intérêt diagnostique et pronostic, en permettant i) d'une part de dépister des lésions précoces accessibles à la chirurgie et ii) d'autre part d'identifier un sous-groupe de patients susceptible d'évoluer vers une maladie métastatique. Indépendamment de l'expression de RASSF1A, l'implication des TnTs est rapportée dans la carcinogenèse de nombreux cancers, supportant le concept que leur présence dans une tumeur ait un impact pronostic. Alors qu'aucun marqueur spécifique de TnTs n'ait été rapporté, nous avons i) confirmé que la connexine 43 et la vimentine constituaient une signature moléculaire des TnTs et ii) démontré sur une cohorte de 197 patients atteints de mésothéliome pleural malin (MPM) que la surexpression de vimentine était un facteur de mauvais pronostic sur la survie globale et sans progression, témoignant de la présence de TnTs dans le MPM. La communication intercellulaire, *via* les TnTs, est la base d'approches thérapeutiques novatrices, permettant (à la différence des traitements conventionnels) de cibler l'ensemble des composants cellulaires d'une tumeur, de lutter contre l'hétérogénéité tumorale, responsable de l'émergence de clones cellulaires de résistance sélectionnés par les thérapies ciblées et responsable de récurrence.

MOTS CLES : Tunneling nanotubes ; RASSF1A ; cancer du poumon

TITRE DE LA THESE EN ANGLAIS : RASSF1 promoter methylation and tunneling nanotubes: Clinical interest in pleuro-pulmonary cancers

RESUME DE LA THESE EN ANGLAIS :

By providing the first evidence of RASSF1A's involvement in intercellular communication via tunneling nanotubes (TnTs), this work reinforced RASSF1A's role as a tumor suppressor and metastasis agent. Hypermethylation of the *RASSF1* promoter is a biomarker of cancers. Its identification in non-small cell lung cancer is of diagnostic and prognostic interest, allowing i) the screening of early lesions accessible to surgery and ii) the identification of a subgroup of patients likely to develop into a metastatic disease. Regardless of the expression of RASSF1A, the involvement of TnTs is reported in the carcinogenesis of many cancers, supporting the concept that their presence in a tumor has a prognostic impact. While no specific TnTs markers were reported, we have i) confirmed that connexin 43 and vimentin constitute a molecular signature of TnTs and ii) demonstrated in a cohort of 197 patients with malignant pleural mesothelioma (MPM) that vimentin overexpression was a factor in poor prognosis for overall and progression-free survival, reflecting the presence of TnTs in the MPM. Intercellular communication, via TnTs, is the basis for innovative therapeutic approaches, making it possible (unlike conventional treatments) to target all the cellular components of a tumor, to fight against tumor heterogeneity, responsible for the emergence of resistance cell clones selected by targeted therapies and responsible for recurrence.

KEY WORDS : Tunneling nanotubes ; RASSF1A ; lung cancer