



**HAL**  
open science

# Implication du gène ALK dans l'oncogénèse du neuroblastome

Alex Cazes

► **To cite this version:**

Alex Cazes. Implication du gène ALK dans l'oncogénèse du neuroblastome. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA11T047 . tel-01062920

**HAL Id: tel-01062920**

**<https://theses.hal.science/tel-01062920>**

Submitted on 11 Sep 2014

**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.

UNIVERSITE PARIS-SUD

École Doctorale de Cancérologie  
Laboratoire de Génétique et Biologie des Tumeurs Pédiatriques

Spécialités : Génétique et Cancérologie

**THÈSE DE DOCTORAT SUR TRAVAUX**

soutenu le 09/09/2013

par

**Alex Cazes**

## **IMPLICATION DU GENE *ALK* DANS L'ONCOGENESE DU NEUROBLASTOME**

Directeur de thèse : Dr. Isabelle Janoueix-Lerosey  
Directeur du laboratoire : Dr. Olivier Delattre

Composition du jury :

*Président du jury :* Pr. Gilles Vassal  
*Rapporteurs :* Dr. Servane Tauszig-Delamasure  
Dr. Marc Billaud  
*Examineurs :* Dr. Olivier Bernard  
Pr. Jean Soulier

Abréviations .....	4
<b>INTRODUCTION</b> .....	6
<b>Chapitre I : Le neuroblastome</b> .....	7
1.1. Epidémiologie.....	7
1.2. Origine du neuroblastome .....	7
1.2.1. Le système nerveux périphérique .....	7
1.2.2. Le développement des crêtes neurales .....	8
1.2.3. Les propriétés adrénergiques et cholinergiques .....	9
1.3. Présentation clinique.....	10
1.4. Facteurs de risque et classification .....	11
1.5. Le diagnostic.....	12
1.6. Le traitement.....	13
1.7. Neuroblastomes familiaux et susceptibilité .....	14
1.8. Altérations génétiques du neuroblastome .....	16
1.9. Amplification du gène <i>MYCN</i> .....	18
1.10. Modèles murins de surexpression du gène <i>MYCN</i> .....	19
1.11. L'axe LIN28B/let-7/ <i>MYCN</i> dans le neuroblastome .....	21
<b>Chapitre II: Anaplastic Lymphoma Kinase</b> .....	22
2.1. Les récepteurs à activité tyrosine kinase .....	22
2.2. Structure du récepteur <i>ALK</i> .....	23
2.3. Activation du récepteur <i>ALK</i> .....	24
2.4. Fonctions et profil d'expression du gène <i>ALK</i> .....	25
2.5. Ligands du récepteur <i>ALK</i> .....	27
2.6. Le gène <i>ALK</i> en oncologie humaine.....	28
2.7. Le gène <i>ALK</i> et le neuroblastome.....	30
2.8. Mutations du gène <i>ALK</i> .....	30
2.9. Evaluation du potentiel oncogénique du gène <i>ALK in vivo</i> .....	32

<b>RESULTATS</b> .....	34
Présentation des travaux.....	35
Article I.....	37
Article II .....	50
Article III.....	72
<b>DISCUSSION</b> .....	95
1. La rétention intracellulaire de RTK, une marque d'activation.....	96
2. Les anticorps inhibiteurs: futur outil clinique ?.....	97
3. Caractérisation des réarrangements chromosomiques du gène ALK .	98
4. ALK $\Delta$ 4-11 est associé à l'agressivité tumorale .....	99
5. Délétion partielle de la protéine ALK, un évènement récurrent .....	100
5.1. Récurrence dans le neuroblastome .....	100
5.2. Réarrangement dans un rhabdomyosarcome.....	101
6. Modélisation in vivo des mutations ponctuelles du gène ALK .....	102
7. Les souris KI Alk, un modèle de prédisposition au NB .....	102
8. La coopération oncogénique.....	103
9. Caractéristiques des tumeurs murines MYCN/Alk.....	104
10. Le gène RET, une cible du récepteur ALK activé.....	105
10.1. Cible dans le développement du SNS .....	105
10.2. RET comme cible de ALK dans le cancer.....	106
11. Etude préclinique des inhibiteurs moléculaires du récepteur ALK.....	107
11.1. Le NVP-TAE684 .....	107
11.2. Le crizotinib .....	108
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	110
<b>ANNEXES</b> .....	125





## Abréviations

A.A.	Acide Aminé
ABL	V-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
ALCL	Anaplastic Large Cell Lymphoma
ALK	Anaplastic Lymphoma Kinase
ATC	Anaplastic Thyroid Carcinoma
ATP	Adenosinetriphosphate
CARS	Cysteinyl-tRNA synthetase
CLTC1	Clathrin heavy chain-like 1
CNS	Central Nervous System
dALK	drosophila melanogaster Anaplastic Lymphoma Kinase
DBH	Dopamine Beta Hydroxylase
DLBCL	Diffuse large B-cell lymphoma
dmins	double minutes
DRG	Dorsal Root Ganglion
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EML4	Echinoderm microtubule-associated protein like 4
ERK	Extracellular signal Regulated Kinase
FGF	Fibroblast Growth Factor
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
FLT3	Fms-Like Tyrosine kinase receptor-3
GD2	Disialoganglioside
GN	Ganglioneurome
GNB	Ganglioneuroblastome
GSK3 $\beta$	Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$
GTPase	Guanosine triphosphatase
GWAS	Genome Wide Association Study
hALK	human Anaplastic Lymphoma Kinase
Hen-1	Hesitation-1
Ho	Homozygote
Hsp90	Heatshockprotein 90
HVA	Homovanillique Acid
Hz	Hétérozygote
IMT	Inflammatory Myofibroblastic Tumour
INRGSS	International Neuroblastoma Risk Group Staging System
INSS	International Neuroblastoma Staging System
IRS-1	Insulin Receptor Substrate 1
Jeb	Jelly belly
KI	Knock-In
KIF5B	Kinesin family member 5B
KO	Knock-Out

LDL <sub>A</sub>	Low-Density Lipoprotein class A
LTK	Leukocyte Tyrosine Kinase
MAM	Meprin/A5 protein/PTP <sub>mu</sub>
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
miARN	micro-ARN
MIBG	Métaiodobenzyl Guanidine
MK	Midkine
MSN	Moesin
mTOR	Mammalian Target Of Rapamycin
MYCN	myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived
NB	Neuroblastome
NGF	Nerve Growth Factor
NPM	Nucleophosmin
NSCLC	Non-small cell lung cancer
PDGFR	Platelet Derived Growth Factor Receptor
Phox2b	Paired-like homeobox 2b
PI3K	Phosphoinositide-3 Kinase
PLC $\gamma$	Phospholipase C $\gamma$
PTK	Protein Tyrosine Kinase
PTN	Pleiotrophin
PTP1B	Protein-Tyrosine Phosphatase 1B
RANBP2	Ran binding protein 2
RAS	Rat sarcoma
RET	Rearranged During Transfection
Rho	Ras homologous
RPTP $\beta/\zeta$	Receptor Protein Tyrosine Phosphatase $\beta/\zeta$
RTK	Receptor Tyrosine Kinase
SCC	Squamous cell carcinoma of the esophagus
SCD-2	Suppressor of constitutive dauer formation
SCG	Superior Cervical Ganglion
SCLC	Small cell lung cancer
SH2	Src homology 2
SNA	Système Nerveux Autonome
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SNS	Système Nerveux Sympathique
TH	Tyrosine Hydroxylase
TK	Tyrosine Kinase
TKD	Tyrosine Kinase Domain
TrkA	Tropomyosin receptor kinase A
VCL	Vinculin
VIP	Vasoactive Intestinal Peptide
VMA	Vanillyl-Mandélique Acid

# **INTRODUCTION**

# Chapitre I : Le neuroblastome

## 1.1. Epidémiologie

Le neuroblastome (NB) est un cancer pédiatrique se développant à partir du système nerveux sympathique (SNS). Il s'agit de la tumeur solide extra-crânienne la plus fréquente chez l'enfant, elle représente 15% de la mortalité par cancer pédiatrique. Son incidence annuelle est de 1 pour 100000 enfants. La plupart des tumeurs se développent avant l'âge de 5 ans, avec un âge médian au diagnostic de 18 mois (Brodeur, 2003; Maris et al., 2007).

## 1.2. Origine du neuroblastome

### 1.2.1. Le système nerveux périphérique

Le système nerveux périphérique permet la circulation d'informations nerveuses entre le système nerveux central et les différents organes du corps. Sa composante autonome régule les fonctions indépendantes du contrôle volontaire et se subdivise en trois groupes :

- le système sympathique composé de chaînes ganglionnaires latéro-vertébrales où se font les relais entre les neurones pré et post-ganglionnaires afin de transmettre le signal de la moelle épinière jusqu'aux organes (cf. figure 1). Des catécholamines sont utilisées comme neurotransmetteurs par les fibres post-ganglionnaires (principalement la noradrénaline), tandis que les fibres pré-ganglionnaires utilisent de l'acétylcholine. La glande médullosurrénale fait aussi partie du système sympathique, elle est composée de cellules chromaffines sécrétant des catécholamines.
- le système parasympathique composé de nerfs provenant de la boîte crânienne ou de la région sacrée de la moelle épinière (cf. figure 1). Il utilise l'acétylcholine en tant que neurotransmetteur. Ses effets sont la plupart du temps opposés à ceux du système nerveux sympathique.
- le système entérique contrôlant le tube digestif. Il est réparti en deux réseaux denses de cellules nerveuses composant chacun un plexus localisé dans la paroi intestinale: le plexus myentérique contrôlant la motricité et le plexus submuqueux contrôlant les sécrétions intestinales.

Les NB se développent à partir des neurones post-ganglionnaires du système nerveux sympathique périphérique et de la médullosurrénale. Ces structures sont spécifiées à partir de cellules de la crête neurale lors du développement embryonnaire.

### 1.2.2. Le développement des crêtes neurales

La crête neurale (CN) correspond à une population cellulaire transitoire, migrant lors du développement embryonnaire des vertébrés. Cette population cellulaire donnera naissance aux tissus suivants: le système nerveux périphérique, les cellules pigmentaires, les cellules de Schwann, les cellules de la médullosurrénale et les cellules du squelette craniofacial. Les cellules de la crête neurale proviennent des bords de la gouttière neurale, fusionnant au niveau dorsal de l'embryon lors de la formation du tube neural (cf. figure 2). Ces cellules subissent une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) conduisant à une augmentation des capacités migratoires et à une réduction des contacts intercellulaires (Le Douarin, 1999). Les cellules de la crête neurale quittent alors le tube neural et migrent sous le contrôle de différents signaux. Au niveau de la partie centrale du corps, certaines cellules vont migrer en direction ventrale et vont rejoindre la région de l'aorte. Deux populations vont alors se différencier : celle qui donnera les cellules chromaffines de la future glande surrénale et celle qui formera les ganglions sympathiques (cf. figure 3). L'ensemble de ces cellules et de leurs dérivés définissent le lignage cellulaire sympatho-adrénergique (Jiang et al., 2011).

Les processus de migration, de prolifération et de différenciation cellulaire que subissent les cellules de la CN au cours du développement sont contrôlés par un réseau de facteurs de transcription et de récepteurs à tyrosine kinase (RTK). Les cellules progénitrices de la CN qui donneront le SNS sont les premières à subir la délamination à partir du tube neural et à migrer. Elles sont caractérisées par une expression du récepteur CXCR4 qui va leur permettre de diriger leur migration vers l'aorte dorsale où la chimiokine SDF1 est produite (Kasemeier-Kulesa et al., 2010). Lors de cette migration, les cellules de la CN vont commencer leur différenciation afin de former le futur tissu sympathique. Les protéines de la famille BMP (Bone Morphogenic Protein) sont sécrétées par les cellules de l'aorte dorsale. BMP2, 4 et 7 vont induire l'expression de facteurs de transcription permettant la différenciation sympathique. Ces protéines BMP ont une importance capitale dans le développement sympathique. Des expériences réalisées dans l'embryon de poulet montrent que l'inhibition des protéines BMP par leur antagoniste Noggin empêche la formation de neurones

sympathiques (Schneider et al., 1999). L'induction de l'expression des facteurs de transcription est séquentielle, les gènes *ASCL1* et *PHOX2B* sont transcrits en premier, suivis de *HAND2*, *PHOX2A* et *GATA2* pour finir par la mise en place de l'expression de *TH* et *DBH* (Howard et al., 2000; Tsarovina et al., 2004). Cette expression séquentielle permet de passer d'une cellule de CN (Sox10+) à un progéniteur neuronal (Sox10+; Phox2b+) et enfin à un neurone sympathique différencié (Sox10-; Phox2b+; SCG10+) (cf. figure 4).

L'invalidation par knock-out (KO) de *Phox2b* conduit à l'absence totale de système nerveux autonome (SNA) chez la souris. Ce gène est indispensable à l'expression de facteurs permettant la différenciation dans les différentes voies composant le SNA (Pattyn et al., 1999). Des phénotypes moins importants ont aussi été renseignés *in vivo* après le KO de différents autres facteurs. Par exemple, la perte de la protéine *Ascl1* chez la souris conduit à une altération de la différenciation adrénergique. Ces souris présentent une réduction de la taille des ganglions sympathiques accompagnée d'une réduction de la prolifération cellulaire entre E11.5 et E15.5, période correspondant à la mise en place de ces ganglions chez la souris (Guillemot et al., 1993; Pattyn et al., 2006). Le KO de *Hand2* cause aussi une réduction importante de la taille des ganglions sympathiques chez la souris, probablement due là aussi à un arrêt de la prolifération des progéniteurs neuronaux (Hendershot et al., 2008). Ces données indiquent que l'expression successive des différents facteurs de transcription est indispensable au bon développement du tissu sympathique.

### 1.2.3. Les propriétés adrénergiques et cholinergiques

La spécification des propriétés du tissu sympathique est sous le contrôle d'un important réseau de gènes. Au cours du développement embryonnaire, les précurseurs neuronaux sympathiques possèdent la double spécificité : adrénergique et cholinergique. Puis ils vont se différencier dans l'une ou l'autre voie. La plupart des neurones sympathiques sont adrénergiques, ils innervent des organes internes afin de réguler des fonctions telles que la mobilité intestinale, le contrôle de la pupille ou la vasoconstriction. C'est à partir de cette composante que se développent les NB. Cependant, certains précurseurs sympathiques vont se différencier en neurones cholinergiques afin d'innover le périoste, les glandes sudoripares ou encore les vaisseaux des muscles (Rohrer, 2011).

Une étude récente indique que cette différenciation des précurseurs du SNS dans une des deux voies est sous le contrôle de l'expression de la protéine TRKC et de son action combiné sur

RET et HMX1 (Furlan et al., 2013). TRKC va inhiber l'expression de HMX1 et promouvoir l'expression du récepteur RET dans la population neuronale qui va acquérir des propriétés cholinergiques (cf. figure 5). Le récepteur TRKC stimule l'expression de RET, un acteur clé de la spécification cholinergique. Les souris portant une délétion du domaine kinase de Ret présentent une diminution importante du nombre de neurones sympathiques exprimant ChAT (Choline Acétyltransférase) et VAcHT (Vesicular AcetylCholine Transporter), deux protéines permettant respectivement la synthèse et le transport de l'acétylcholine (Bureau et al., 2004). RET est donc indispensable à l'expression de facteurs cholinergiques, mais il réprime aussi l'expression des gènes *HMX1* et de *TRKA*, indispensables aux propriétés adrénergiques (Furlan et al., 2013).

Dans la population de cellules au devenir adrénergique, l'extinction de TRKC va conduire à l'inhibition de l'expression du gène *RET* et à la stimulation de l'expression des gènes *TRKA* et de *TH* par *HMX1*. Cette étude montre que l'expression de HMX1 est indispensable au maintien des propriétés adrénergiques des neurones sympathiques vers la fin de la mise en place du SNS.

### 1.3. Présentation clinique

Le NB est caractérisé par une grande variabilité clinique et évolutive. Alors que certaines tumeurs disséminent et conduisent au décès du patient malgré une chimiothérapie intensive, d'autres, initialement agressives, vont être capables de régresser spontanément ou de mûrir. La présentation clinique au diagnostic est métastatique dans 60% des cas avec une dissémination au niveau des ganglions lymphatiques, de la moelle osseuse, des os et du foie (D'Andon et al., 2004). Dans 40% des cas il s'agit de formes dites localisées. Les tumeurs sont principalement abdominales (65%) ou thoraciques (20%). Des tumeurs primaires cervicales (5%), pelviennes (5%) ainsi qu'à d'autres localisations sont aussi observées (Maris et al., 2007).



## 1.4. Facteurs de risque et classification

Certains facteurs de risques ont été historiquement utilisés dans la prise en charge des patients atteints de NB. Ils sont individuellement associés à un pronostic et correspondent à des critères cliniques ou génétiques :

- L'âge du patient : les enfants atteints d'un NB avant l'âge de 18 mois ont un meilleur pronostic que ceux diagnostiqués après 18 mois.
- Le stade d'extension tumoral : les patients présentant une tumeur localisée ont un meilleur pronostic que les patients métastatiques.
- L'amplification du gène MYCN : elle est associée à un mauvais pronostic et à un risque élevé de rechute quelque soit l'âge du patient (cf. figure 6).
- La perte du 11q : cette altération segmentaire est fréquente. C'est un marqueur de mauvais pronostic.
- La ploïdie : Les tumeurs diploïdes ou tétraploïdes ont un mauvais pronostic alors que les tumeurs hyper-diploïdes sont de bon pronostic.

La variabilité clinique du NB a conduit à la mise en place d'une classification qui regroupe les tumeurs partageant certaines caractéristiques afin d'améliorer le diagnostic et la prise en charge thérapeutique. La classification INSS (International Neuroblastoma Staging System) fût ainsi créée en se basant principalement sur la présentation clinique post-chirurgicale. Cette classification prenait principalement en compte la capacité d'envahissement des tumeurs pour les grouper en 6 stades (Brodeur et al., 1988, 1993) (cf. tableau 1).

Afin d'homogénéiser la classification utilisée à travers le monde, la classification internationale INRGSS (International Neuroblastoma Risk Group Staging System) a été créée en 2009 (cf. tableau 2). Basée sur des critères cliniques pré-opératoires associés à de l'imagerie médicale, cette classification permet d'harmoniser la prise en charge des patients et l'analyse des essais de phase clinique (Cohn et al., 2009). La classification comprend 16 groupes de pré-traitement auxquels sont attribués des valeurs de risque d'évolution (très faible, faible, intermédiaire et haute).

Le NB fait partie des tumeurs neuroblastiques comprenant aussi les ganglioneuromes (GN) et les ganglioneuroblastomes (GNB). Le NB et le GNB sont des tumeurs malignes peu ou pas différenciées alors que le GN est une tumeur bénigne présentant une forte différenciation. La classification de Shimada (ou International Neuroblastoma Pathology Classification) permet

de classer une tumeur de patient dans un des trois groupes de tumeurs neuroblastiques et de lui attribuer une valeur pronostique en fonction de critères histologiques et de l'âge du patient (Shimada et al., 1999) (cf. figure 7). Ainsi, à la différence des deux autres types de tumeurs neuroblastiques, les NB sont composés de moins de 50% de cellules de Schwann. La différence entre un GN et un GNB réside dans l'absence ou la présence de foyers de cellules neuroblastiques. Même si le contenu schwannien des GNB est supérieur à 50%, ces tumeurs sont considérées comme malignes car la présence de cellules tumorales neuroblastiques est associée à un pronostic défavorable. Les NB peuvent quant à eux être subdivisés en fonction de leur état de différenciation (indifférencié, faiblement différencié et différenciant). L'évaluation de leur niveau de prolifération et d'apoptose permet aussi d'affiner cette classification.

## 1.5. Le diagnostic

Compte-tenu de leur tissu d'origine, les NB sont préférentiellement localisés le long de la colonne vertébrale. Les symptômes sont souvent liés au volume tumoral car beaucoup de patients présentent une distension abdominale associée à des douleurs liées à la compression d'organes au voisinage de la tumeur. Ces douleurs peuvent être accompagnées de troubles neurologiques dus à la compression de nerfs ainsi que de douleurs osseuses si le patient présente des métastases, ce qui est majoritairement le cas au diagnostic (60% des cas). La présence d'hématomes orbitaires, défini comme le syndrome de Hutchinson, est un signe caractéristique de la présence de métastases (D'Andon et al., 2004).

La plupart des tumeurs sont abdominales et apparaissent dures et bosselées à la palpation. Les tumeurs thoraciques, plus rares, sont diagnostiquées par radiographie faisant souvent suite à des signes cliniques respiratoires. Enfin, les tumeurs cervicales sont parfois associées à un syndrome de Claude Bernard Homer avec myosis et ptosis. Dans de rares cas, les patients présentent une ataxie associée à un syndrome oculo-cérébello-myoclonique et un retard psychomoteur. Les NB dits « en sablier » sont des cas particuliers, ces tumeurs progressent à travers la colonne vertébrale créant une compression de la moelle épinière qui peut entraîner une paralysie des membres inférieurs (Maris et al., 2007). Cette présentation clinique est souvent associée à des troubles moteurs et à une incontinence, ce qui rend le diagnostic très difficile compte-tenu de l'âge des enfants touchés.

Les seuls symptômes cliniques ne permettent pas de poser le diagnostic du NB avec certitude. Pour ce faire, l'imagerie médicale est utilisée afin de définir si le patient est opérable et de rechercher la présence d'éventuelles métastases. Différents types d'imageries peuvent être utilisées et peuvent s'avérer complémentaires: échographie, scanner, IRM ou encore PET-scan. La scintigraphie utilisant la MIBG (MétaIodoBenzyl Guanidine) radiomarquée est utilisée comme critère diagnostique grâce à sa forte sensibilité et spécificité (Maris et al., 2007). Cette molécule a une structure proche de celle de la noradrénaline.

Le NB sécrète des catécholamines et plus particulièrement de la dopamine, ainsi que ses catabolites : l'acide homovanillique (HVA) et l'acide vanillyl-mandélique (VMA) (cf. figure 8). Ces molécules se retrouvent concentrées dans les urines, leur dosage est un critère diagnostique important et permet aussi de suivre l'évolution tumorale (Marín-Valencia et al., 2008). Cependant certains NB ne sécrétant pas de catécholamines, ne fixeront donc pas de MIBG et apparaitront donc négatifs lors de la scintigraphie.

## 1.6. Le traitement

Le choix de la stratégie thérapeutique va dépendre des critères pronostiques de la tumeur (âge du patient, amplification du gène *MYCN*, stade d'extension tumoral) et de l'opérabilité. Le clinicien va déterminer l'intensité du traitement en fonction de l'agressivité tumorale. Des formes de bon pronostic peuvent faire l'objet d'un suivi sans traitement chimique. Alors que pour les formes agressives, le traitement de référence est la chimiothérapie. Certaines tumeurs sont initialement opérables, d'autres nécessitent au préalable un traitement d'induction par chimiothérapie. Le NB étant une tumeur chimiosensible, ce traitement est réalisé afin de réduire la taille de la tumeur primaire ainsi que de traiter d'éventuelles métastases. Cependant, de fortes doses de chimiothérapies sont nécessaires pour traiter les formes agressives, induisant une immunodépression chez le patient et nécessitant une greffe de moelle osseuse. De plus, la chimiothérapie n'est pas toujours efficace car de nombreux patients métastatiques subissent une rechute tumorale.

Le taux de survie à long terme des patients atteint d'un NB agressif n'est que de 40%. Il s'avère donc essentiel de développer des approches thérapeutiques ciblées, adaptées aux spécificités génétiques des tumeurs pour chaque patient. Récemment, un essai clinique combinant un anticorps anti-GD2 (Disialoganglioside), un antigène uniformément exprimé dans les tumeurs de NB, à de l'isorétinoïne (acide rétinoïque) a permis d'augmenter la survie

sans évènement (Progression Free Survival) de 46 à 66% pour les NB de haut risque par rapport à un traitement par l'isorétinoïne seul (Yu et al.). Enfin, une étude comparative a été réalisée entre le traitement standard européen des NB à haut risque (chimiothérapie combinant du busulphan et du melphalan) et le traitement standard américain (carboplatine, ectoposide et melphalan). Les résultats, indiquent que le traitement européen confère une meilleure survie globale des patients (60% contre 48%) et que son taux de toxicité sévère est plus faible que celui du traitement américain (Ladenstein, 2011).

### 1.7. Neuroblastomes familiaux et susceptibilité

La majeure partie des NB sont sporadiques, cependant il existe de rares formes familiales (environ 1% des cas). De transmission autosomale dominante et de pénétrance incomplète, elles sont le plus souvent multifocales et plus précoces que les formes sporadiques (Maris et al., 1997). Ces observations sont en accord avec le modèle de Knudson selon lequel le développement d'une tumeur présentant une mutation constitutionnelle serait plus précoce car ne nécessitant qu'une mutation supplémentaire, contrairement aux formes sporadiques nécessitant l'acquisition de deux évènements mutationnels somatiques (Knudson, 1971; Knudson and Strong, 1972).

Il existe des formes syndromiques de NB, les tumeurs y sont associées à des pathologies telles que la maladie de Hirschprung, les syndromes d'Ondine, de Noonan, de Costello ou encore la neurofibromatose de type 1 (Maris et al., 1997). Cette association concerne principalement les NB familiaux et n'est qu'occasionnelle en ce qui concerne les formes sporadiques. Les patients atteints de la maladie de Hirschprung présentent une absence des ganglions entériques du colon provoquant des occlusions. Des mutations des gènes *RET* et *EDNRB* ont été identifiées dans cette pathologie (Puffenberger et al., 1994; Romeo et al., 1994). Les patients atteints du syndrome d'Ondine, aussi nommé syndrome d'hypoventilation congénitale d'origine centrale, ont une anomalie du contrôle autonome de la respiration. Après l'identification de mutations germinales du gène *PHOX2B* chez ces patients, des mutations de ce même gène ont été identifiées dans des formes familiales de NB (Amiel et al., 2003; Trochet et al., 2004). Cependant, le type de mutations de ce gène n'est pas le même entre les NB pour lesquels des mutations ponctuelles ont été identifiées et le syndrome d'Ondine causé par des expansions de poly-alanine. *PHOX2B* est le premier gène de prédisposition au NB identifié, il code pour un facteur de transcription et joue un rôle majeur lors du développement

du système nerveux autonome, notamment dans la spécification adrénergique. La délétion homozygote de *Phox2b* chez la souris provoque une létalité embryonnaire. Chez ces animaux, les précurseurs neuronaux du SNA sont incapables de former des ganglions. Ces précurseurs n'expriment pas les marqueurs adrénergiques DBH et TH, indispensables au développement normal du système nerveux (Pattyn et al., 1999). De plus, les mutations du gène *PHOX2B* identifiées dans le NB abolissent l'effet antiprolifératif du gène sauvage et conduisent à une augmentation de la prolifération des neurones sympathiques chez le poulet (Reiff et al., 2010). Ainsi, ces effets développementaux peuvent expliquer la prédisposition au NB chez les patients atteints de mutations du gène *PHOX2B*.

Le principal gène de prédisposition au NB identifié jusqu'à ce jour est le gène *ALK* (Janoueix-Lerosey et al., 2008; Mosse et al., 2008) (voir chapitre 2.8). Cependant, les gènes *ALK* et *PHOX2B* seuls ne suffisent pas à expliquer l'ensemble des formes familiales de NB. De plus, la survenue de NB est plus importante chez les patients atteints de syndrome congénitaux. Il reste donc encore des gènes de prédisposition au NB inconnus même si de nombreux efforts ont été produits afin de les identifier. Dans cet esprit, des analyses de liaison génétique ont permis d'identifier les régions de susceptibilité au NB suivantes : 16p12-p13, 4p16, 2p21-p25.1 et 12p12.1-p13.3 (Longo et al., 2007; Maris et al., 2002; Perri et al., 2002).

Ces dernières années, l'utilisation de puces SNP à haute densité a permis de réaliser des analyses d'association sur l'intégralité du génome en comparant des ADN constitutionnels de patients et de personnes saines. Ces analyses GWAS (Genome Wide Association Study) ont identifié des polymorphismes génétiques associés à une prédisposition au NB aux loci suivants : 6p22 (Maris, 2010), 2q35 (*BARD1*) (Capasso et al., 2009), 6q16 (*HACE1* et *LIN28B*) (Diskin et al., 2012), 11p15 (*LMO1*) (Wang et al., 2011a), 1p11.2 (*HSD17B12*), 1q23.3 (*DUSP12*), 5q11.2 (*DDX4* et *IL31RA*) (Nguyen le et al.). Une variation du nombre de copies d'un locus situé en 1q21 a aussi été identifiée (Diskin et al., 2009). Ce locus est délété chez un grand nombre de patients atteints et contient le gène *NBPF23*, identifié comme nouveau membre de la famille des gènes *NBPF* (NB breakpoint family). Cette famille est composée de plusieurs membres répartis en trois loci sur le chromosome 1 associés à des duplications segmentaires. Le premier membre, impliqué dans une translocation constitutionnelle, fut identifié chez un patient atteint de NB (Vandepoele et al., 2008). Des délétions constitutionnelles partielles de leurs séquences ont aussi été caractérisées chez des patients schizophrènes (International Schizophrenia Consortium, 2008). Bien que la fonction des gènes de cette famille ne soit pas clairement établie, la surexpression de ses membres a été décrite dans différents cancers (Meza-Zepeda et al., 2002; Petroziello et al., 2004).

## 1.8. Altérations génétiques du neuroblastome

La grande variabilité du NB est une notion soutenue notamment par la diversité et l'importance des remaniements génomiques associés à des changements du nombre de copies de larges régions génomiques. L'évolution technologique a permis aux équipes de recherche d'étudier les profils génomiques de l'ensemble du génome d'un grand nombre de tumeurs. Ces analyses ont notamment permis de mettre en évidence de fréquents gains et pertes de bras chromosomiques associés à un mauvais pronostic : pertes sur les régions 1p, 3p, 4p, 11q et gains du 2p et du 17q (Attiyeh et al., 2005; Caron et al., 1996; Rubie et al., 1997; Schleiermacher et al., 1996). La prise en compte du profil global du génome tumoral au diagnostic apporte une information pronostique supplémentaire par rapport à l'âge du patient et au stade d'extension tumoral. Les profils génomiques permettent de classer les tumeurs en groupes (cf. figure 9). Ainsi, la présence d'altérations uniquement numériques conduisant à la variation de la ploïdie est associée à un pronostic favorable. Les altérations segmentaires sont quant à elles toujours associées à un mauvais pronostic et constituent le facteur le plus fortement prédictif de la rechute (Janoueix-Lerosey et al., 2009). Bien que les mécanismes conduisant à ces altérations chromosomiques ne soient pas caractérisés dans le NB, on peut supposer que les altérations numériques soient la conséquence de défauts de la ségrégation chromosomique lors de la mitose. Les translocations déséquilibrées dont les points de cassure touchent principalement les régions à réplication précoce, peuvent quant à elles être la conséquence d'un défaut de contrôle de la phase S (Schleiermacher et al., 2003).

L'altération génétique la plus fréquente du NB est l'amplification de l'oncogène *MYCN*, observée dans environ 20% des tumeurs primaires (Schwab et al., 1983). Cette amplification conduit à une surexpression importante de la protéine *MYCN*. Quelques autres gènes situés sur le bras court du chromosome 2 sont amplifiés dans des tumeurs, tels que *ALK*, *ANTXR1*, *DDX1*, *NAG* et *MEIS1*, ainsi que des gènes situés sur d'autres chromosomes, tel que le gène *CCND1*. Situé sur le chromosome 11, il code pour la cycline D1 et joue un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire. Ce gène est aussi amplifié dans des cancers du pancréas, du cou, de la tête, de la peau, du colon ou bien du sein (Gillett et al., 1994; Musgrove et al., 2011). Les gènes *MDM2* et *CDK4*, situés sur le chromosome 12, sont amplifiés dans un faible pourcentage de NB ainsi que dans des sarcomes et des gliomes. Des amplifications des régions 1p34, 1p36, 5q33, 8q24, 11q13, 12q13–14 et 16q22 ont aussi été décrites dans le NB

(Janoueix-Lerosey et al., 2010). Enfin, une étude a mis en évidence la présence de mutations ponctuelles faux-sens et de micro-délétions du gène *NFI* dans un faible nombre de tumeurs. Cette étude identifie ce gène comme un suppresseur de tumeurs et montre aussi que l'absence de protéines NF1 confère une résistance au traitement par l'acide rétinoïque (Hölzel et al., 2010).

L'utilisation récente des technologies de séquençage à haut débit a permis d'évaluer l'ensemble des altérations de génomes tumoraux. Ces technologies ont été utilisées afin d'identifier les gènes fréquemment mutés dans le NB et aussi afin d'obtenir un profil global des altérations.

Les résultats d'un projet de séquençage du génome complet de 87 tumeurs de NB indiquent que hormis l'amplification du gène *MYCN* et les mutations ponctuelles du gène *ALK* (cf. chapitre 2.8), il n'y a que peu d'altérations récurrentes dans le NB (Molenaar et al., 2012a). Toutefois, 18% des tumeurs sont touchées par le phénomène de « chromothripsis », décrit comme la fragmentation d'une région chromosomique suivie de la réassociation aléatoire des fragments d'ADN (Stephens et al., 2011) (cf. figure 10). Le chromothripsis est associé à un mauvais pronostic dans cette cohorte de NB. Des mutations ponctuelles et des variants de structure (délétion, inversion, translocation) affectant des gènes ont été identifiés mais ces altérations ne sont présentes chacune que dans quelques tumeurs. Les gènes *CSMD1*, *PTPRD* et ceux de la famille *ODZ* sont touchés, ils sont impliqués dans la croissance et la stabilisation du cône axonal. La régulation de cette fonction est réalisée par la voie Rac/Rho dont les gènes régulateurs *TIAMI*, *DLC1*, *ARHGAP10* et *ATRX* sont eux aussi altérés mais là encore de façon peu récurrente (cf. figure 11). Cette étude montre que des gènes impliqués dans la régulation de la formation des neurites peuvent jouer un rôle important dans l'oncogenèse du NB. Leurs mécanismes d'action dans le NB ne sont cependant pas encore connus.

Une autre étude combinant plusieurs approches de séquençage à haut débit a identifié des mutations inactivatrices et des délétions des gènes *ARID1A* et *ARID1B* dans 11% des tumeurs sporadiques testées (Sausen et al., 2013). Ces altérations sont associées à une faible survie des patients. Les gènes de la famille *ARID1* codent pour des facteurs de remodelage de la chromatine, impliqués dans les cancers du sein, du foie, des ovaires et les médulloblastomes (Fujimoto et al., 2012; Jones et al., 2012, 2010; Stephens et al., 2012). Ainsi, les altérations des marques épigénétiques et de leurs régulateurs peuvent contribuer à l'initiation et à la progression du NB.

Enfin, une dernière étude combinant du séquençage à haut débit génomique et transcriptomique a été réalisée par l'équipe de J. Maris (Pugh et al., 2013). Là encore, peu d'altérations récurrentes ont été observées, hormis celles touchant les gènes *ALK* et *MYCN*. En dehors de ces deux gènes, les mutations somatiques affectent principalement les gènes *PTPN11*, *ATRX* et *NRAS*, mais avec une faible récurrence. Tout aussi rares, des variants constitutionnels touchant les gènes *BARD1*, *CHEK2* et *PINK1* ont été identifiés.

L'ensemble de ces études indique que dans le NB, comme dans d'autres cancers pédiatriques, le nombre de mutations ponctuelles non-synonymes conduisant à la formation de tumeurs est plus faible que dans les cancers de l'adulte<sup>59</sup> (cf. figure 12).

### 1.9. Amplification du gène *MYCN*

Le gène *MYCN* est un proto-oncogène codant pour un facteur de transcription de la famille MYC comprenant aussi c-MYC et MYCL. Le gène *MYCN* a été identifié suite à la découverte de son amplification dans des échantillons de NB (Kohl et al., 1983; Schwab et al., 1983). Il est exprimé préférentiellement durant l'embryogenèse dans le système nerveux central et périphérique, la rate, le rein et le poumon. La protéine MYCN contrôle l'expression de nombreux gènes et régule ainsi de nombreux processus cellulaires fondamentaux tels que le métabolisme, la prolifération et la différenciation cellulaire, l'apoptose et la synthèse protéique. La partie N-terminale de la protéine MYCN comprend un domaine d'activation de la transcription, tandis que la partie C-terminale contient un domaine de liaison à l'ADN et un domaine de dimérisation. Ce dernier, également présent sur la protéine MAX, va permettre l'hétérodimérisation entre les deux protéines. Le complexe MAX-MYCN va ensuite recruter des co-facteurs transcriptionnels permettant l'ouverture de la chromatine puis la stimulation de la transcription (cf. figure 13). MYCN peut aussi avoir un effet inhibiteur de la transcription et notamment réprimer des gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire et des régulateurs négatifs du cycle cellulaire (Westermarck et al., 2011).

Des modèles murins inactivant le gène *Mycn* ont été développés. Les souris *Mycn*<sup>-/-</sup> meurent autour du onzième jour du développement embryonnaire et présentent des anomalies majeures du développement de nombreux organes et notamment une réduction de taille des ganglions du SNS (Charron et al., 1992; Stanton et al., 1992).

En pathologie humaine, des délétions et des mutations inactivatrices ont été identifiées chez des patients atteints du syndrome de Feingold. Le gène *MYCN* est le principal gène impliqué



dans cette pathologie associant une microcéphalie, une atrésie du système digestif et des anomalies de formation des doigts (Van Bokhoven et al., 2005; Marcelis et al., 2008). En oncologie, des amplifications ou des surexpressions de *MYCN* ont été décrites dans les rétinoblastomes (Lee et al., 1984), les tumeurs de Wilms (Nisen et al., 1986), les rhabdomyosarcomes (Dias et al., 1990), les médulloblastomes (Rouah et al., 1989), les glioblastomes (Hui et al., 2001) et les cancers du poumon à petites cellules (Nau et al., 1986). L'amplification de *MYCN* est le premier évènement génétique identifié dans le NB (Schwab et al., 1984). Cette amplification est présente dans 20% des tumeurs primaires. Elle est associée à l'agressivité tumorale et constitue un facteur majeur de mauvais pronostic (Brodeur et al., 1984). Le traitement par l'acide rétinoïque, permettant de différencier les tumeurs, conduit à une répression de *MYCN*, ce qui indique que sa signalisation soit importante pour le maintien du statut indifférencié des tumeurs agressives (Thiele et al., 1985).

Des mutations gains de fonction de la petite GTPase *HRAS* ont été identifiées chez des patients atteints du syndrome de Costello, parfois associé au NB (Aoki et al., 2005). Or l'étude de ses propriétés oncogéniques *in vitro* a permis de démontrer que le gène *MYCN* peut coopérer avec *HRAS* muté afin de transformer des cellules embryonnaires de rat (Schwab et al., 1985). Une souris transgénique surexprimant une forme constitutivement active de H-Ras dans les cellules dérivées de la crête neurale a été réalisée (Sweetser et al., 1997). Une hyperplasie du SNS ainsi que la formation de NB dans environ 20% des souris y est observé. Les tumeurs, parfois métastatiques, présentent des signes de différenciation ainsi qu'une augmentation des ARN messagers de *MYCN*, confirmant le rôle majeur que joue le gène *MYCN* dans l'oncogenèse du NB.

#### 1.10. Modèles murins de surexpression du gène *MYCN*

Des lignées transgéniques surexprimant le gène *MYCN* sous le contrôle d'un enhancer des chaînes lourdes de l'immunoglobuline génèrent des tumeurs lymphoïdes (Dildrop et al., 1989; Rosenbaum et al., 1989). Ces résultats indiquent que ce gène présente des propriétés tumorigènes *in vivo*.

Afin d'évaluer les capacités tumorigènes de la surexpression de *MYCN* dans les neuroblastes, d'autres lignées de souris transgéniques ont été développées. L'ADNc humain de *MYCN* est mis sous le contrôle du promoteur du gène de la tyrosine hydroxylase restreignant ainsi l'expression au niveau du tissu sympathique. Ces animaux (TH-*MYCN*) génèrent des NB

plusieurs mois après la naissance. Les tumeurs récapitulent les propriétés biologiques et génétiques des NB humains. En effet, majoritairement abdominales ou thoraciques, ces tumeurs indifférenciées pour la plupart expriment des marqueurs neuronaux et leurs altérations chromosomiques touchent des régions sythéniques de celles affectées chez l'humain (Weiss et al., 1997). Ces tumeurs se développent à partir des ganglions paravertébraux et envahissent ensuite la glande surrénale. La régression spontanée et complète de NB a aussi été observée dans ce modèle chez une faible proportion de souris (Teitz et al., 2011). Les tumeurs se développent après une période de latence importante, ce qui indique qu'un évènement génétique supplémentaire est requis. Les souris hétérozygotes pour le transgène ont une pénétrance incomplète alors que les souris homozygotes présentent une pénétrance totale. De même, le temps de latence chez les homozygotes est beaucoup plus court que chez les hétérozygotes, il y a donc un effet de dosage génique de *MYCN* sur ses propriétés tumorigènes. Les tumeurs sont très vascularisées et sensibles à l'inhibiteur angiogénique caplostatin (Chesler et al., 2007). Ces modèles murins indiquent ainsi que le gène *MYCN* peut contribuer à la transformation des neuroblastes *in vivo*.

Néanmoins, ces animaux ne génèrent pas de métastases et ne modélisent donc pas le sous-groupe de NB le plus agressif. Afin d'obtenir un modèle métastatique du NB, une souris associant la surexpression de *MYCN* et l'absence d'expression de la Caspase-8 a été réalisée. En effet, la Caspase-8 est une protéine pro-apoptotique mais elle est aussi impliquée dans le contrôle de la migration et de l'adhésion cellulaire (Lee et al., 2009). De plus, la suppression de l'expression de la Caspase-8 par hyperméthylation a été décrite dans les NB humains. Ce mécanisme y est associé à une augmentation du risque de rechute et à un mauvais pronostic (Grau et al., 2011). Chez les souris TH-*MYCN*, la délétion homozygote du gène de la caspase-8 dans les cellules dérivées des crêtes neurales conduit à l'apparition de métastases dans la moelle osseuse dans 37% des cas (Teitz et al., 2013).

Sachant que la perte des gènes *NF1* et *RBI* a été décrite dans certaines tumeurs de NB (Hölzel et al., 2010; Nakamura et al., 1991), des croisements entre les souris TH-*MYCN* et les souris *Nf1 +/-* ou *Rb1 +/-* ont été réalisés. Ils conduisent à la réduction de la latence et l'augmentation de la pénétrance des NB comparativement aux souris TH-*MYCN* seules. Ces données indiquent que la perte de ces gènes suppresseurs de tumeurs coopère avec l'amplification du gène *MYCN* dans le développement du NB (Weiss et al., 1997).

### 1.11. L'axe LIN28B/let-7/MYCN dans le neuroblastome

Le gène *LIN28B* est impliqué dans la maturation des cellules germinales, la myogenèse, la neurogenèse, ainsi que dans le métabolisme cellulaire. Il joue aussi un rôle majeur dans la pluripotence des cellules embryonnaires germinales. En effet, en combinaison avec *NANOG*, *OCT4* et *SOX2*, son expression permet de reprogrammer des cellules somatiques humaines en cellules souches (Yu et al., 2007). Des amplifications et des surexpressions de *LIN28B* ont été décrites comme étant de mauvais pronostic dans de nombreux cancers (Viswanathan et al., 2009). La protéine LIN28B est capable de se fixer sur le précurseur des micro-ARN (miARN) de la famille Let-7 dans le noyau, empêchant l'action de DROSHA et DICER et donc la maturation et l'export des miARN Let-7 (Viswanathan et al., 2008) (cf. figure 14). Les miARN Let-7 jouent un rôle de suppresseur de tumeurs dans certains cancers. Ils sont capables d'inhiber des oncogène tels que *RAS*, *MYC* et *CDK6*. Une perte de leur expression dans des cancers tels que ceux du poumon, des ovaires ainsi que les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou est associée à une valeur pronostic défavorable (Boyerinas et al., 2010).

Récemment, le gène *LIN28B* a été identifié comme étant un oncogène du NB par l'équipe de J. Schulte (Molenaar et al., 2012b). Dans cette étude, 3 tumeurs de NB présentent une amplification génomique du locus de *LIN28B*. Une analyse transcriptomique comparative montre que ce gène est fortement exprimé dans les NB, ce qui est associé à un mauvais pronostic. Cette expression est nécessaire au maintien de la prolifération cellulaire et du statut indifférencié des lignées cellulaires de NB. Cette étude démontre aussi l'effet inhibiteur de LIN28B sur les miARN de la famille Let-7 dans les lignées cellulaires et tumeurs de NB et démontre que cette inhibition est responsable de la surexpression de la protéine MYCN. Afin d'évaluer l'impact de la surexpression de LIN28B dans la tumorigenèse du NB, un modèle transgénique surexprimant ce gène dans les cellules dérivées de la crête neurale a été développé. Ces souris génèrent des NB précocement (de 36 à 56 jours de vie) à partir de la glande surrénale et des ganglions cœliaques. Les tumeurs sont majoritairement abdominales et récapitulent les propriétés histologiques et transcriptionnelles des NB humains. Dans ces tumeurs, la forte expression protéique de LIN28B est associée à la perte d'expression de Let-7 et à la surexpression de Mycn, ce qui est en accord avec les observations faites dans les lignées cellulaires. Ce travail a permis d'identifier *LIN28B* comme oncogène du NB et d'identifier MYCN comme principale cible de cette protéine dans ce cancer (Molenaar et al., 2012b).

## Chapitre II: Anaplastic Lymphoma Kinase

Le gène *ALK* est localisé en 2p23.2-p23.1 et code pour un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase. Il fait partie de la superfamille des récepteurs à l'insuline dont il forme un sous-groupe avec le récepteur LTK (Leukocyte Tyrosine Kinase). Le gène *ALK* a été découvert par l'équipe de T.A. Look en 1994 lors de la première mise en évidence de la fusion NPM-ALK dans les lymphomes anaplasiques à grandes cellules (ALCLs) (Morris et al., 1994).

### 2.1. Les récepteurs à activité tyrosine kinase

Les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) sont des protéines localisées à la surface des cellules généralement sous forme monomérique lorsqu'elles sont inactives et sous forme dimérique lorsqu'elles sont actives. L'activation se produit suite à la fixation d'un ligand protéique sur le domaine extracellulaire du récepteur conduisant à sa dimérisation. A noter que certains récepteurs s'oligomérisent sous leur forme inactive comme c'est le cas du récepteur à l'insuline ou du récepteur à l'IGF1. La dimérisation induit des modifications conformationnelles du domaine tyrosine kinase permettant une levée de la cis-inhibition du récepteur et la phosphorylation sur des résidus tyrosines de la boucle d'activation de l'autre récepteur du dimère. Dans cet état « activé » le récepteur peut ensuite phosphoryler plusieurs autres tyrosines du domaine intracellulaire qui serviront de sites pour recruter les protéines impliquées dans la transduction du signal (i.e. SH2, PTB) (Lemmon and Schlessinger, 2010).

Le génome humain contient 58 gènes codant pour des RTK, repartis en 20 familles selon leur séquence du domaine kinase (Robinson et al., 2000) (cf. figure 15). Cette classe de protéines, impliquée dans le dialogue intercellulaire, régule des fonctions essentielles au sein des organismes telles que la croissance, la différenciation, l'adhésion, la motilité et la mort cellulaire. Chez l'humain, des mutations de RTK ont été associées au développement de pathologies telles que le diabète, certains cancers ou des syndromes congénitaux. Par exemple, des mutations du gène *FGFR* ont été identifiées dans différents types de craniosynostose (malformations crâniennes) ou des mutations du gène *RET* ont été décrites dans les néoplasies endocriniennes multiples de type 2B (Robertson et al., 2000). Les RTK sont des acteurs majeurs en pathologie humaine, notamment en cancérologie, lorsqu'ils sont

suractivés et constituent donc des cibles de choix pour le développement de traitements dans une approche de thérapie ciblée. Des inhibiteurs moléculaires ciblant le domaine kinase ont été développés contre de nombreux RTK. Ces molécules sont cependant rarement spécifiques à un seul RTK. Ainsi, des patients atteints de tumeurs gastro-intestinales avec des mutations du gène *c-KIT* peuvent être traités depuis peu avec de l'imatinib, un inhibiteur moléculaire initialement créé pour inhiber la fusion BCR-ABL chez les patients atteints de leucémies myéloïdes. Une autre stratégie consiste à utiliser des anticorps monoclonaux capables à la fois d'inhiber l'activation du récepteur et aussi de servir de cibles au système immunitaire une fois fixés sur la cellule exprimant le RTK muté (Reichert and Valge-Archer, 2007; Shawver et al., 2002).

Le développement des stratégies de thérapie ciblée a permis d'améliorer la survie des patients pour de nombreux cancers. L'inhibition d'un oncogène auquel la tumeur est dépendante permet donc d'induire une régression tumorale, mais cela induit aussi une forte pression de sélection conduisant à l'émergence d'une résistance au traitement obtenue par différents mécanismes (cf. figure 16).

## 2.2. Structure du récepteur ALK

La partie extracellulaire du récepteur ALK est composée de 1620 acides aminés (cf. figure 17). Elle possède un domaine d'adressage membranaire à son extrémité N-terminale et deux domaines MAM (meprins/A5 protein/PTPmu) impliqués dans les interactions cellulaires (a.a.: 264-427 et 480-626). La fonction précise de ces domaines MAM n'est pas connue mais leur présence semble indispensable au fonctionnement du récepteur car leur mutation conduit à l'inactivation de dALK, l'orthologue de *ALK* chez la drosophile. Le même type d'observation a été faite à propos de la région riche en glycine aussi présente dans le domaine extracellulaire de ALK (a.a.: 816-940) (Lorén et al., 2003). Le récepteur ALK possède aussi un domaine LDLa (Low density Lipoprotein Class A ; a.a.: 453-471) dont la fonction précise dans ce récepteur est inconnue. Cependant, les domaines LDLa sont connus pour être impliqués dans la fixation du LDL à son récepteur, ce qui suggère que ce domaine puisse être impliqué dans la liaison de ALK à son ligand (Fass et al., 1997). En outre, 16 sites consensus du domaine extracellulaire peuvent être N-glycosylés, ce qui représente la principale modification post-traductionnelle du récepteur ALK. La partie intracellulaire du récepteur porte le domaine tyrosine kinase (TK) (a.a.: 1122-1376).

La protéine native est composée de 1620 acides aminés et présente une masse moléculaire de 180 kDa. Cependant, après ajout de modifications post-traductionnelles, le récepteur atteint une taille de 220 kDa. Une forme de 140 kDa existe aussi, elle est issue d'un clivage protéique dans le domaine extracellulaire (Moog-Lutz et al., 2005). L'alignement des séquences protéiques de ALK indique que ce récepteur est conservé entre certaines espèces (homologie avec le récepteur humain : *Mus musculus* : 87.1% ; *Danio rerio* : 47.6% ; *Drosophila melanogaster* : 32.9% ; *Caenorhabditis elegans* : 28.4%) (données d'alignement protéique UCSC). Le domaine tyrosine kinase est la partie du récepteur la plus conservée avec une différence de seulement 4 acides aminés entre l'homme et la souris.

### 2.3. Activation du récepteur ALK

La boucle d'activation du domaine tyrosine kinase des membres de la superfamille des récepteurs à l'insuline contient les motifs composés de trois tyrosines : YxxxYY. Ces tyrosines (Y1278, Y1282 et Y1283) sont séquentiellement phosphorylées lors de l'activation du récepteur ALK. La trans-phosphorylation sur la tyrosine 1278 est la première à avoir lieu, elle est indispensable à l'auto-activation du récepteur. Les deux autres tyrosines ne sont que faiblement phosphorylées (Bossi et al., 2010; Lee et al., 2010; Tartari et al., 2008). La trans-phosphorylation permet à la boucle d'activation de changer de conformation et de réaliser la levée de la cis-auto-inhibition. Pour les autres membres de récepteurs à l'insuline, la deuxième tyrosine de la boucle d'activation est la première à être phosphorylée. Les mécanismes d'activation du récepteur ALK semblent donc un peu différents. La différence de composition en acides aminés entre les tyrosines de la boucle d'activation pourrait expliquer ces différences d'activation séquentielle des tyrosines entre ALK et les autres membres de la famille. Ainsi pour le récepteur ALK, la séquence est : YRASYY alors que pour les autres membres de la superfamille de récepteurs à l'insuline il s'agit de : YETDYY (Donella-Deana et al., 2005).

Récemment, la structure tridimensionnelle de la protéine ALK a été étudiée par cristallographie (Bossi et al., 2010; Lee et al., 2010). Ces expériences suggèrent que les mécanismes de cis-inhibition du récepteur ALK sont là aussi un peu différents de ceux des autres membres de la superfamille des récepteurs à l'insuline. La boucle d'activation bloque l'accès au site de fixation de l'ATP des différents membres de la famille des récepteurs à l'insuline dans leur conformation inactive, ce qui n'est pas le cas pour ALK.

## 2.4. Fonctions et profil d'expression du gène *ALK*

### - *Drosophila melanogaster*

La fonction du gène *ALK* a été bien caractérisée chez les invertébrés. Ainsi, chez *Drosophila melanogaster*, la protéine Jelly Belly (JEB) lie et active dALK dans une sous-population cellulaire du mésoderme viscéral embryonnaire. La signalisation induite par dALK spécifie les cellules fondatrices permettant le développement de la musculature viscérale de l'intestin. L'absence de dALK chez la drosophile conduit à l'éclosion de larves non viables dépourvues d'intestin (Englund et al., 2003; Lee et al., 2003; Lorén et al., 2003). La liaison entre JEB et dALK est aussi impliquée dans le développement du système visuel de la drosophile où JEB, exprimé et sécrété par des photorécepteurs, va activer dALK au niveau des neurones du lobe optique (Bazigou et al., 2007). Le domaine LDLa est présent à la fois dans la partie extracellulaire de ALK mais aussi sur JEB. Il est indispensable à l'activation de dALK par JEB car la perte de ce domaine sur JEB dans des lignées de drosophiles empêche toute liaison activation de dALK (Lee et al., 2003). La même observation a été faite à propos des domaines MAM et G-rich, indispensables à l'activation de dALK (Lorén et al., 2003).

Enfin, une étude récente indique que l'activation excessive de dALK provoque une réduction de la taille des mouches et induit un déficit de l'apprentissage (Gouzi et al., 2011). Ces résultats montrent aussi que dNF1 est une cible de dALK dans le contrôle de ces phénotypes. Le gène *dALK* semble donc être un acteur clé du développement chez la drosophile. Une autre étude confirme cette hypothèse en démontrant que le gène *dALK* protège le développement du cerveau si les drosophiles sont soumises à une restriction calorique (Cheng et al., 2011).

### - *Caenorhabditis elegans*

Chez *Caenorhabditis elegans*, l'orthologue du gène *ALK* se nomme *SCD-2* (Suppressor of Constitutive Dauer-2). Il joue un rôle dans le contrôle de l'entrée du stade dauer et dans la stabilisation synaptique (Liao et al., 2004; Reiner et al., 2008). Comme chez la drosophile, le ligand est connu et il est sécrété. Il s'agit de la protéine Hen-1 (Hesitation-1), elle contient aussi un domaine LDLa (Ishihara et al., 2002).

### - *Danio rerio*

Chez le poisson zèbre, le rôle du gène *ALK* n'a pas été renseigné mais celui du gène *LTK* a fait l'objet d'études. Ainsi, *LTK* est impliqué dans la formation des iridophores à partir des

cellules de la crête neurale où il est exprimé. La protéine LTK chez le poisson zèbre est particulière car à la différence de l'humain et de la souris, elle porte des domaines MAM comme c'est le cas pour ALK (Lopes et al., 2008).

- *Gallus gallus domesticus*

Le profil d'expression du gène *ALK* au cours du développement a été renseigné chez le poulet. Les hybridations *in situ* décrivent son expression dans les ganglions sympathiques, les ganglions dorsaux rachidiens et certains neurones moteurs au niveau de la moelle épinière (Hurley et al., 2006). De plus, des expériences réalisées sur des cultures primaires de cellules du SNS de poulet indiquent clairement que le gène *ALK* contrôle la prolifération neuroblastique au cours du développement. De plus, ce contrôle est dépendant de l'activation du récepteur par la midkine (MK), une protéine sécrétée et proposée comme ligand de ALK chez l'humain. Ces résultats mettent en évidence l'activation de ALK par la MK dans les neuroblastes. Ces expériences apportent des précisions sur le rôle du gène *ALK* dans le développement du SNS (Reiff et al., 2011).

- *Mus musculus* and *Rattus norvegicus*

Chez le mammifère, aucune donnée n'a pour l'instant permis d'attribuer une fonction au gène *ALK*. Des expériences d'hybridation *in situ* avec des sondes anti-sens dirigées contre son ARNm ont été réalisées chez la souris. Ces expériences démontrent qu'il est exprimé dans le système nerveux central au niveau du thalamus, de l'hypothalamus, du mésencéphale et du bulbe olfactif. Il est aussi détecté dans le système nerveux périphérique au niveau des ganglions dorsaux rachidiens (DRG), des ganglions supérieurs cervicaux (SCG), de ganglions crâniens et aussi des ganglions du plexus myentérique. Son expression est forte au cours du développement, devient maximale à la naissance et décroît rapidement ensuite mais reste détectable chez l'adulte (Morris et al., 1997; Vernersson et al., 2006). Des western-blot réalisés sur des DRG et des cerveaux de rats montrent que le gène *ALK* est majoritairement exprimé à la naissance par des neurones co-exprimant *Trka* et *Ret* (Degoutin et al., 2009).

- *Homo sapiens sapiens*

Chez l'humain, des expériences d'immunohistochimie indiquent que la protéine ALK n'est détectable chez l'adulte que dans certaines zones du cerveau (Pulford et al., 1997). Cependant, cette dernière étude apparaît peu informative compte-tenu du faible nombre de tissus étudiés et de la faible sensibilité de la technique utilisée. L'ARNm du gène *ALK* a aussi été détecté



dans le testicule, le colon, le petit intestin et la prostate (Morris et al., 1994). Compte-tenu de son expression principalement embryonnaire et localisée dans le système nerveux, un rôle lors du développement normal de ce tissu est suspecté. Des expériences *in vitro* sur des cellules PC12 (cellules dérivées d'un phéochromocytome de rat) et SK-N-SH (lignée cellulaire de NB) indiquent que le gène *ALK* joue un rôle dans la différenciation neuronale et que ce rôle est dépendant de l'activation de la voie MAPK (Motegi et al., 2004; Souttou et al., 2001).

Afin d'élucider un potentiel rôle développemental chez le mammifère, un modèle Knock-Out (KO) a été réalisé chez la souris. Aucun phénotype majeur n'a pu être documenté chez ces animaux. Cependant, une surprolifération modérée des cellules progénitrices de l'hippocampe associée à des anomalies lors de tests comportementaux chez les adultes KO homozygotes a été observée. Ces résultats confirment l'hypothèse d'un rôle du gène *ALK* lors du développement du cerveau (Bilsland et al., 2008). Mais malgré ces indications aucune fonction n'a été clairement reportée jusqu'à présent. Un double KO *ALK/LTK* a été réalisé et a mis en évidence la redondance existant entre les deux gènes avec un effet accru du double KO sur la neurogenèse par rapport au KO *ALK* seul (Weiss et al., 2012). Aucun changement dans la neurogenèse n'a été observé après la perte du récepteur LTK seul. Ces travaux suggèrent qu'en ce qui concerne la neurogenèse, le récepteur LTK complémente partiellement la perte du récepteur ALK, alors qu'à l'inverse ALK complémente totalement la perte du récepteur LTK.

## 2.5. Ligands du récepteur ALK

Alors que chez la drosophile et le nématode le ligand du récepteur ALK est clairement identifié, la situation est plus complexe chez le mammifère où aucune protéine présentant une homologie avec JEB n'a été identifiée.

La Pléiotrophine (PTN) est proposée comme ligand du récepteur ALK chez l'humain. Un criblage par la méthode de phage display sur une banque d'ADN complémentaires de cerveau humain a permis d'identifier l'interaction entre ces deux protéines. Des expériences sur la lignée SW-13 surexprimant ALK confirment la fixation de PTN sur ALK, l'activation de ALK et enfin l'augmentation de la prolifération de ces cellules avec un effet anti-apoptotique (Stoica et al., 2001). Par la suite, la Midkine a aussi été identifié comme ligand du récepteur ALK (Stoica et al., 2002).

PTN et MK sont deux facteurs de croissance homologues se liant à l'héparine. Ces deux facteurs de croissance ont un rôle dans le développement du système nerveux central et périphérique ainsi que la migration neuronale et l'angiogenèse.

Cependant, certaines données restent contestées par plusieurs équipes n'ayant pu reproduire ces résultats (Mathivet et al., 2007; Moog-Lutz et al., 2005; Motegi et al., 2004). Un mécanisme alternatif d'activation a été décrit. ALK pourrait être activé de façon indirecte via la signalisation induite par la fixation de la PTN sur son récepteur RPTP $\beta$  (Receptor Protein Tyrosine Phosphatase  $\beta$ ) (Perez-Pinera et al., 2007). Dans ce modèle, RPTP $\beta$  inhibe ALK en interagissant constitutivement avec lui à la membrane plasmique. La liaison de la PTN sur RPTP $\beta$  conduirait ainsi à l'inhibition de l'activité phosphatase de RPTP $\beta$ , ce qui permettrait à ALK de s'autoactiver (cf. figure 18).

Enfin, ALK a été décrit en 2006 comme étant un récepteur à dépendance. Ces récepteurs ont une activité anti-apoptotique lorsqu'ils sont liés à leur ligand. Mais en absence de ligand, ils présentent une activité pro-apoptotique. Cette activité apoptotique fait suite au clivage du récepteur par des caspases. Dans cette étude, la transfection de neurones corticaux avec un plasmide codant pour le gène *ALK* induit l'apoptose de ces cellules, qui est abolie par l'inhibition de la caspase-3 (Mourali et al., 2006) (cf. figure 18). Ces résultats ont été obtenus lors d'expériences réalisées *in vitro* et doivent maintenant être confirmés *in vivo*.

## 2.6. Le gène *ALK* en oncologie humaine

### 2.6.1. Cas des lymphomes anaplasiques à grandes cellules

La découverte de la fusion NPM-ALK dans les lymphomes anaplasiques à grandes cellules (ALCLs) en 1994 fut la première mise en évidence du rôle de ce gène en oncologie humaine (Morris et al., 1994). Cette fusion impliquant le gène *ALK* est ainsi la principale cause d'apparition de ce type de lymphome majoritairement pédiatrique. 40 à 60% des ALCLs présentent une translocation chromosomique entre les loci des gènes *ALK* (2p23) et *NPM* (5q35) conduisant à l'expression d'une protéine fusion NPM-ALK de 80kDa (Amin and Lai, 2007). La partie N-terminale de la nucléophosmine (NPM) contenant les domaines d'oligomérisation est ainsi associée à la partie C-terminale, intracytoplasmique du récepteur ALK contenant le domaine tyrosine kinase. Cette association avec NPM permet une multimérisation constitutive de la protéine fusion et donc une autophosphorylation constitutive du domaine tyrosine kinase du récepteur ALK. NPM régule aussi la localisation

subcellulaire de la protéine fusion. Combiné à l'absence du domaine d'adressage membranaire du récepteur ALK dans la protéine fusion, celle-ci se retrouve ainsi localisée dans le cytoplasme, le noyau et le nucléole. Alors que les voies de signalisation activées par le récepteur ALK pleine taille ne sont pas clairement identifiées, il a été démontré que NPM-ALK active les voies de signalisation PLC $\gamma$  (Bai et al., 1998), PI3K/AKT (Bai et al., 2000), RAS/MAPK (Fujimoto et al., 1996) et JAK/STAT (Zamo et al., 2002) dans les ALCLs. Le caractère oncogénique de NPM-ALK *in vivo* a été démontré par l'étude d'une souris transgénique dans laquelle l'expression de la fusion protéique dans les lymphocytes T, cellule d'origine de la plupart des ALCL, conduit à la formation rapide de lymphomes (Chiarle et al., 2003). Enfin, d'autres protéines de fusion impliquant ALK ont été identifiées dans les ALCLs, comme par exemple ATIC-ALK (Colleoni et al., 2000), TFG-ALK (Hernández et al., 1999) ou encore TPM3-ALK (Siebert et al., 1999). Des modèles transgéniques murins de surexpression de NPM-ALK et TPM3-ALK dans les précurseurs des lymphocytes de type B ont aussi été réalisés. Ces animaux génèrent des lymphomes de type B et des leucémies (Giuriato et al., 2010).

### 2.6.2. Autres cancers

Depuis la découverte de NPM-ALK dans les ALCLs, de nombreuses autres fusions issues de réarrangements chromosomiques ont été identifiées dans différents cancers tels que : les cancers du poumon à petites cellules (Soda et al., 2007), les tumeurs myofibroblastiques inflammatoires (Griffin et al., 1999) ainsi que d'autres tumeurs (Chan et al., 2008; Debelenko et al., 2011; Jazii et al., 2006; Lin et al., 2009; Onciu et al., 2003; Wang et al., 2011b) (cf. tableau 3). Dans l'ensemble de ces cas, les réarrangements chromosomiques conduisent à une activation constitutive du domaine tyrosine kinase du récepteur ALK. Les différents partenaires protéiques régulent la localisation subcellulaire des protéines fusions (Chiarle et al., 2008). Le point de cassure de ces différents réarrangements se produit systématiquement dans l'intron 19 du gène *ALK*. L'activation constitutive du domaine tyrosine kinase semble être l'élément conditionnant les capacités oncogéniques de ALK. Cette observation est confirmée par une équipe ayant réalisée une chimère entre le domaine extracellulaire de l'EGFR et le domaine tyrosine kinase de ALK (Piccinini et al., 2002). L'expression de cette chimère dans les cellules NIH3T3 conduit à l'activation du domaine kinase et des cibles PLC et PI3K ainsi qu'à la transformation de ces cellules.

La surexpression du gène *ALK* a été décrite les carcinomes de la thyroïde, les cancers du poumon à petites cellules, les cancers du sein, les mélanomes, les glioblastomes, les astrocytomes, les rétinoblastomes, les rhabdomyosarcomes, les tumeurs d'Ewing et les NB (Dirks et al., 2002; van Gaal et al., 2012; Salido et al., 2011). Récemment, des gains de copies et des amplifications touchant le gène *ALK* ont aussi été observées dans le cancer du poumon à petites cellules et dans le rhabdomyosarcome (Van Gaal et al., 2012; Salido et al., 2011). Enfin, des mutations ponctuelles ont été rapportées dans de rares cas de tumeurs de rhabdomyosarcomes et de carcinomes anaplasiques de la thyroïde (Dirks et al., 2002; van Gaal et al., 2012; Murugan and Xing, 2011; Salido et al., 2011) (cf. tableau 4)

## 2.7. Le gène *ALK* et le neuroblastome

En 2000, la première étude démontrant l'expression de la protéine *ALK* pleine taille dans le NB a été publiée (Lamant et al., 2000). Le niveau d'expression du gène *ALK* est un indicateur important car une forte expression est associée à un mauvais pronostic (Passoni et al., 2009; Schulte et al., 2011). Cette forte expression peut, dans certains cas, être liée à l'amplification du gène décrite dans 1.7% des tumeurs primaires (De Brouwer et al., 2010; Lamant et al., 2000). La méta-analyse réalisée par De Brouwer *et al.* indique que 12 tumeurs sur les 709 étudiées présentent une amplification du gène *ALK*. Toutes ces tumeurs, sauf une, présentent aussi une amplification de *MYCN*. Une inhibition de *ALK* par ARN interférence conduit à une diminution de la prolifération dans certaines lignées cellulaires de NB exprimant le récepteur sauvage (Janoueix-Lerosey et al., 2008; Mosse et al., 2008; Passoni et al., 2009). Une étude des profils transcriptomiques de NB indique que les profils de tumeurs ayant une mutation du gène *ALK* et ceux des tumeurs surexprimant le gène sauvage sont semblables (Schulte et al., 2011). Il est donc possible qu'au-delà d'un certain seuil d'expression, le récepteur *ALK* puisse être activé en absence de ligand.

## 2.8. Mutations du gène *ALK*

En 2008, des mutations ponctuelles activatrices du gène *ALK* ont été identifiées dans des tumeurs primaires de NB. Des mutations somatiques ont été identifiées dans des tumeurs sporadiques et des mutations germinales ont été identifiées dans des formes familiales de NB

(Caren et al., 2008; Chen et al., 2008; George et al., 2008; Janoueix-Lerosey et al., 2008; Mosse et al., 2008). Les mutations du gène *ALK* sont actuellement l'évènement génétique prédisposant au NB le plus fréquent. Ces mutations ont une pénétrance incomplète dans les formes familiales, suggérant qu'un autre évènement génétique soit requis afin de générer les tumeurs. Le statut de l'ensemble des mutations est hétérozygote, seul un cas de NB avec une mutation homozygote a été rapporté jusqu'à présent (Martinsson et al., 2011). Les mutations sont réparties majoritairement dans le domaine tyrosine kinase et conduisent à une activation constitutive du récepteur par autophosphorylation. Elles ont été identifiées dans environ 7% des tumeurs primaires sporadiques. Deux hotspots principaux de mutation ont été décrits aux positions F1174 et R1275.

La mutation F1174L n'a pas été observée dans les formes familiales de NB, ce qui laisse supposer que cette mutation puisse être responsable d'une létalité embryonnaire. La mutation R1275Q est présente dans des formes sporadiques, c'est aussi la mutation la plus fréquemment observée dans les familiales de NB mais aussi au regard de l'ensemble des tumeurs, représentant 49% des cas mutés (De Brouwer et al., 2010).

Le résidu F1174 est localisé à proximité de l'hélice  $\alpha C$  alors que le résidu R1275 est localisé dans la boucle d'activation du domaine tyrosine kinase. Ces deux résidus permettent la stabilisation de la protéine dans sa conformation auto-inhibée en absence de ligand. Les mutations peuvent donc rendre le récepteur constitutivement actif en déstabilisant cette conformation (Lee et al., 2010).

Les mutations conduisent à une forte activité kinase du récepteur. Elles présentent des propriétés oncogéniques caractérisées par la capacité des cellules NIH/3T3 surexprimant des mutants à former des colonies en agar mou et à former des tumeurs sous-cutanées après xenogreffe chez la souris (Chen et al., 2008). Ces mutations permettent aussi la croissance cellulaire de cellules Ba/F3 en absence d'Il-3 (George et al., 2008).

En 2011, deux patients avec une mutation germinale *de novo* du gène *ALK* (F1174V pour l'un et R1275V pour l'autre) ont été identifiés (De Pontual et al., 2011). Ils présentaient une association entre un NB et une encéphalopathie sévère associée à une malformation du tronc cérébral. Cette observation suggère que le gène *ALK* joue un rôle important non seulement dans prédisposition au NB mais aussi dans le développement du système nerveux central.

La valeur pronostique des mutations du gène *ALK* n'est actuellement pas claire. Tout d'abord, les mutations sont présentes dans des NB de bon comme de mauvais pronostic. La méta-analyse publiée par De Brouwer indique qu'à la différence de la mutation R1275Q, la mutation F1174L est associée avec l'amplification de *MYCN*, qui est un facteur de mauvais

pronostic (De Brouwer et al., 2010). Dans cette étude, la survie des patients est plus mauvaise lorsque ALK est fortement exprimé ce qui est en accord avec les observations de Passoni *et al.*. Cependant, l'association entre la mutation ALK<sup>F1174L</sup> et l'amplification de MYCN n'est pas confirmée par Pugh *et al.*. Dans cette étude, la présence d'une mutation du gène ALK est associée à une faible survie, ce qui n'est pas le cas dans l'étude de De Brouwer lorsque l'on regroupe les mutations. Ainsi, les données de la littérature ne sont pas en accord quant à la valeur pronostic des mutations du gène ALK dans le NB.

## 2.9. Evaluation du potentiel oncogénique du gène ALK *in vivo*

Des expériences de surexpression *in vitro* indiquent que la mutation ALK<sup>F1174L</sup> présente les plus fortes capacités oncogéniques et tumorigènes. Afin d'étudier les propriétés tumorigènes *in vivo* de cette mutation, plusieurs groupes ont généré des modèles animaux transgéniques.

### 2.9.1. Le modèle du poisson zèbre

Le premier modèle apparu dans la littérature est une modélisation chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) (Zhu et al., 2012). Le transgène humain comportant la mutation est mis sous le contrôle du promoteur du gène *DBH*. Cet article fut le premier à démontrer la coopération oncogénique entre la mutation ALK<sup>F1174L</sup> et la surexpression de *MYCN in vivo*. Cette démonstration fut faite suite au croisement entre les poissons transgéniques exprimant la mutation du gène ALK mais ne générant pas de tumeurs spontanément et les poissons surexprimant l'ADNc humain de *MYCN*, générant eux des NB spontanément mais avec une latence importante et une faible pénétrance.

### 2.9.2. Les modèles murins

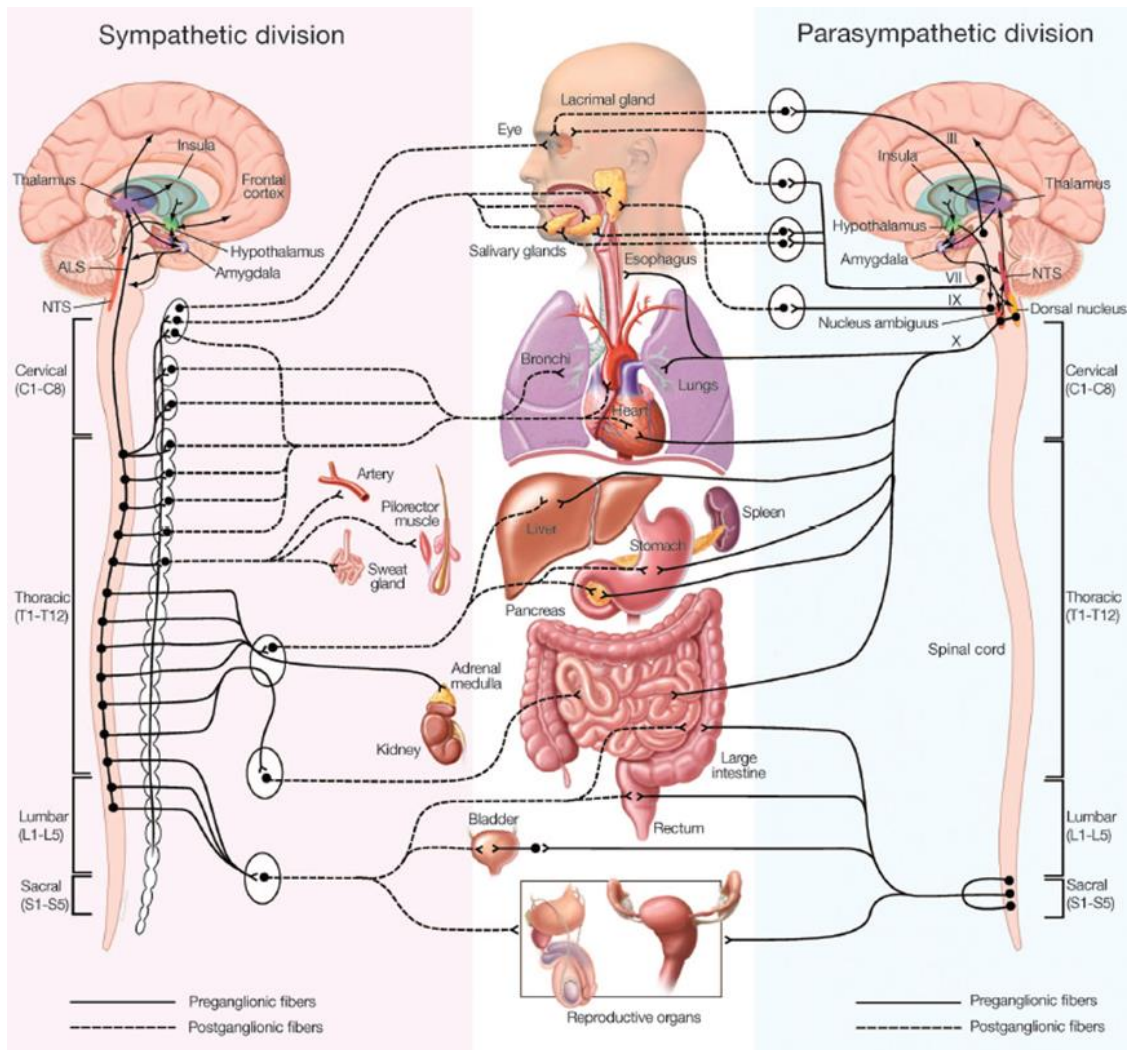
Des modèles murins (*Mus musculus*) transgéniques exprimant la mutation ALK<sup>F1174L</sup> ont été développés par deux groupes de recherche. Les souris du groupe de R. George expriment un transgène comportant l'ADNc de ALK<sup>F1174L</sup> humain directement sous le contrôle du promoteur du gène *TH* (TH-ALK<sup>F1174L</sup>) (Berry et al., 2012). Le groupe de J. Schulte a créé des souris exprimant la même mutation sous le contrôle du promoteur des gènes *DBH* ou *TH*

(Heukamp et al., 2012). Ces deux promoteurs permettent de restreindre l'expression du transgène aux cellules dérivées des crêtes neurales.

De façon intéressante, les souris du groupe de J. Schulte exprimant seulement  $ALK^{F1174L}$  sont capables de générer des NB. Ces tumeurs se développent dans un contexte de pénétrance incomplète et de forte latence, indiquant qu'un évènement génétique supplémentaire est requis afin de générer ces tumeurs. Une souris sur les quatre décrites a développé une amplification secondaire de *MYCN*. Pour les trois autres animaux, les évènements génétiques ayant coopéré avec la mutation  $ALK^{F1174L}$  ne sont pas connus.

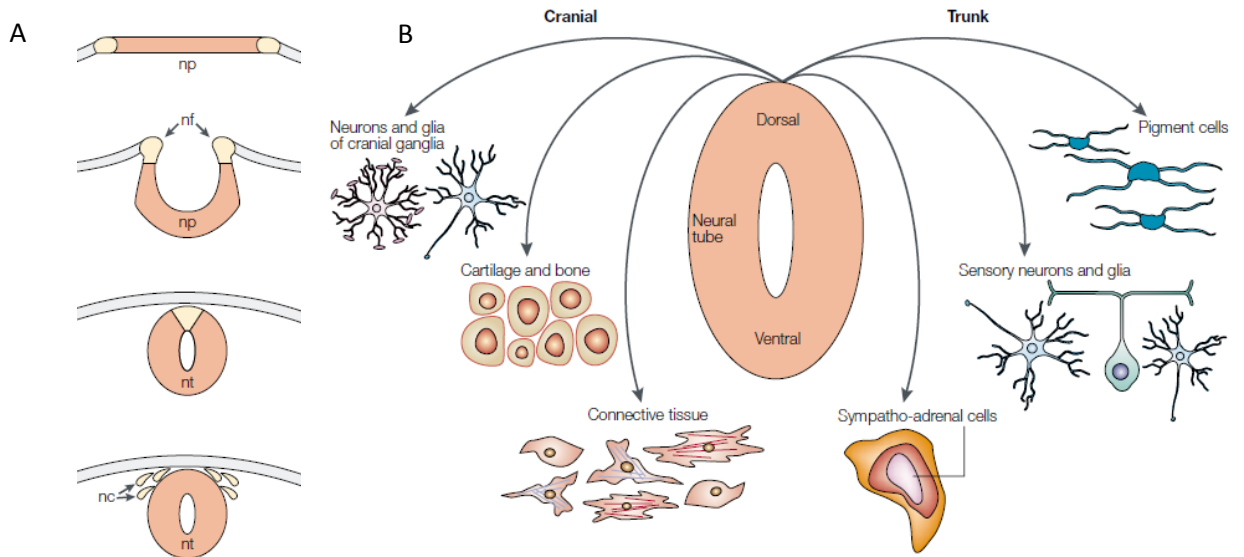
Dans les deux études, les souris transgéniques *ALK* ont été croisées avec des souris TH-*MYCN*. Les souris exprimant les deux transgènes (*ALK* et *MYCN*) développent des NB avec une pénétrance complète ainsi qu'une faible latence. Ces résultats mettent en évidence la coopération oncogénique entre la mutation  $ALK^{F1174L}$  et la surexpression de *MYCN* chez le mammifère. Les tumeurs présentent certaines propriétés biologiques et histologiques sont semblables à celles des NB humains. Un effet pro-transcriptionnel de *ALK* sur l'expression du gène *MYCN* a aussi été mis en évidence dans ces modèles.

Ces études montrent aussi que les tumeurs obtenues chez les animaux doubles transgéniques (*MYCN/ALK*) sont sensibles au NVP-TAE684, un inhibiteur spécifique de *ALK*, mais sont peu sensibles à l'effet du crizotinib (ou Xalkori, Pfizer). Ces données sont en accord avec les résultats d'expériences *in vitro* pour lesquelles une résistance de la mutation  $ALK^{F1174L}$  au crizotinib a été mise en évidence dans des lignées cellulaires de NB (Bresler et al., 2011). L'acquisition d'une résistance au crizotinib par l'acquisition d'une mutation  $ALK^{F1174L}$  a aussi été observée chez un patient atteint d'une tumeur myofibroblastique inflammatoire (Sasaki et al., 2010). Cependant les tumeurs *MYCN/ALK*<sup>F1174L</sup> partiellement résistantes au crizotinib seul sont très sensibles à une combinaison crizotinib et torin2, un inhibiteur de mTOR. Ces informations indiquent que la combinaison entre ces inhibiteurs du récepteur *ALK* et de la voie mTOR pourrait permettre de pallier aux résistances acquises par mutation secondaire chez des patients présentant un gène *ALK* réarrangé et traités au crizotinib. Elles indiquent aussi que cette approche thérapeutique peut être envisagée pour des patients atteints d'un NB avec une mutation du gène *ALK*.

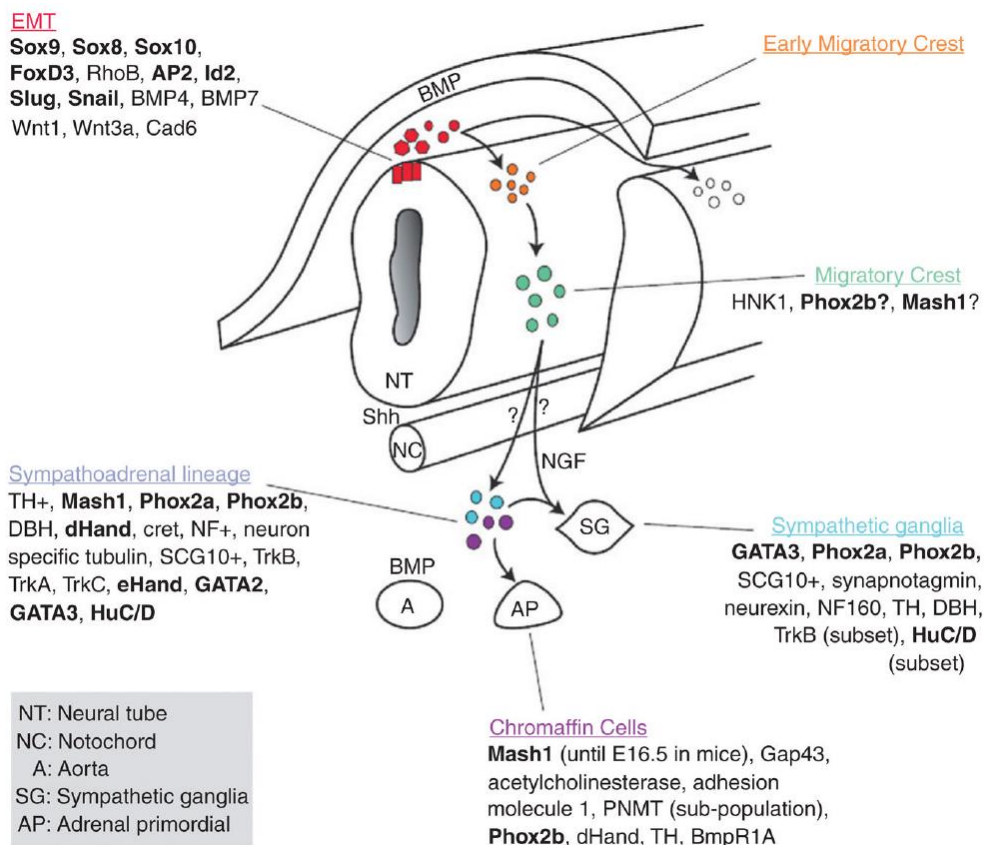


**Figure 1 : Les composantes sympathiques et parasympathiques du système nerveux autonome.** Au centre de l'image sont représentés les différents organes innervés par le système nerveux sympathique et parasympathique. On note aussi la représentation de la chaîne sympathique paravertébrale servant de relai d'informations entre les neurones pré-ganglionnaires provenant de la moëlle épinière et les neurones post-ganglionnaires innervant les organes. Les nerfs du système parasympathique prennent leur origine dans la boîte crânienne ou dans la région sacrée de la moëlle épinière. Ces deux systèmes nerveux ont des effets antagonistes (adapté de Lane et al., *Psychosomatic medicine*, 2009).

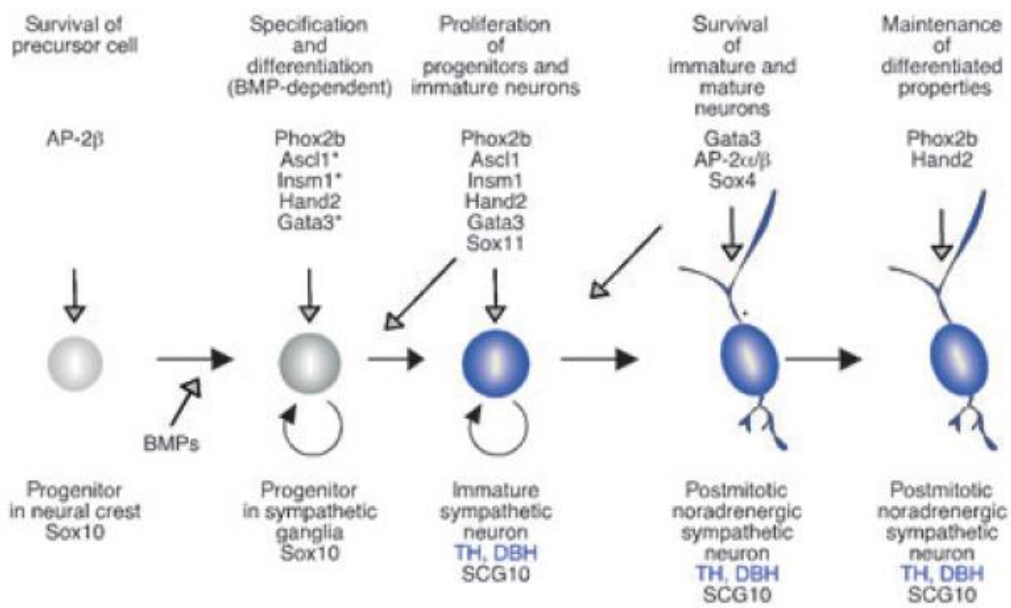




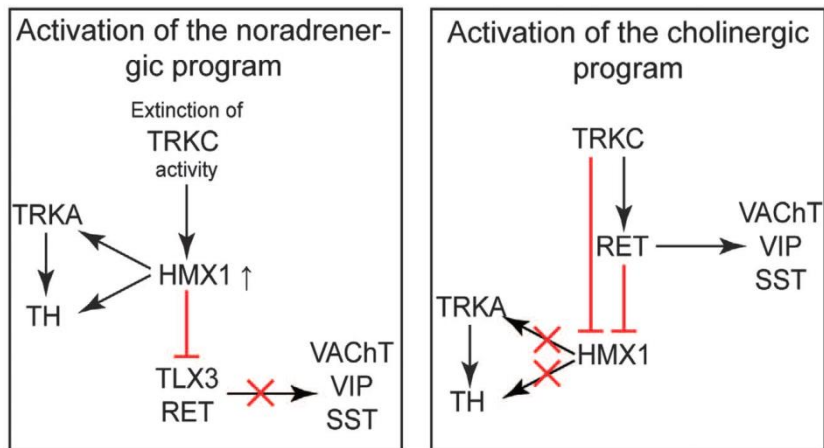
**Figure 2 : Formation et devenir des crêtes neurales.** A : la plaque neurale (np) apparaît le long de l'axe cranio-caudal au 19<sup>ème</sup> jour du développement embryonnaire chez l'homme. Celle-ci va se replier pour former le tube neural (nt) à la face postérieure duquel d'échapperont les cellules de la crête neurale (nc). B : Suite à leur migration et en fonction de leur position initiale les cellules de la crête neurale donneront différents types cellulaires (Knecht, Nat Rev, 2002).



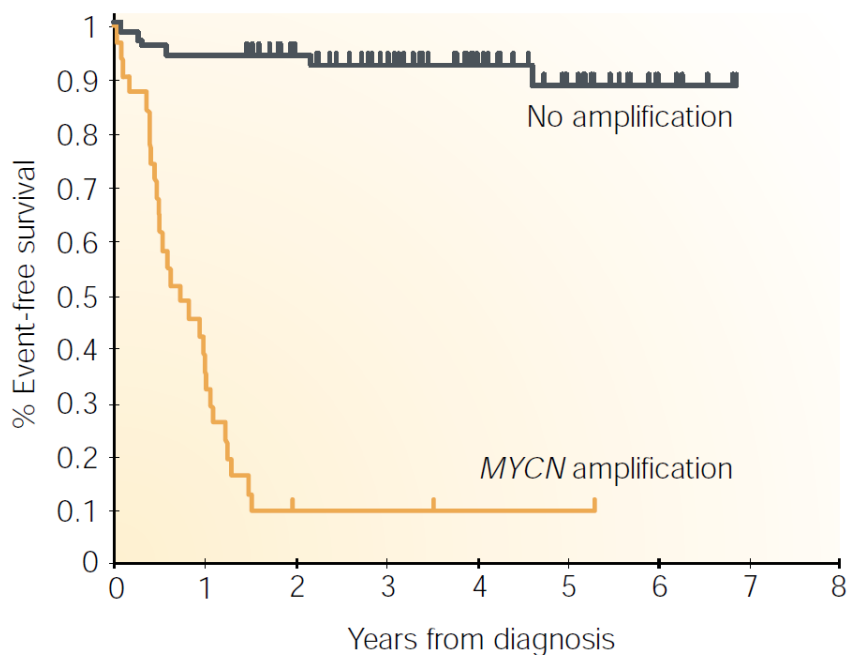
**Figure 3 : Migration des cellules de la crête neurale au cours du développement.** Les cellules de la crête neurale migrent vers l'aorte (A) afin de former soit un ganglion sympathique (SG) soit des cellules de la médullosurrénale (AP). Différents facteurs influencent leur migration et leur différenciation. (Jiang et al., Curr Top Dev Biol, 2013).



**Figure 4: Contrôle du développement des neurones sympathiques.** Ce schéma représente l'activation séquentielle des gènes impliqués dans la différenciation des neurones sympathiques. Ces gènes contrôlent aussi la prolifération et la survie des neurones (adapté de Rohrer et al., 2011).



**Figure 5: L'expression de TRKC et HMX1 régule l'acquisition de propriétés adrénérergiques et cholinérergiques.** Ce schéma représente l'hypothèse de régulation de la spécification des neurones sympathiques. Le niveau d'expression de TRKC semble être une balance régulant l'activité de HMX1 et RET. L'expression de HMX1 conduit à la répression des propriétés cholinérergiques et induit les propriétés adrénérergiques (Furlan et al., EMBO, 2013).



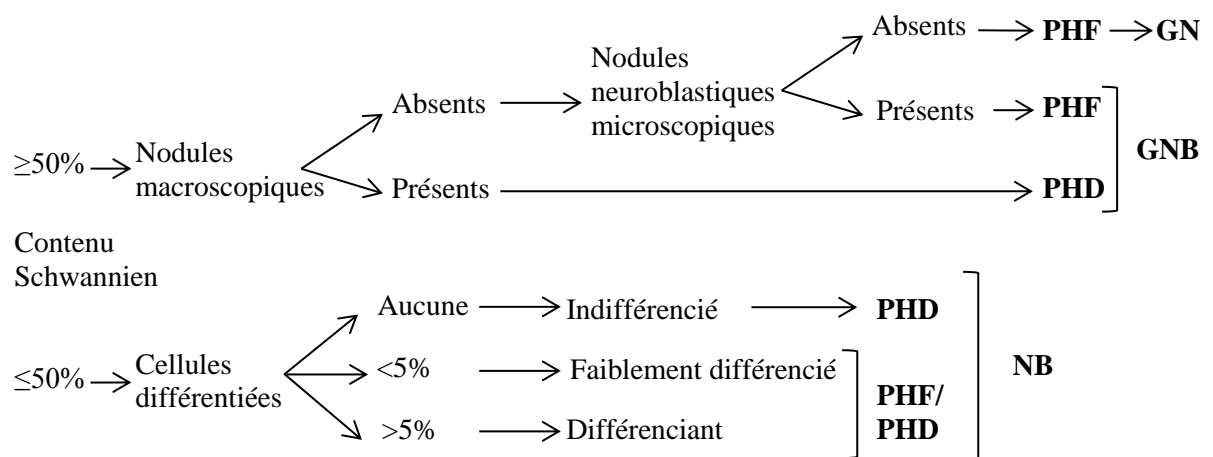
**Figure 6: L'amplification du gène MYCN dans le NB est un critère de très mauvais pronostic.** Le graphique indique le pourcentage de survie sans évènement pour des enfants de moins de 1 an avec des NB métastatiques présentant ou non une amplification du gène MYCN (Brodeur et al., Nat Rev Cancer, 2003).

Stades INSS	Critères
I	Tumeur localisée et limitée au site d'origine. Exérèse macroscopique complète avec ou sans résidus microscopiques. Ganglions lymphatiques homolatéraux histologiquement négatifs.
II-A	Tumeur localisée. Exérèse macroscopique incomplète. Ganglions lymphatiques homo et controlatéraux non envahis.
II-B	Tumeur unilatérale. Exérèse complète ou macroscopiquement incomplète. Ganglions lymphatiques homolatéraux envahis et controlatéraux non envahis.
III	Tumeur unilatérale non résectable et dépassant la ligne médiane. Ganglions lymphatiques envahis ou non. Ou tumeur unilatérale avec un envahissement des ganglions lymphatiques controlatéraux. Ou tumeur avec un envahissement ganglionnaire bilatéral.
IV	Tumeur métastatique avec dissémination au niveau des os, de la moelle osseuse, du foie, des ganglions lymphatiques distants et/ou d'autres organes (à l'exception des stades IV-S).
IV-S	Tumeur primaire localisée (stades I ou II) avec une dissémination métastatique limitée au foie, à la peau et/ou à la moelle osseuse chez des enfants diagnostiqués entre 0 et 1 an.

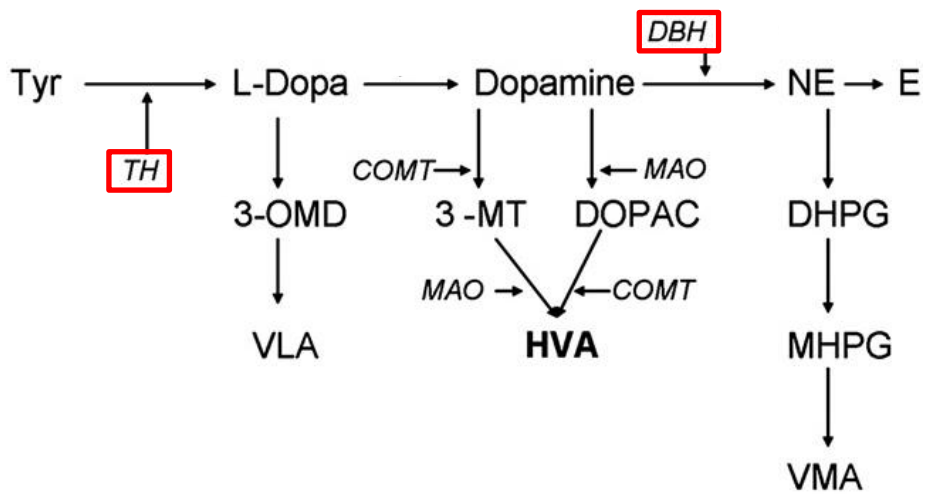
**Tableau 1 : Classification internationale INSS (International Neuroblastoma Staging System) du NB.** Cette classification permet de regrouper les patients en 6 stades INSS en fonction de critères cliniques post-opératoires (Brodeur GM, JCO, 1988 et Brodeur GM, JCO, 1993).

INRG Stage	Age (months)	Histologic Category	Grade of Tumor Differentiation	MYCN	11q Aberration	Ploidy	Pretreatment Risk Group	
L1/L2		GN maturing; GNB intermixed					A Very low	
L1		Any, except GN maturing or GNB intermixed		NA			B Very low	
				Amp			K High	
L2	< 18	Any, except GN maturing or GNB intermixed		NA	No		D Low	
					Yes		G Intermediate	
	≥ 18		GNB nodular; neuroblastoma	Differentiating	NA	No		E Low
				Poorly differentiated or undifferentiated	NA	Yes		H Intermediate
				Amp		N High		
M	< 18			NA		Hyperdiploid	F Low	
	< 12			NA		Diploid	I Intermediate	
	12 to < 18			NA		Diploid	J Intermediate	
	< 18			Amp			O High	
	≥ 18						P High	
MS					No		C Very low	
	< 18			NA	Yes		Q High	
					Amp			R High

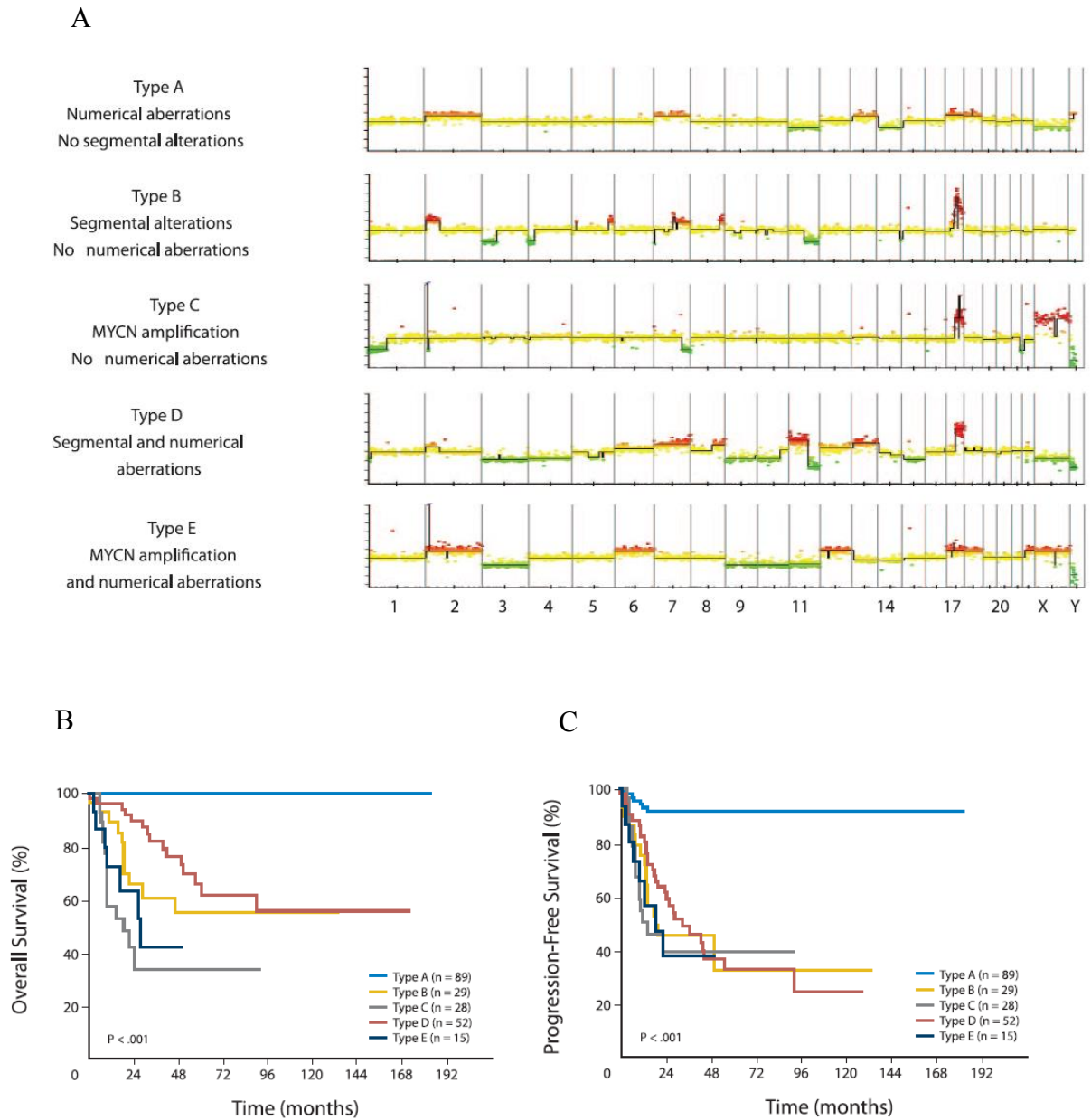
**Tableau 2: Classification internationale INRGSS (International Neuroblastoma Risk Group Staging System) du NB.** Cette classification permet de regrouper les patients en 5 stades INRG : le groupe L1 comprend les tumeurs localisées et unifocales ; le groupe L2 comprend les tumeurs ayant une invasion locorégionale ; le groupe M comprend les tumeurs métastatiques ; le groupe MS comprend les patients de moins de 18 mois ayant des tumeurs dont les métastases sont présentes uniquement au niveau du foie, de la moelle osseuse et de la peau. Des risques d'évolution différents sont associés à ces stades. Basé sur différents critères cliniques et biologiques pré-opératoires, ce système permet d'optimiser la prise en charge des patients (Cohn SL., JCO, 2009).



**Figure 7: Classification histologique simplifiée de Shimada.** La quantification du contenu en cellules de Schwann permet de séparer les neuroblastomes (NB) des autres tumeurs neuroblastiques. La présence de nodules neuroblastiques microscopiques permet de séparer les ganglioneuroblastomes (GNB) des ganglioneuromes (GN). Les neuroblastomes sont classés en trois catégories en fonction de leur pourcentage de cellules différenciées. Un facteur de risque est attribué pour chaque groupe (PHF : pronostic histologic favorable ; PHD : pronostic histologique défavorable) .L'âge de l'enfant ou encore le taux de prolifération cellulaire sont pris en compte dans certaines situations pour définir le facteur de risque (adapté de Shimada et al., Cancer, 1999).

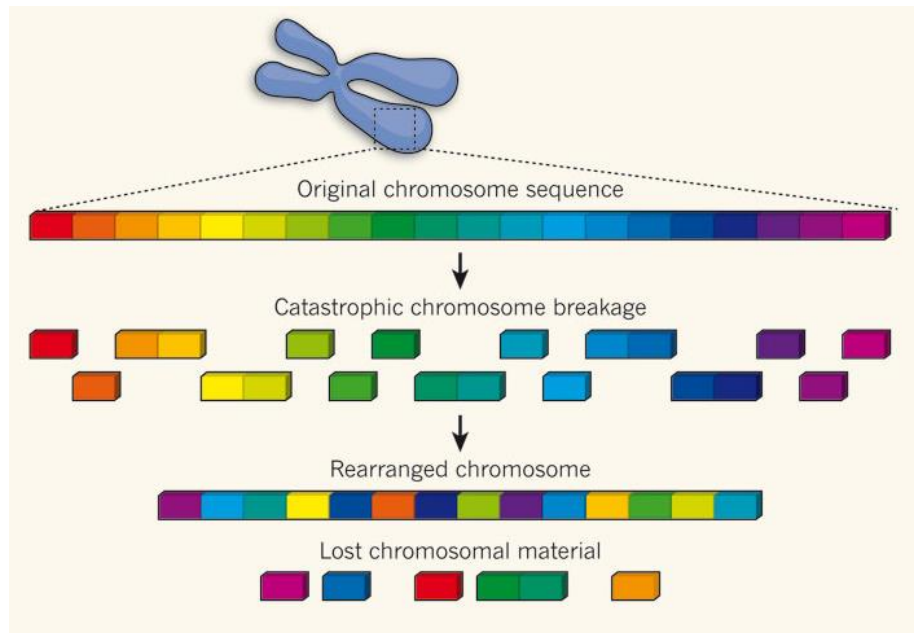


**Figure 8: Biosynthèse et catabolisme des catécholamines.** L'acide homovanillique (HVA) et l'acide vanillyl-mandélique (VMA) sont deux catabolites de la dopamine sécrétés par les NB. Tyr: tyrosine, TH: tyrosine hydroxylase, DBH: dopamine beta-hydroxylase, COMT: catechol-O-methyltransferase, MAO: monoamino oxidase, 3-OMD: 3-ortho-methyldopa, VLA:vanillin-lactic acid, 3-MT: 3-methoxytyramine, DOPAC:3,4-dihydroxyphenylacetic acid, DHPG: dihydroxyphenylglycol, MHPG: 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol, NE: norepinephrine, E: epinephrine (adapté de Marin-Valencia et al. Clin Biochem, 2008).

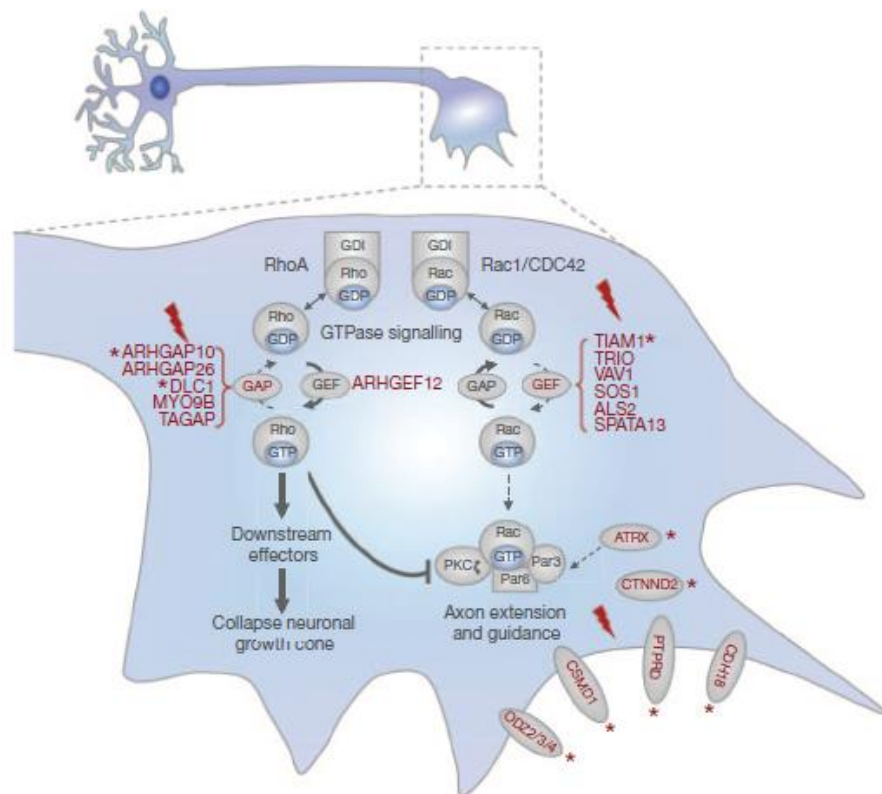


**Figure 9: Valeur pronostique du profil génomique global des tumeurs.** Les profils génomiques caractérisés par CGH-array des tumeurs permettent de définir 5 catégories en fonction du type d'altération chromosomiques (A). Les tumeurs présentant uniquement des gains ou des pertes de chromosomes entiers sont associés à une meilleure survie globale (B). Les tumeurs segmentaires sont associées à un risque de rechute plus important (C) que les tumeurs présentant des altérations chromosomiques segmentaires (Janoueix-Lerosey et al. JCO, 2008).



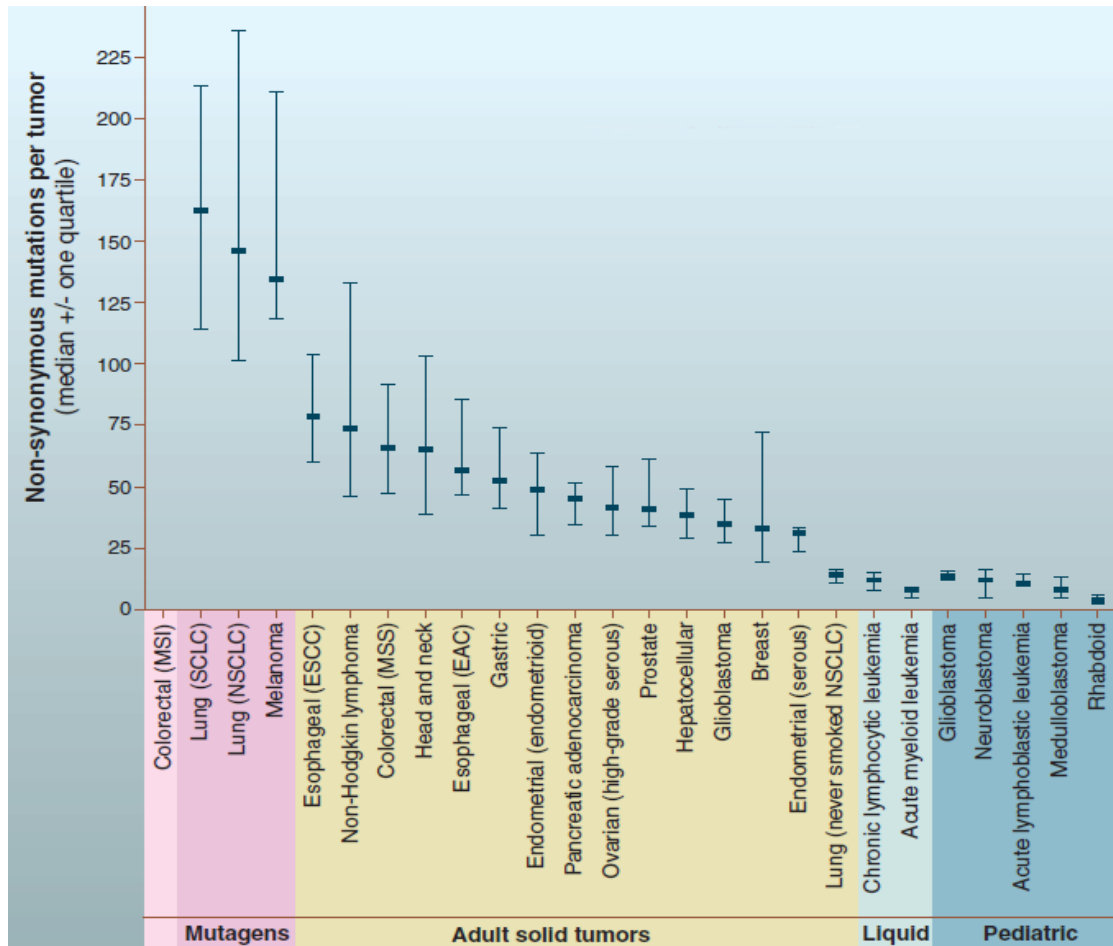


**Figure 10: Mécanisme de « chromothripsis ».** La fragmentation massive d'une région chromosomique conduit à une réassociation anarchique de certains fragments alors que d'autres sont perdus (adapté de Tubio et al., Nature, 2011).

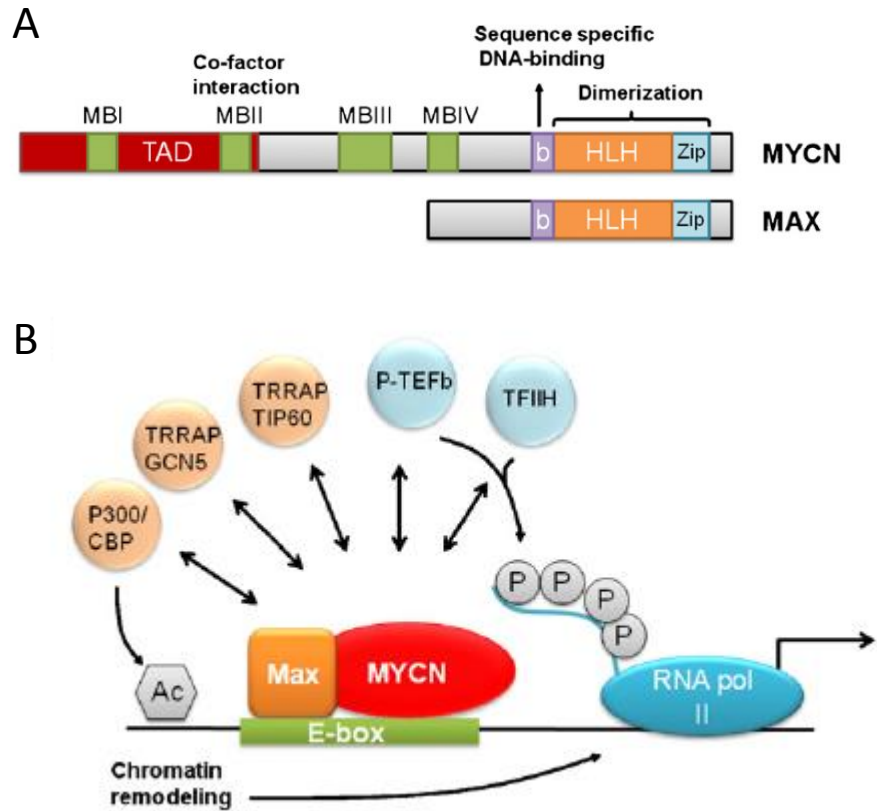


**Figure 11: Altérations de gènes impliqués dans la formation des neurites dans les NB à haut risque.** Représentation schématique d'un axone en expansion et de la fonction des gènes présentant des variants de structure ou des mutations ponctuelles dans le NB. Les gènes altérés sont représentés en rouge, avec une astérisque pour ceux altérés dans plusieurs tumeurs (Molenaar, Nature, 2012).

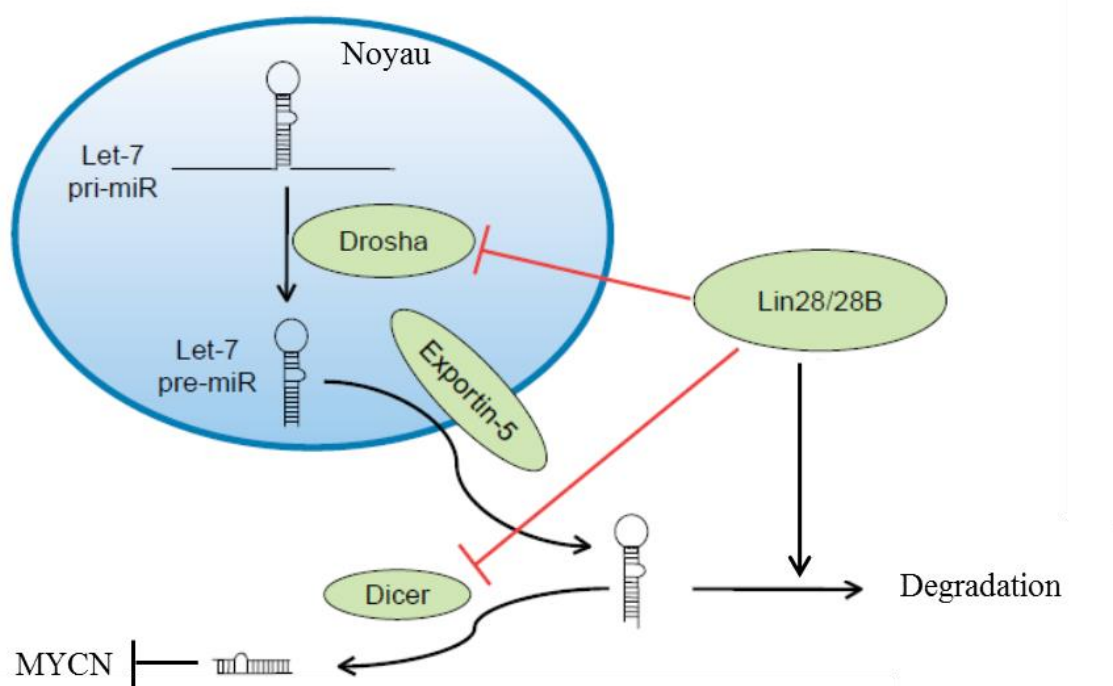




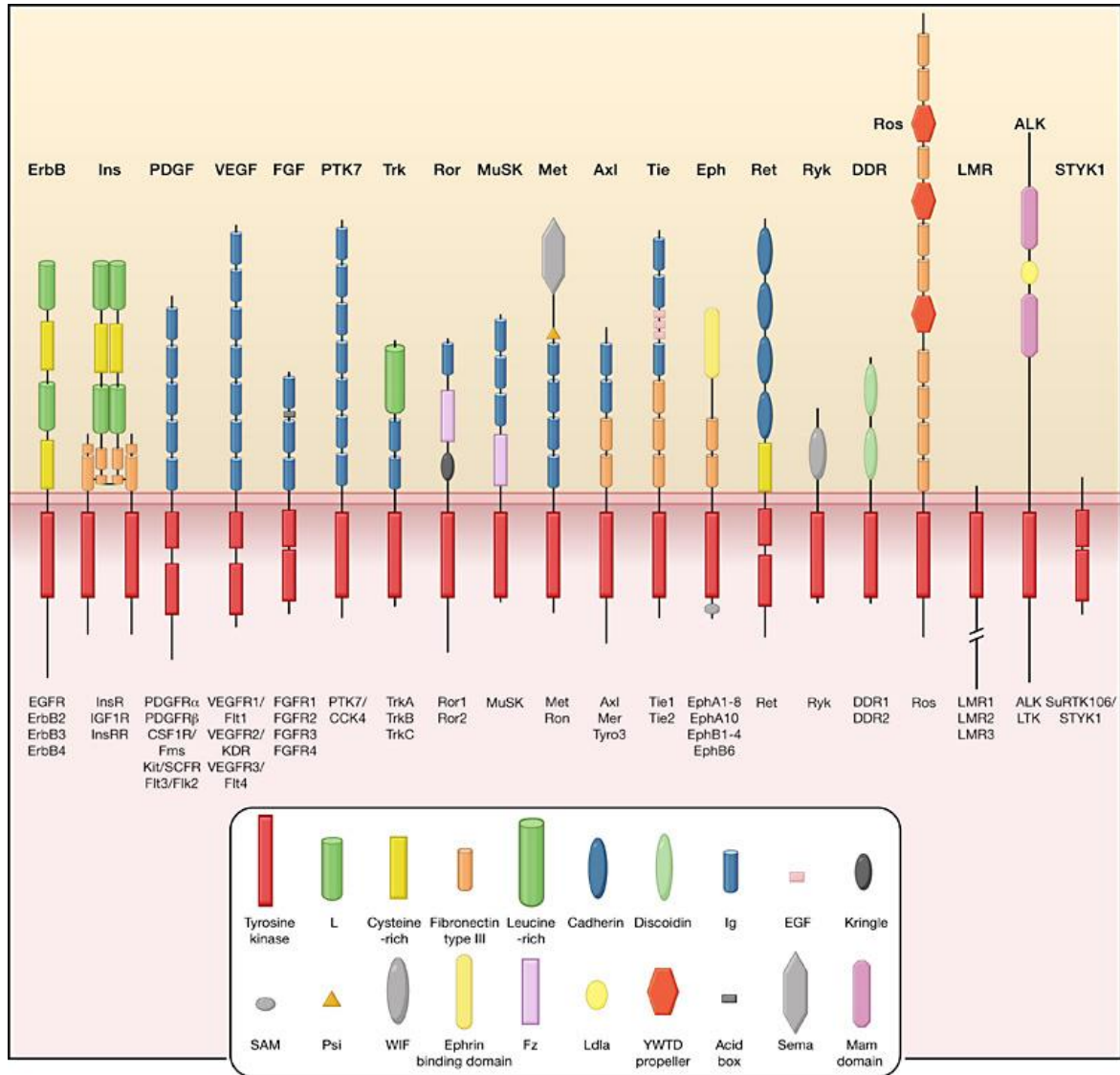
**Figure 12: Nombre de mutations ponctuelles non-synonymes identifiées dans différents cancers.** Ce graphique indique que les cancers de l'adulte, liés à des facteurs environnementaux, présentent un nombre de mutations élevé. Cependant la plupart de ces mutations n'ont pas un rôle majeur dans le développement tumoral. Au contraire, les tumeurs pédiatriques ont un taux de mutagenèse beaucoup plus faible. Le nombre de mutations d'un cancer est dépendant de l'âge auquel se développe la tumeur (Vogelstein et al., Science, 2013).



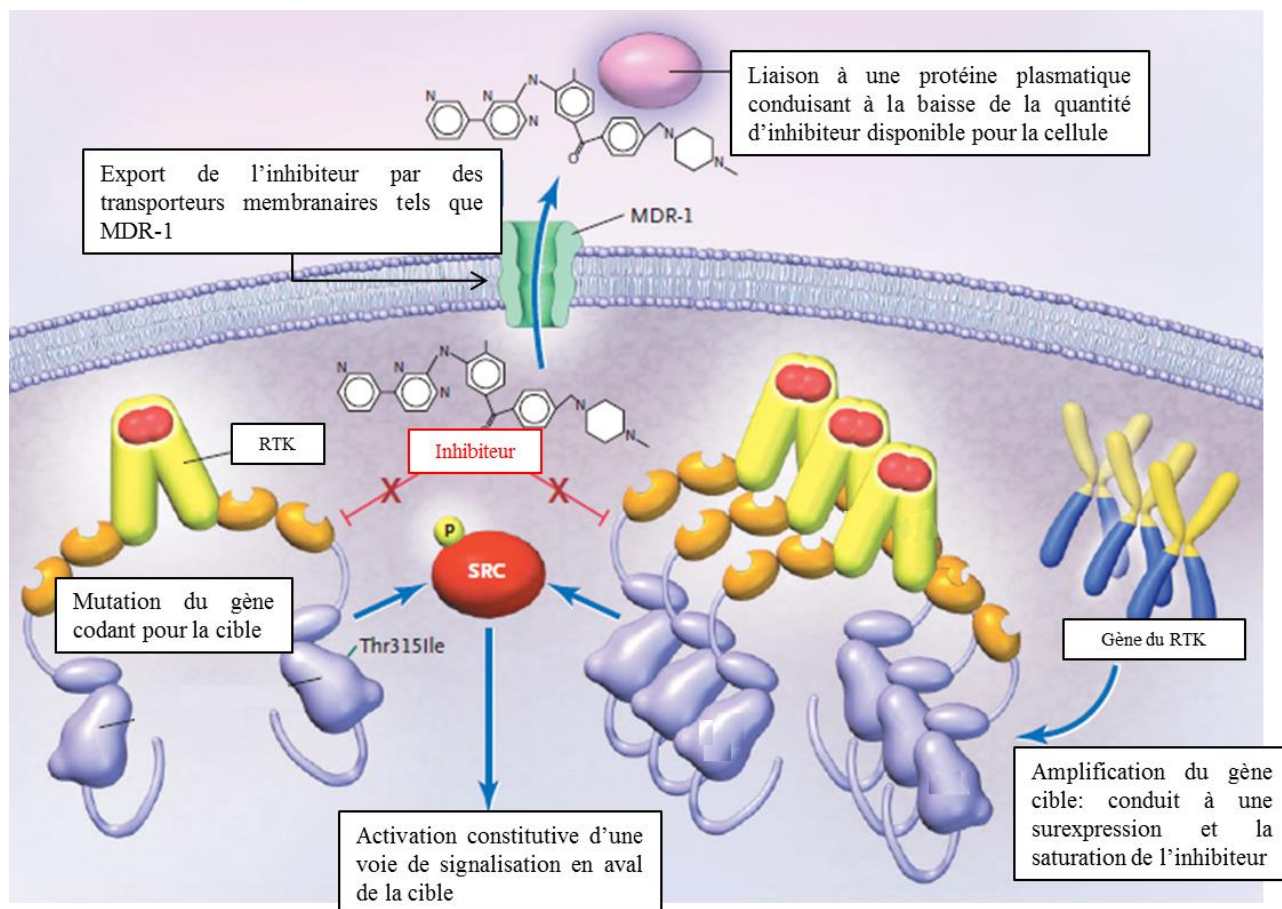
**Figure 13: Structure et activité des protéines MYCN et MAX.** (A) A la différence de la protéine MAX, le facteur de transcription MYCN contient un domaine d'activation de la transcription (TAD). Les deux protéines partagent le même domaine de dimérisation comportant un domaine hélix-loop-hélix (HLH) et un domaine leucine-zipper (Zip). (B) L'hétérodimère MYCN-MAX va pouvoir se fixer sur les régions E-box (Enhancer-box) en amont de gènes et y recruter des cofacteurs, ce qui conduira à la transcription du gène (Westermarck, *Sem Can Biol*, 2011).



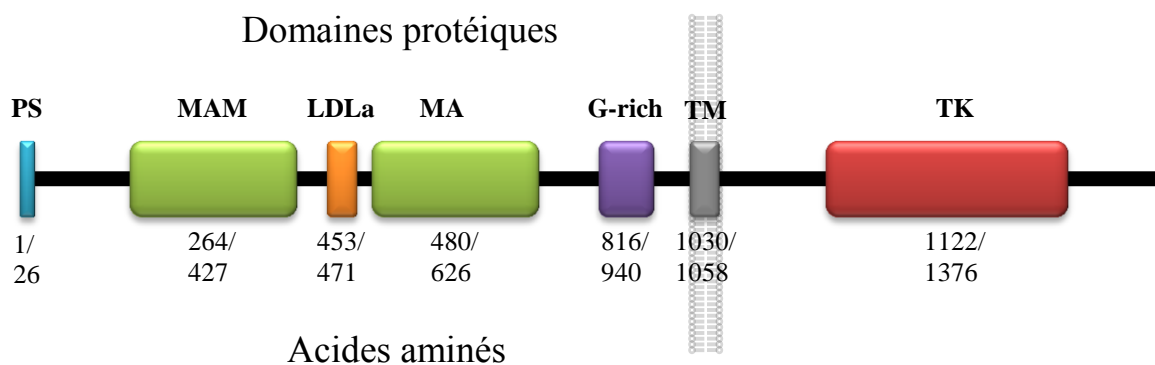
**Figure 14: Inhibition de l'effet suppresseur de tumeur du miR-Let-7 par Lin28B.** L'inhibition de Drosha et Dicer, deux enzymes clés de la maturation des miARN, par Lin28B conduit à la dégradation du pre-miR de Let-7. Ce dernier n'inhibe donc plus ses cibles dont MYCN fait partie (adapté de Boyerinas, *Endocrine-related cancer*, 2010).



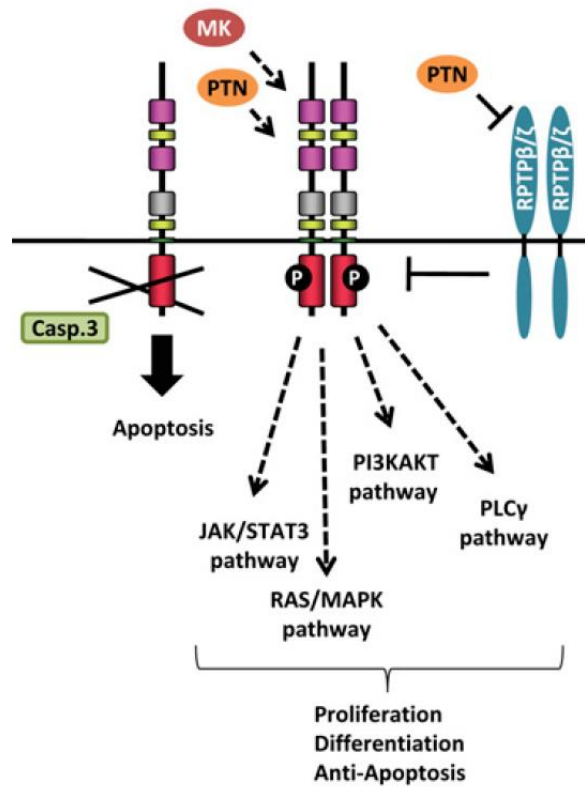
**Figure 15: Structure des 20 sous-familles de RTK.** Les membres de chaque famille sont indiqués sous la représentation du récepteur de la sous-famille concernée. Tous les RTK ont une structure commune comprenant un domaine extracellulaire avec domaine de liaison au ligand, un domaine trans-membranaire et une partie cytoplasmique contenant le domaine tyrosine kinase (Lemon et al., Cell, 2010).



**Figure 16: Mécanismes de résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase.** Les différents mécanismes qu'une cellule tumorale peut mettre en jeu afin de résister au traitement par un inhibiteur de tyrosine kinase sont résumés dans cette figure (adapté de Krause et al., NEJM, 2005).



**Figure 17: Structure du récepteur ALK.** Le récepteur ALK est un RTK, il présente donc une partie extracellulaire contenant différents domaines, un domaine trans-membranaire (TM) et une partie intracellulaire portant le domaine tyrosine kinase (TK). PS: Peptide Signal; MAM: Meprins/A5 protein/PTPmu and low density lipoprotein receptor type A; LDLa: Low Density Lipoprotein class a; G-rich: Glycine rich.



**Figure 18: Activation du récepteur ALK chez l'homme.** Il a été proposé que le récepteur ALK fasse partie de la famille des récepteurs à dépendance (Mourali et al., *Mol. Cell. Biol.*, 2007). Des expériences *in vitro* indiquent que lorsque le récepteur n'est pas activé, son clivage par la caspase 3 induit l'apoptose. La midkine (MK) et la pléiotrophine (PTN) ont été proposés comme ligands du récepteur ALK. Cette activation pourrait se faire indirectement par l'inhibition des récepteurs RPTPβ/ζ (Palmer RH, *Biochem J.*, 2009).

<b>Cancers</b>	<b>Partenaires du gène <i>ALK</i> dans les réarrangements</b>						
Lymphomes anaplasique à grandes cellules	ATIC	TPM3	TPM4	CLTC	NPM	TGF	MSN
Tumeur myofibroblastique inflammatoire	ATIC	TPM3	TPM4	CLTC	RANBP2		
Cancer du poumon non à petites cellules	EML4	TGF	KLC1	KIF5B			
Lymphome diffus à grandes cellules B	NPM	CLTC					
Cancer du sein	EML4						
Cancer colorectal	EML4						
Cancer de l'œsophage	TPM4						
Cancer du rein	VCL						
Plasmocytome	CLTC						

**Tableau 3: Partenaires du gène *ALK* dans les réarrangements chromosomiques.** De nombreux cancers présentent des réarrangements chromosomiques du gène *ALK* conduisant à l'expression de protéines de fusions. Plusieurs gènes partenaires du gène *ALK* sont impliqués dans ce mécanisme. Certains gènes sont partenaires dans plusieurs cancers (code couleur).

Cancers	Translocation	Surexpression	Gain/ amplification	Mutation
Neuroblastome				
Glioblastome				
Mélanome				
Carcinome pulmonaire				
Rétinoblastome				
Rhabdomyosarcome				
Tumeur d'ewing				
Léiomyosarcome				
Cancer de la thyroïde				
Lymphomes anaplasique à grandes cellules				
Tumeur myofibroblastique inflammatoire				
Cancer du poumon non à petites cellules				
Lymphome diffus à grandes cellules B				
Cancer du sein				
Cancer colorectal				
Cancer de l'œsophage				
Cancer du rein				
Plasmocytome				

**Tableau 4: Spectre des altérations du gène ALK dans le cancer.** Des anomalies génomiques et d'expression du gène ALK ont été identifiées dans de nombreuses tumeurs. On remarque que peu de cancers présentent des mutations ponctuelles. Elles sont assez fréquentes dans le NB, mais plus anecdotiques en ce qui concerne les cancers de la thyroïde et les rhabdomyosarcomes. Les références correspondant à ces informations sont citées dans le texte.



# **RESULTATS**

## Présentation des travaux

Afin d'analyser l'implication du gène *ALK* dans l'oncogenèse du NB, trois aspects ont été étudiés au cours de ma thèse. Le premier aspect concerne la régulation des protéines *ALK* mutées au sein de la cellule cancéreuse. Un second aspect de mon projet porte sur la caractérisation des réarrangements chromosomiques du gène *ALK* dans des tumeurs et lignés cellulaires de NB. En effet, le gène *ALK* est impliqué dans l'oncogenèse de multiples cancers à travers des réarrangements chromosomiques. Le but de cette étude était de déterminer si de tels mécanismes d'activation existent dans le NB. Enfin, la troisième partie de mon projet de thèse consiste à étudier les conséquences *in vivo* de l'expression de mutations ponctuelles activatrices du gène *ALK* identifiées chez des patients atteints de NB. L'analyse réalisée sur des souris knock-in (KI) m'a permis d'étudier le rôle développemental et tumorigène du gène *ALK*.

L'ensemble de ces travaux a donné lieu à 3 publications et un article soumis :

### Article I:

Mazot P, Cazes A, Boutterin MC, Figueiredo A, Raynal V, Combaret V, Hallberg B, Palmer RH, Delattre O, Janoueix-Lerosey I, Vigny M.

The constitutive activity of the *ALK* mutated at positions F1174 or R1275 impairs receptor trafficking. *Oncogene* **30**, 2017-25 (2011)

### Article en annexe:

Mazot P, Cazes A, Dingli F, Degoutin J, Irinopoulou T, Boutterin MC, Lombard B, Loew D, Hallberg B, Palmer RH, Delattre O, Janoueix-Lerosey I, Vigny M.

Internalization and down-regulation of the *ALK* receptor in neuroblastoma cell lines upon monoclonal antibodies treatment. *PLoS One* **7**, e33581 (2012).

Article II:

Cazes A, Louis-Brennetot C, Mazot P, Dingli F, Lombard B, Boeva V, Daveau R, Cappelletti J, Combaret V, Schleiermacher G, Jouannet S, Ferrand S, Pierron G, Barillot E, Loew D, Vigney M, Delattre O, Janoueix-Lerosey I.

Characterization of rearrangements involving the *ALK* gene reveals a novel truncated form associated with tumor aggressiveness in neuroblastoma. *Cancer Res.* **73**, 195-204 (2013).

Article III: soumis

Cazes A, Lopez-Delisle L, Tsarovina K, Pierre-Eugène C, De Preter K, Peuchmaur M, Nicolas A, Provost C, Louis-Brennetot C, Daveau R, Kumps C, Schleiermacher G, Prignon A, Speleman F, Rohrer H, Delattre O, Janoueix-Lerosey I.

Knock-in mice with activated Alk display prolonged neurogenesis as a predisposition step to neuroblastoma.

## Article I

### **The constitutive activity of the ALK mutated at positions F1174 or R1275 impairs receptor trafficking**

L'activation constitutive d'un RTK peut induire sa rétention intracellulaire associée à une maturation incomplète. Cet effet a notamment été décrit pour les récepteurs FLT3, EGFR, FGFR (Hatch et al., 2006; Schmidt-Arras et al., 2005; Supino-Rosin et al., 2000). Les mutations ponctuelles du gène *ALK* conduisent à une activation constitutive du récepteur, nous nous sommes donc intéressés au devenir des protéines ALK néosynthétisées au sein de la cellule tumorale. Les mécanismes conduisant aux propriétés oncogéniques des récepteurs ALK mutés n'ont pas été clairement décrits jusqu'à présent. Afin de mieux comprendre les conséquences biochimiques de ces mutations sur les fonctions du récepteur, nous avons étudié la localisation subcellulaire, l'état des modifications post-traductionnelles et le niveau d'activation du récepteur ALK. Le statut hétérozygote des mutations dans les lignées cellulaires de NB rend l'utilisation de ces cellules difficile pour ce type d'étude. Afin d'obtenir un modèle cellulaire n'exprimant qu'une seule forme de ALK, nous avons réalisé des lignées de NIH/3T3 exprimant stablement différentes formes du gène *ALK* ( $ALK^{Wt}$ ,  $ALK^{F1174L}$ ,  $ALK^{R1275Q}$ ). Les expériences ont aussi été conduites dans les lignées cellulaires de NB suivantes: (1) IMR32, exprimant uniquement ALK sauvage; (2) CLB-Ge, hétérozygote pour la mutation F1174V mais présentant une amplification de l'allèle muté, minimisant ainsi l'impact de la forme sauvage de ALK.

Les résultats de ce travail collaboratif avec l'équipe du Pr. Marc Vigny indiquent que, contrairement au récepteur ALK sauvage, majoritairement adressé à la membrane plasmique, le récepteur muté est retenu dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Cette rétention est associée à une glycosylation incomplète du récepteur. L'inhibition de l'activité tyrosine kinase du récepteur ALK par l'utilisation de l'inhibiteur NVP-TAE684 restaure la localisation membranaire et la maturation des récepteurs mutés. Cette rétention intracellulaire est donc la conséquence directe de l'activation constitutive du récepteur. L'utilisation d'un anticorps anti-ALK inhibiteur, conduisant à une dimérisation inefficace du récepteur, ne modifie pas le niveau d'activation des récepteurs mutés. Ceci suggère que, contrairement au récepteur sauvage, l'activation des récepteurs mutés ne nécessite pas de dimérisation.

L'utilisation d'un anticorps activateur augmente le niveau de phosphorylation des récepteurs ALK mutés indiquant que leur activation est incomplète.

L'utilisation de ces anticorps a aussi permis de réaliser une étude approfondie des conséquences de l'activation ou de l'inhibition du récepteur ALK. Nous avons ainsi pu montrer que les récepteurs membranaires sont régulés par dégradation lysosomale, alors que le pool intracellulaire est dégradé par le protéasome. Nous décrivons aussi que suite à l'activation du récepteur ALK membranaire par un anticorps activateur, la protéine activée est internalisée, majoritairement ubiquitinylée et adressée au protéasome pour y être dégradée. Lorsque ALK est inhibé par un anticorps inhibiteur, le récepteur n'est pas dégradé mais il est internalisé puis recyclé à la membrane plasmique. En conclusion, les récepteurs mutés et sauvages ont des localisations cellulaires différentes qui font intervenir des mécanismes de régulation différents. (Article en annexes)

ORIGINAL ARTICLE

# The constitutive activity of the ALK mutated at positions F1174 or R1275 impairs receptor trafficking

P Mazot<sup>1,2,3</sup>, A Cazes<sup>4</sup>, MC Bouterin<sup>1,2,3</sup>, A Figueiredo<sup>1,2,3</sup>, V Raynal<sup>4</sup>, V Combaret<sup>5</sup>, B Hallberg<sup>6</sup>, RH Palmer<sup>6</sup>, O Delattre<sup>4</sup>, I Janoueix-Lerosey<sup>4</sup> and M Vigny<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Université Pierre et Marie Curie, UPMC, Paris, France; <sup>2</sup>UMRS-839 INSERM, Paris, France; <sup>3</sup>Institut du Fer à Moulin (IFM), Paris, France; <sup>4</sup>Institut Curie, Centre de Recherche, Paris, France; <sup>5</sup>Centre Léon Bérard, FNCLCC, Laboratoire de Recherche Translationnelle, Lyon, France and <sup>6</sup>Department of Molecular Biology, Umea University, Umea, Sweden

Anaplastic lymphoma kinase (ALK) is a receptor tyrosine kinase (RTK), which is transiently expressed during development of the central and peripheral nervous system. ALK has been recently identified as a major neuroblastoma predisposition gene and activating mutations have also been identified in a subset of sporadic neuroblastoma tumors. Two hot spots of ALK mutations have been observed at positions F1174 and R1275. Here, we studied stably transfected cell lines expressing wild-type or F1174L- or R1275Q-mutated ALK in parallel with a neuroblastoma cell line (CLB-GE) in which the allele mutated at position F1174 is amplified. We observed that the mutated ALK variants were essentially intracellular and were largely retained in the reticulum/Golgi compartments. This localization was corroborated by a defect of N-linked glycosylation. Although the mutated receptors exhibited a constitutive activation, the minor pool of receptor addressed to the plasma membrane was much more tyrosine phosphorylated than the intracellular pool. The use of antagonist monoclonal antibodies suggested that the constitutive activity of the mutated receptors did not require the dimerization of the receptor, whereas adequate dimerization triggered by agonist monoclonal antibodies increased this activity. Finally, kinase inactivation of the mutated receptors restored maturation and cell-surface localization. Our results show that constitutive activation of ALK results in its impaired maturation and intracellular retention. Furthermore, they provide a rationale for the potential use of kinase inhibitors and antibodies in ALK-dependent tumors.

*Oncogene* advance online publication, 17 January 2011; doi:10.1038/onc.2010.595

**Keywords:** ALK; neuroblastoma; phosphorylation; ER retention; RTK

## Introduction

The intracellular domain of Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) has been initially identified in some anaplastic large cell lymphomas through the characterization of fusion proteins resulting from chromosomal translocations (for review see (Palmer *et al.*, 2009)). Full-length ALK receptor tyrosine kinase (RTKs) have been described in human, mouse, *Drosophila* and *Caenorhabditis elegans* (Iwahara *et al.*, 1997; Morris *et al.*, 1997; Loren *et al.*, 2001; Reiner *et al.*, 2008). The distribution of ALK transcripts strongly suggests that this receptor could have an important role in the normal development and function of the nervous system (Iwahara *et al.*, 1997; Morris *et al.*, 1997; Vernersson *et al.*, 2006). However, in vertebrates the biological functions of this receptor are largely unknown.

Recently, the full-length receptor ALK has been characterized as a neuroblastoma predisposition gene and was shown to be also involved in a subset of sporadic neuroblastoma cases (Caren *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2008; George *et al.*, 2008; Janoueix-Lerosey *et al.*, 2008; Mosse *et al.*, 2008). Indeed, activating ALK mutations were identified in both familiar and sporadic cases of neuroblastoma with two hot spots occurring at positions F1174 and R1275 (Janoueix-Lerosey *et al.*, 2010).

The neuroblastoma cell lines in which ALK point mutations have been identified are heterozygous and therefore express both the wild-type and the mutated receptor. In this study, we investigated the status of stably transfected NIH3T3 cell lines expressing the wild-type ALK (ALK-WT) receptor or the F1174L-mutated ALK (ALK-F1174L) or the R1275Q-mutated ALK (ALK-R1275Q). In parallel, we investigated a neuroblastoma cell line (CLB-GE) that carries an amplified allele coding for F1174V-mutated ALK (Janoueix-Lerosey *et al.*, 2008). To be able to clarify the ALK biological roles in the absence of an established ALK cognate ligand(s) in vertebrates (for review see (Palmer *et al.*, 2009)), we employed monoclonal antibodies (mAb), which are able to stimulate or inhibit the ALK-WT activity (Moog-Lutz *et al.*, 2005; Mathivet *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007).

We first observed that the ALK-WT was present at the plasma membrane but also exhibited an intracellular

Correspondence: Dr M Vigny, UMR\_S839 INSERM, Université Pierre et Marie Curie, UPMC, 17 rue du Fer à Moulin, Paris 75005, France.

E-mail: marc.vigny@inserm.fr

Received 15 November 2010; revised 2 December 2010; accepted 3 December 2010

localization. In contrast, mutated forms of ALK were essentially retained intracellularly in the reticulum/Golgi compartment, which is characteristic of misfolded proteins. Kinase inactivation restored receptor maturation and plasma membrane addressing. Importantly, this cellular localization largely influenced the constitutive activity of the mutated receptors.

## Results

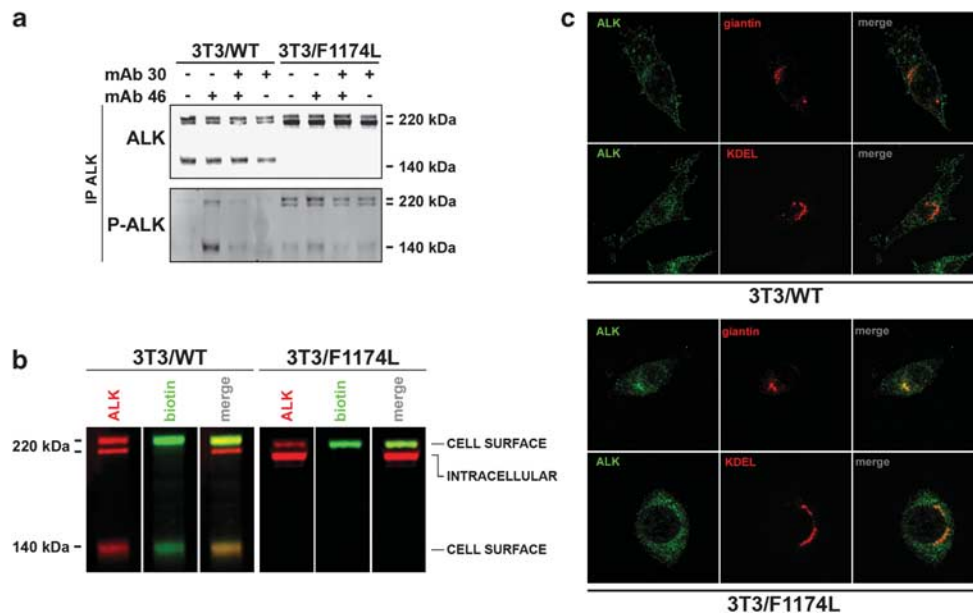
### *The wild-type ALK receptor is partially addressed to the plasma membrane*

In the developing brain (Iwahara *et al.*, 1997; Morris *et al.*, 1997), in neuroblastoma cell lines endogenously expressing ALK (Miyake *et al.*, 2002; Motegi *et al.*, 2004; Mathivet *et al.*, 2007; George *et al.*, 2008) or in cells expressing this receptor after transfection (Moog-Lutz *et al.*, 2005), ALK is expressed as the 220 kDa full-length receptor and a shorter form of 140 kDa (Figure 1). We previously established that the 140 kDa species results from an extracellular cleavage of the 220 kDa form (Moog-Lutz *et al.*, 2005). The protein band at 220 kDa often appeared as a doublet of two closed ALK molecules, the nature of which has not yet been determined (Mourali *et al.*, 2006; Mathivet *et al.*, 2007). ALK-WT stably expressed in NIH 3T3 cell lines

(named 3T3/WT) exhibited almost no basal tyrosine phosphorylation (Figure 1a). Addition of agonist mAb46 resulted in a strong phosphorylation of the upper band of 220 kDa doublet and of the 140 kDa form, but not of the 220 kDa lower band (Figure 1a). As previously established, antagonist mAb30 strongly inhibited the activation triggered by mAb46. mAb30 dimerizes and locks two ALK receptor molecules in a conformational state in which no trans-activation of the tyrosine kinase domain can occur (Moog-Lutz *et al.*, 2005). The phosphorylation of the lower band of the 220 kDa doublet did not exhibit any change upon agonist and/or antagonist mAbs treatments. It suggested that this band was not accessible to the mAbs, possibly because of an intracellular localization. We performed cell-surface protein biotinylation procedures on 3T3/WT and demonstrated that the lower band of the 220 kDa doublet was indeed intracellular as it was stained by ALK antibodies but not by biotin. On contrary, both the upper 220 kDa band and the 140 kDa form were stained by streptavidin, indicating localization at the plasma membrane (Figure 1b).

### *Constitutive activation and cellular localization of the ALK-F1174L mutant*

We next employed NIH3T3 cell lines stably transfected with ALK-F1174L (named 3T3/F1174L). In these cell



**Figure 1** Constitutive activity and cellular localization of wild-type and F1174L-mutated ALK. (a) 3T3/WT ALK and 3T3/F1174L cells were untreated (lane 1), treated with 6 nM of agonist mAb46 for 20 min (lane 2), pretreated with 48 nM of mAb30 for 30 min and then with 6 nM of mAb46 for 20 min (lane 3) or treated with 48 nM of antagonist mAb30 for 50 min (lane 4). Cell extracts were prepared by lysing the cells in a RIPA buffer and subjected to immunoprecipitation. Immunoprecipitates were subjected to immunoblotting using anti-phosphotyrosine (4G10) or polyclonal anti-ALK (REAB). (b) 3T3/WT and 3T3/F1174L cells were incubated with 0.5 mg/ml EZ-Link Sulfo-NHS-LC-biotin for 30 min on ice, and then washed with cold PBS-Glycin 0.1 mM. ALK were immunoprecipitated from cell lysates and submitted to western blot analysis. Total ALK were detected with polyclonal anti-ALK (Zymed) and secondary anti-rabbit IgG coupled to IRdye700 (in red), biotinylated ALK (cell surface receptor) with streptavidin coupled with IRdye800 (in green). (c) Immunofluorescence confocal microscopy analysis of subcellular localization ALK in 3T3/WT and 3T3/F1174L. Cells were fixed with paraformaldehyde and permeabilized with Triton X-100 before staining. Cells were immunostained, respectively, for ALK (mAb46/15, in green) (upper panel) and Golgi apparatus (polyclonal anti-Giantin, in red) or ALK (polyclonal anti-ALK Zymed, in green) and endoplasmic reticulum (monoclonal anti-KDEL, in red) (lower panel).

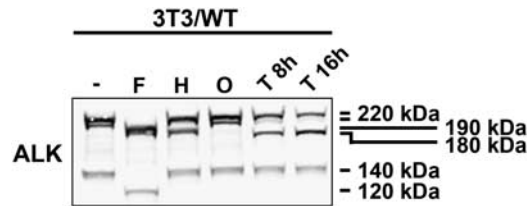
lines the protein band at 220 kDa also appeared as a doublet of ALK, but compared with cell lines expressing the WT receptor, the lower band was much more intense than the upper band (Figure 1a). With respect to the data obtained with the WT receptor (see above), this suggests that the ALK F1174L mutant is largely intracellularly localized. For 3T3/F1174L, cell-surface biotinylation of plasma membrane proteins indeed confirmed that the lower band of 220 kDa doublet was intracellular (Figure 1b). It should be added that the 140 kDa form was hardly discernable in the extracts of the mutated cell lines. This result was expected as the mutated forms of ALK are largely intracellular and the 140 kDa species results from an extracellular cleavage of the full-length 220 kDa form.

When compared with ALK-WT, the mutated receptor exhibited a constitutive activation but intriguingly the minor pool of receptors addressed to the plasma membrane (upper 220 kDa band) was much more tyrosine phosphorylated than the intracellular pool (lower 220 kDa band, Figure 1a). Agonist mAb46 treatment increased the phosphorylation both of the upper band of the 220 doublet and of the 140 kDa form, the forms present at the plasma membrane. The antagonist mAb30 indeed reduced the degree of induced phosphorylation by mAb46 of ALK-F1174L. However, this mAb30 had no effect on the basal phosphorylation of the upper band of 220 kDa doublet (the sole form accessible to the mAbs) suggesting that the constitutive activity of the ALK-F1174L receptor does not require ligand-induced dimerization (Figure 1a). In contrast, agonist mAb46 increased the basal phosphorylation of ALK-F1174L (Figure 1a) suggesting that this constitutive activation is incomplete and can be further increased by the dimerization triggered in presence of agonist mAbs.

Finally, confocal microscopy after immunofluorescence staining experiments revealed that ALK-WT in 3T3/WT cells was partially located at the plasma membrane but also exhibited an intracellular localization. In agreement with biotinylation experiments, ALK-F1174L in these cells was essentially intracellular. Both intracellular ALK-WT and ALK-F1174L largely colocalized with markers of the reticulum and Golgi apparatus (Figure 1c).

#### *The lower band of 220 kDa doublet is partially glycosylated*

The fact that the phosphorylation of the lower band of the 220 kDa doublet was not modulated by mAb treatments suggested that it was not accessible to the mAbs because of an intracellular localization. We therefore hypothesized that the difference between the two forms of the 220 kDa doublet may correspond to different degrees of glycosylation. The processing of *N*-linked glycosylation of transmembrane-bound proteins occurs in several steps (Kornfeld and Kornfeld, 1985) and full glycoprotein maturation is necessary for plasma membrane targeting (Helenius and Aebi, 2004). In the endoplasmic reticulum there is first an acquisition



**Figure 2** The lower band of the 220 kDa doublet of wild-type ALK is Endo-H-sensitive and partially processed. ALK immunoprecipitates from 3T3/WT cell extract were incubated with N-glycosidase F (lane 2, F) or endoglycosidase H (lane 3, H) or O-glycosidase (lane 4, O). Deglycosylation profiles were compared with nontreated immunoprecipitate (lane 1) and with immunoprecipitates of 3T3/WT cells treated with 10 µg/ml tunikamycin for 8 and 16 h (lanes 5 and 6, T) by western blot analysis using polyclonal anti-ALK (REAB).

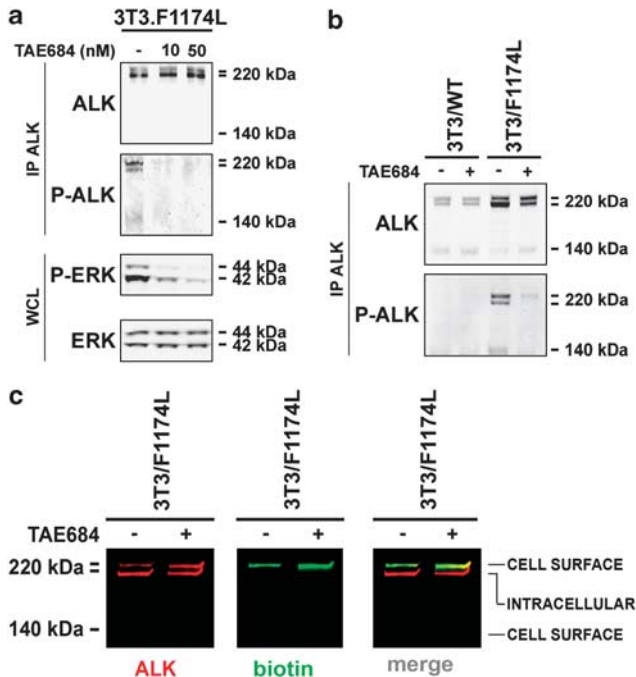
of *N*-linked oligosaccharides, followed by the removal of terminal glucose and mannose residues. The partially processed polypeptide is then transported to Golgi apparatus, in which mannose residues are further trimmed and *N*-acetylglucosamine, galactose and sialic acid residues are sequentially added. This glycosylation process can be partially revealed using endoglycosidase H, which cleaves high mannose-containing immature *N*-linked carbohydrates and endoglycosidase F, which cleaves both the immature *N*-linked carbohydrates and complex-type oligosaccharides from glycoproteins. In response to endoglycosidase F treatment, molecular mass of ALK-WT decreased for the 220 kDa doublet to about 190 kDa and for the 140 kDa form to 120 kDa. In contrast, only the lower band of the 220 kDa doublet was sensitive to endoglycosidase H treatment, indicating that this band corresponds to a partially glycosylated form of ALK likely retained in the endoplasmic reticulum (Figure 2). Endoglycosidase O had no effect. We also treated the same cell line with tunikamycin (a classical inhibitor of asparagine-linked glycosylation). A band of about 180 kDa corresponding to the newly synthesized completely nonglycosylated receptor was detected.

Treatment of ALK immunoprecipitated from 3T3/F1174L cell extract with endoglycosidase F, H or O led to identical conclusions (data not shown and see below).

#### *The constitutive activity of ALK-F1174L controls its intracellular localization*

The retention in the reticulum is characteristic of misfolded proteins (Helenius and Aebi, 2004). We therefore investigated whether the constitutive activity of ALK-F1174L could induce its retention in the reticulum and Golgi apparatus. To address this question, we used the selective ALK tyrosine kinase inhibitor NVP-TAE684 (TAE) (Galkin *et al.*, 2007). We reasoned that inhibition of the constitutive activity of ALK-F1174L might modify its cellular localization. First, we investigated the effect of TAE on the activation of the wild-type form of ALK. In 3T3/WT cells there was no basal activation of either ALK or Erk 1/2





**Figure 3** Effects of tyrosine kinase inhibitor NVP-TAE684 on F1174L-mutated ALK. (a) 3T3/F1174L cells were nontreated (lane 1) or treated with 10 nM (lane 2) or with 50 nM (lane 3) of NVP-TAE684 (TAE) for 1 h. Cells extracts were western-blotted with antibodies against phospho-ERK1/2 and total ERK1/2, and ALK immunoprecipitates were subjected to immunoblotting with anti-phosphotyrosine antibody (4G10) and anti-ALK (REAB). (b) 3T3/WT (lanes 1–2) and 3T3/F1174L (lanes 3–4) cells were nontreated (lanes 1–3) or treated with 50 nM of TAE for 24 h (lanes 2–4). ALK immunoprecipitates from cell extracts were analyzed by western blot with anti-ALK antibody (REAB) and anti-phosphotyrosine antibody (4G10). (c) 3T3/F1174L cells were incubated (+) or not (–) with 50 nM of TAE for 24 h. They were then subjected to biotinylation procedure as described in Figure 1b. ALK immunoprecipitates were submitted to western blot analysis. Total (in red) and biotinylated ALK (cell surface receptor, in green) were detected as described in Figure 1b.

kinases (Figure 1a). Upon stimulation with the mAb46, the wild-type ALK receptor is phosphorylated and mediates phosphorylation of downstream targets, such as Erk 1/2 (Figure 1a). Treatment with TAE at concentration of 50 nM before stimulation inhibits the induced phosphorylation of the 220 and 140 kDa forms of wild-type ALK receptor (Supplementary Figure S1).

In NIH 3T3 cells, basal phosphorylation of ALK-F1174L was completely inhibited after 1 h incubation in presence of 10 nM of TAE (Figure 3a). The TAE inhibition occurred rapidly (less than 15 min) and persisted for at least 24 h without any further addition of the inhibitor (Figure 3b). Further, inhibition of the ALK-F1174L by TAE correlates with a decreasing phosphorylation of the Erk kinases (Figure 3a). Thus, the constitutive activation mediated by the ALK F1174L receptor, which mediates the phosphorylation of downstream target, such as the Erk kinase pathway, is likely to be important for neuroblastoma progression.

After a 24 h treatment with 50 nM TAE, the pattern of expression of the ALK-WT was unchanged. In contrast for ALK-F1174L, the TAE treatment induced an

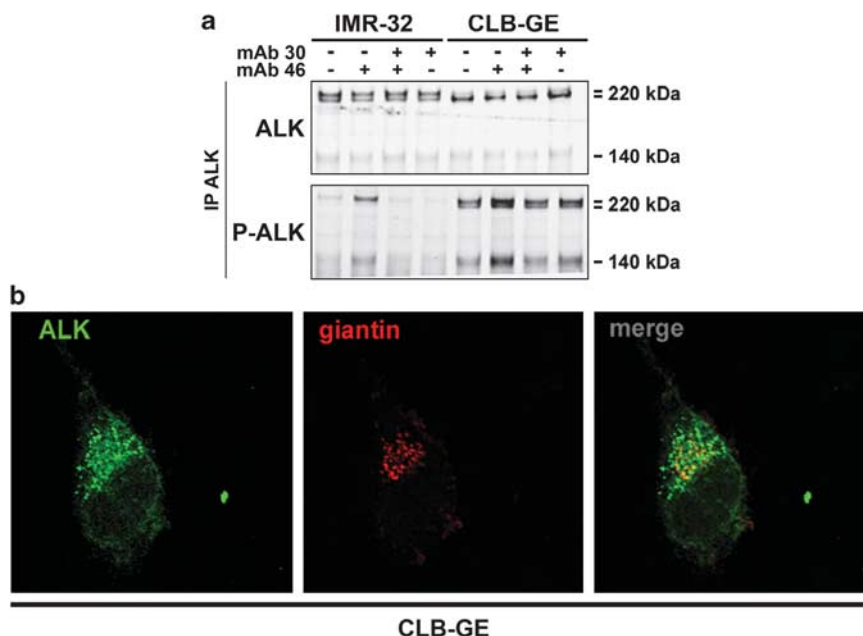
important diminution of the lower band of 220 kDa doublet leading to a pattern of expression similar to that of the WT receptor (Figure 3b). Therefore, kinase inhibition restored receptor maturation and cell-surface localization as demonstrated by biotinylation experiments (Figure 3c).

#### *Constitutive activity and intracellular localization of ALK-F1174V in CLB-GE cells*

The allele mutated at position F1174 (F1174V) is amplified (Janoueix-Lerosey *et al.*, 2008) in the CLB-GE neuroblastoma cell line. This cell line provided us with the opportunity to analyze the properties of this mutated receptor with endogenous expression and highly predominant with respect to the WT form. In this cell line, ALK was essentially present as the lower intracellular band of the 220 kDa doublet (Figure 4a). Biotinylation experiments (Supplementary Figure S2A) further confirmed that this band was intracellular. Treatments with endoglycosidase H and F confirmed that this band indeed correspond to a glycoprotein containing immature *N*-linked carbohydrates (Supplementary Figure S2B). ALK-F1174V exhibited a constitutive activation (comparison with the IMR-32 neuroblastoma cell line that expressed only ALK-WT) but again the minor pools of receptors addressed to the plasma membrane were much more tyrosine phosphorylated than the intracellular pool (Figure 4a). The antagonist mAb30 had no effect on the basal phosphorylation of the upper band of 220 kDa doublet, whereas mAb46 increased this basal phosphorylation (Figure 4a). Again these results suggested that the constitutive activity of the mutated receptor did not require its dimerization, whereas it could be further increased by an adequate dimerization triggered in the presence of agonist mAbs. Immunocytochemical experiments also indicated that the ALK receptor in the CLB-GE cells was essentially intracellular (Figure 4b).

#### *Constitutive activation and cellular localization of the ALK-R1275Q mutant*

We next investigated the status of ALK mutated at position R1275. For that purpose we used three NIH3T3 cell lines stably transfected with ALK-R1275Q (named 3T3/R1275Q). The properties of ALK-R1275Q receptor were highly similar but not identical to those found and described for the ALK F1174L mutant. First, concerning the relative ratio of the two bands of the 220 kDa doublet, the lower band was much more intense than the upper band (Figure 5a). Note, however, that, compared with the ALK F1174L mutant, the upper band of the 220 kDa doublet was more expressed (compare Figures 1a and 5a) suggesting that the ALK-R1275Q receptor is proportionally more addressed to the plasma membrane than the other mutant. This hypothesis was supported by the fact that the 140 kDa form resulting from an extracellular cleavage of the full-length receptor was clearly discernable (Figure 5a). Yet cell-surface biotinylation of plasma membrane proteins indeed confirmed that the lower



**Figure 4** Intracellular retention of mutated F1174V ALK in neuroblastoma cell line CLB-GE. (a) IMR-32 (lane 1–4) or CLB-GE cells (lanes 5–8) were untreated (lane 1–5), treated with 48 nM of antagonist mAb30 for 50 min (lane 2–6), treated with 6 nM of agonist mAb46 for 20 min (lane 3–7) or pretreated with 48 nM of mAb30 for 30 min and then treated with 6 nM of mAb46 for 20 min (lanes 4–8). Cells extracts were subjected to immunoprecipitation and immunoprecipitates were submitted to western blot analysis using polyclonal anti-ALK (REAB) or anti-phosphotyrosine (4G10). Important note: mutated ALK is amplified in the CLB-GE cell line. Thus, to allow a comparison of the phosphorylation profiles between the two cell lines, similar amounts of immunoprecipitates ALK were loaded. This blot is not representative of the level of expression of the receptor between the two cell lines. (b) Immunofluorescence confocal microscopy analysis of subcellular localization ALK in CLB-GE cells. Cells were fixed with paraformaldehyde and permeabilized with Triton X-100 before staining. Cells were immunostained, respectively, for ALK (mAb46/15, in green) and Golgi apparatus (polyclonal anti-Giantin, in red).

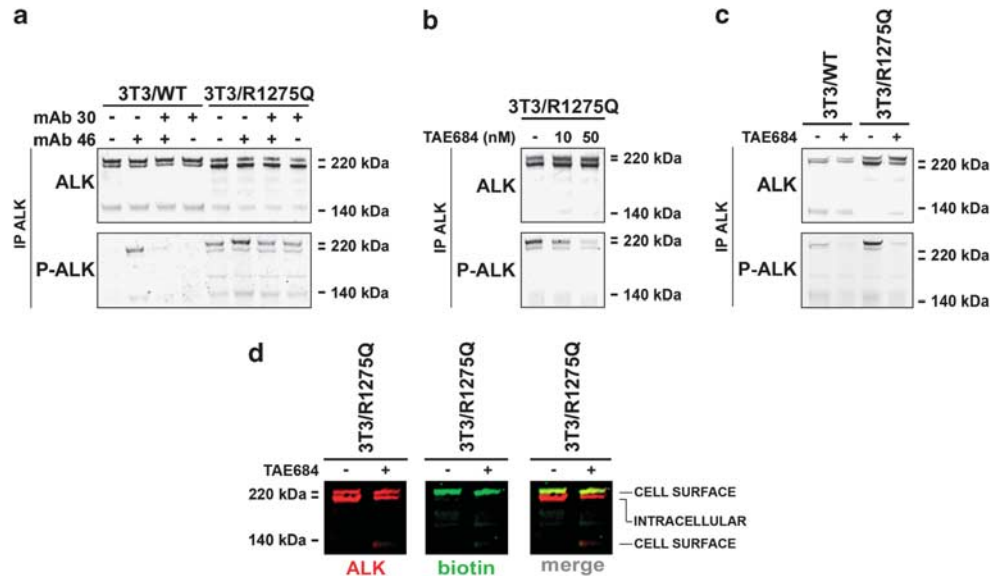
band of 220 kDa doublet was intracellular (see below). When compared with ALK-WT, the mutated receptor exhibited a constitutive activation, but again the minor pool of receptors addressed to the plasma membrane (upper 220 kDa band) was much more tyrosine phosphorylated than the intracellular pool (lower 220 kDa band, Figure 5a). In fact the phosphorylation pattern of the two bands of the 220 kDa doublet was a mirror image of the protein pattern. MAb30 had no effect on the basal phosphorylation of the upper band of 220 kDa doublet but reduced the degree of induced phosphorylation by mAb46 (Figure 5a). These data again suggested that the constitutive activity of the ALK-R1275Q receptor does not require dimerization, but that this constitutive activation can be further increased by the adequate dimerization triggered by the agonist mAb.

Finally, we investigated whether kinase inhibition restored ALK-R1275Q receptor maturation and cell-surface localization. TAE indeed inhibited the constitutive activity of the ALK-R1275Q (Figure 5b) but this mutant was less sensitive to TAE than the ALK-F1174L mutant (Figure 3a). After 1 h treatment complete, inhibition of the ALK-R1275Q required 50 nM TAE, whereas this inhibition was achieved with only 10 nM TAE for the ALK-F1174L mutant. Such a difference of TAE sensitivity between the two mutants has been reported by others (George *et al.*, 2008). This inhibition

persisted after a 24 h treatment with 50 nM TAE without any further addition of the inhibitor (Figure 5c). After such a treatment the pattern of expression of the ALK-R1275Q receptor appeared similar to that of the wild-type receptor that is, characterized by a diminution of the lower band of 220 kDa doublet. Therefore, kinase inhibition restored receptor maturation and cell surface localization as demonstrated by biotinylation experiments (Figure 5c). Note that this effect seems less pronounced than for the ALK-F1174L mutant (see Figures 3b and c), but it is in good agreement with the relative ratio of the two bands of the 220 kDa doublet, which characterized the two mutants.

## Discussion

ALK has been identified as a critical player in neuroblastoma development and represents a very attractive therapeutic target in this disease (Chen *et al.*, 2008; George *et al.*, 2008; Janoueix-Lerosey *et al.*, 2008; Mosse *et al.*, 2008). In particular, two hot spots of ALK-activating mutations at position F1174 and R1275 were found in neuroblastoma sporadic tumor and cell lines (Mosse *et al.*, 2009; Janoueix-Lerosey *et al.*, 2010), and appeared to be activating in nature. This study clearly establishes that the constitutive activity, cellular localization and trafficking of the



**Figure 5** Constitutive activity and cellular localization of R1275Q-mutated ALK. (a) 3T3/WT ALK and 3T3/R1275Q cells were untreated (lane 1), treated with 6 nM of agonist mAb46 for 20 min (lane 2), pretreated with 48 nM of mAb30 for 30 min and then with 6 nM of mAb46 for 20 min (lane 3) or treated with 48 nM of antagonist mAb30 for 50 min (lane 4). Cell extracts were prepared by lysing the cells in a RIPA buffer and subjected to immunoprecipitation. Immunoprecipitates were subjected to immunoblotting using anti-phosphotyrosine (4G10) or polyclonal anti-ALK (REAB) (b) 3T3/R1275Q cells were nontreated (lane 1) or treated with 10 nM (lane 2) or with 50 nM (lane 3) of NVP-TAE684 (TAE) for 1 h. ALK immunoprecipitates were subjected to immunoblotting with anti-phosphotyrosine antibody (4G10) and anti-ALK (REAB). (c) 3T3/WT (lanes 1–2) and 3T3/R1275Q (lanes 3–4) cells were nontreated (lanes 1–3) or treated with 50 nM of TAE for 24 h (lanes 2–4). ALK immunoprecipitates from cell extracts were analyzed by western blot with anti-ALK antibody (REAB) and anti-phosphotyrosine antibody (4G10). (d) 3T3/R1275Q cells were incubated (+) or not (–) with 50 nM of TAE for 24 h. They were then subjected to biotinylation procedure as described in Figure 1b. ALK immunoprecipitates were submitted to western blot analysis. Total (in red) and biotinylated ALK (cell surface receptor, in green) were detected as described in Figure 1b.

wild-type and mutated forms of the ALK receptor are different.

We first established that the ALK-WT receptor is only partially addressed to the plasma membrane. In fact the full-length receptor appeared as a doublet of two close ALK molecules of about 220 kDa and the relative ratio of the two bands apparently did not depend of the level of expression of the receptor (different 3T3/WT, IMR-32 or the HEK cell line previously described (Moog-Lutz *et al.*, 2005)). We demonstrated that the lower band of the 220 kDa doublet was intracellular and partially processed. In response to endoglycosidase F treatment, molecular masses of both forms of the 220 kDa doublet decreased to about 190 kDa. This indicated that the two bands of the 220 doublet therefore contain the same protein core. Effect of the tunikamycin treatment also deserves a comment. The appearance of the band of about 180 kDa corresponding to the newly synthesized completely non glycosylated receptor was correlated with a strong decrease in the intensity of the lower band of the 220 kDa doublet (Figure 2). Thus, Tunikamycin treatments, as well as biotinylation experiments, strongly support the hypothesis that this band corresponds to the precursor of the mature glycosylated 220 kDa form addressed to the plasma membrane. In NIH3T3 cells expressing ALK-WT, localization at the plasma membrane of the wild-type receptor was detectable but

immunofluorescence labeling also showed an intracellular staining. Intracellular localization of ALK in neuroblastoma cells has been already noticed by others (Lamant *et al.*, 2000; Osajima-Hakomori *et al.*, 2005). Thus, ALK-WT is partially intracellular.

In contrast, the mutated ALK receptors are mainly intracellular and largely retained in the reticulum/Golgi compartments. This intracellular retention appeared more pronounced for the F1174L mutant than for R1275Q mutated receptor. Strikingly, this localization was corroborated by a defect of *N*-linked glycosylation. The present study confirms that the F1174L and R1275Q mutated forms of ALK indeed display a constitutive activation and establishes that kinase inactivation restored maturation and cell-surface localization. Intracellular retention of mutated RTK such as Fms-like tyrosine kinase (Schmidt-Arras *et al.*, 2005) and FGFR-3 (Lievens *et al.*, 2004) have been already described. Our data therefore support the generality of an inhibitory role of tyrosine phosphorylation in the maturation of RTKs. Note, however, that ALK-WT, in particular, in neuroblastoma cell lines endogenously expressing this receptor, is also largely intracellular. Second and may be more important, to our knowledge, the comparison of the degrees of tyrosine phosphorylation of the intracellular pool and plasma membrane pool of other mutated RTKs had not been fully documented. As it likely reflects the constitutive activity

of the mutated RTKs, it would be of interest to establish whether, as a general rule, the pool of mutated RTKs addressed to the plasma membrane are much more tyrosine phosphorylated than the intracellular receptors or whether mutated forms of ALK constitute an exception. In fact for the mutated form of the FGFR-3 (Lievens *et al.*, 2004), as well as for the mutated variant of the Fms-like tyrosine kinase receptor (Choudhary *et al.*, 2009; Buchwald *et al.*, 2010), the phosphorylation pattern of the intracellular and plasma membrane pool of these receptors appeared similar to the protein pattern. Thus, from this point of view mutated forms of ALK do not exhibit the same properties than the mutated variants of the two other receptors (and see below).

This constitutive tyrosine phosphorylation of the ALK-mutated receptors deserves several comments. Our antagonist mAb30 had no effect on the basal phosphorylation of the upper band of 220 kDa doublet, suggesting that this constitutive activity did not require the dimerization. It remains, however, to establish whether longer treatment with antagonist mAb could modulate the constitutive activity ALK-mutated receptors located at the membrane. Yet agonist mAbs 46 or 48 increased this basal phosphorylation showing that this constitutive activation can be further increased by an adequate dimerization. An attractive hypothesis is that, because of the transactivation of two molecules of ALK-mutated receptor, additional tyrosine residues were phosphorylated after agonist mAbs treatment. Several hypotheses could be proposed to explain why the minor pool of mutated receptors located at the plasma membrane displays proportionally more tyrosine phosphorylation than the intracellular. One attractive possibility could be that the intracellular pool is permanently much more dephosphorylated than the mature receptors localized at the plasma membrane by cellular proteins tyrosine phosphatases (PTP). In particular, two PTPs have been already shown to interact and negatively regulate ALK tyrosine signaling. The cytosolic PTP SHP1 has been found to interact with the cytosolic oncogenic form NMP-ALK (Honorat *et al.*, 2006) and the membrane PTP RPTP beta/zeta with the membrane receptor ALK (Perez-Pinera *et al.*, 2007). We are currently investigating whether these PTPs interact with ALK in NIH3T3 cells and differently modulate the phosphorylation of the intracellular and plasma membrane pools of both wild-type and mutated forms of ALK.

In conclusion, the mutated ALK receptors are mainly intracellular, which is characteristic of misfolded protein. They exhibited a clear constitutive basal phosphorylation, which apparently did not require the dimerization of the receptor.

Previous studies of the oncogenic forms of ALK resulting from chromosomal translocations already led to the development of inhibitors of tyrosine kinase activity of ALK (for review (Webb *et al.*, 2009)). Thus, the potential use of a drug targeting ALK such as NVP-TAE684 (Galkin *et al.*, 2007) in neuroblastoma provides a real hope for future therapeutic treatments for this

devastating disease. In cancers involving the EGF receptor as an oncogene, combination of inhibitors of the tyrosine kinase domain and monoclonal antibodies are already routinely used in therapeutic treatments (see for a recent review (Martinelli *et al.*, 2009)). Clearly our antagonist mAbs could constitute a therapeutic approach complementary to the inhibitors of TK domain in neuroblastoma in which wild-type ALK is amplified (see for a review (Janoueix-Lerosey *et al.*, 2010)). We also established in this study that inhibition of the mutated receptors by TAE led to their translocation to the membrane and we have strong evidences that our mAbs could induce the internalization and down-regulation of both the wild-type and mutated receptors (Mazot and coll in preparation). Thus, even in the absence of amplification, combined to the inhibitors of the TK activity, antibodies may also be used in therapeutic approaches.

## Materials and methods

### *Cell lines, antibodies and reagents*

NIH3T3 cells, obtained at the ATCC, were maintained in High-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and with 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin at 37 °C in atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Human neuroblastoma cell line CLB-GE has been previously described (Janoueix-Lerosey *et al.*, 2008) and the human neuroblastoma cell line IMR32 was a kind gift of Dr P Kogner. They were maintained in RPMI medium supplemented with 10% fetal calf serum.

Constructs in the pcDNA3.1 vectors coding for wild-type ALK and its mutant F1174L and R1275Q were stably expressed in NIH3T3 cells. Stably transfected cells were continuously cultured in the same medium complemented by 400 µg/ml geneticin (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France).

Mouse anti-phospho-ERK1/2 (clone from MAP kinase-YT) was from Sigma-Aldrich. 4G10 anti-phospho-tyrosine and rabbit anti-ERK1/2 were from Millipore (St Quentin en Yvelines, France). Rabbit polyclonal antibodies REAB and mAb 30, 46 and 48 to the extracellular domain of the ALK human receptor have been previously described (Moog-Lutz *et al.*, 2005). Zymed rabbit polyclonal anti-ALK was from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France), anti-giantin was from Abcam-France (Paris, France) and monoclonal anti-KDEL from Enzo Lifesciences (TEBU, Le Perray en Yvelines, France). The selective ALK inhibitor NPV-TAE684 was synthesized following the formula described in (Galkin *et al.*, 2007). Tunikamycin was from Sigma-Aldrich.

### *Immunoprecipitation and western blotting*

Cells washed rapidly with cold phosphate-buffered saline (PBS) (containing 5 mM sodium fluoride and 100 mM sodium orthovanadate) were lysed in a radioimmune precipitation assay buffer RIPA as described in (Mathivet *et al.*, 2007). Lysates were clarified by centrifugation at 21 000 g for 10 min at 4 °C. Protein concentration was determined using the Micro BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce, Rockford, IL, USA). Cell extracts were analyzed by direct immunoblotting or subjected to immunoprecipitation. For immunoprecipitation 1 µg of mouse monoclonal antibodies 48, 30 and 15 (Moog-Lutz *et al.*, 2005) were added to 800 µg of protein lysate



and rotated 3 h at 4 °C. A volume of 25 µl of protein G sepharose beads (GE Healthcare Life Sciences, Saclay, France) was then rocked for an additional 2 h at 4 °C. The beads were then washed five times with cold PBS containing 1% Triton X-100. Proteins were then eluted from the beads in 40 µl of SDS/PAGE loading buffer (Invitrogen) by incubating 10 min at 70 °C and subjected to SDS–polyacrylamide gel electrophoresis. After separation in SDS–polyacrylamide gel electrophoresis, proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) for 1 h 30 min at 400 mA per gel in 25 mM Tris, pH 8.3, 200 mM glycine and 20% ethanol. The membrane was blocked in PBS, 5% powdered milk and probed with the antibodies at appropriate dilutions for 1 h at room temperature or overnight at 4 °C. After five washing in PBS, 0.1% Tween 20, bound primary antibodies were detected using IRDye 700- or IRDye 800-conjugated second antibodies (Rockland, ME, USA). Binding of the fluorescent antibodies was visualized using the Odyssey Imaging System (LI-COR biosciences, Lincoln, NE, USA).

#### Immunofluorescence and confocal microscopy

All studies have been performed at the Institut du Fer à Moulin imaging facilities. Cells were fixed for 15 min with 4% paraformaldehyde and washed three times with PBS before being permeabilized using 0.5% PBS and Triton X-100 for 5 min and washed with 0.1 M PBS-Glycine for 15 min. After 1 h of blocking in PBS containing 1.5% bovine serum albumin, cells were incubated in same buffer with, respectively, 1 µg of mAb46/15 and polyclonal anti-giantin or polyclonal anti-ALK (Zymed) and monoclonal anti-KDEL. The cells were then washed five times with PBS before and after incubation with, respectively, anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 and anti-rabbit IgG Alexa Fluor 543, or anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 and anti-mouse IgG Alexa fluor 543-conjugated secondary antibodies (Molecular Probes, BP 96, Cergy-Pontoise, France). The cells were then mounted in Vectashield (Vector Laboratories, ABCYS, Paris, France). Confocal laser microscopy was performed using a TCS SP2 confocal microscope (Leica,

Gennevilliers, France). Images were assembled using Adobe Photoshop software (DSI, UPMC, Paris, France).

#### Deglycosylation of ALK with N-Glycosidase F, N-Glycosidase H and O-Glycosidase

For deglycosylation, proteins from immunoprecipitates obtained from NIH3T3 cell lines or neuroblastoma cell line CLB-GE were incubated with N-glycosidase F, N-Glycosidase H and O-Glycosidase (Roche, Mannheim, Germany) following the company instructions. The samples were then used for immunoblotting with anti-ALK antibody.

#### Cell surface proteins biotinylation

Cell-surface expression level of ALK was examined using the membrane-impermeant biotin EZ-Link Sulfo-NHS-LC-biotin (Pierce). Cells were washed twice in ice-cold PBS, then incubated with biotin for 30 min on ice. After biotinylation, cells were washed with PBS Glycine 0.1 M. After cells lysis in RIPA buffer, proteins extracts were subjected to ALK immunoprecipitation (see above). Cell surface ALK was detected by immunoblotting using a IRDye 800-conjugated streptavidin (Rockland).

#### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

#### Acknowledgements

Work at the Institut du Fer à Moulin UMR-S839 was supported by Inserm and Université Pierre et Marie Curie. The U830 Inserm laboratory is supported by grants from the Institut National du Cancer, the Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe labellisée), the Association Hubert Gouin, Les Bagouz à Manon, les amis de Claire and Enfance et Santé. We are grateful to Dr JA Girault for helpful discussions.

#### References

- Buchwald M, Pietschmann K, Muller JP, Bohmer FD, Heinzl T, Kramer OH. (2010). Ubiquitin conjugase UBCH8 targets active FMS-like tyrosine kinase 3 for proteasomal degradation. *Leukemia* **24**: 1412–1421.
- Caren H, Abel F, Kogner P, Martinsson T. (2008). High incidence of DNA mutations and gene amplifications of the ALK gene in advanced sporadic neuroblastoma tumours. *Biochem J* **416**: 153–159.
- Chen Y, Takita J, Choi YL, Kato M, OHIRA M, Sanada M *et al.* (2008). Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature* **455**: 971–974.
- Choudhary C, Olsen JV, Brandts C, Cox J, Reddy PN, Bohmer FD *et al.* (2009). Mislocalized activation of oncogenic RTKs switches downstream signaling outcomes. *Mol Cell* **36**: 326–339.
- Galkin AV, Melnick JS, Kim S, Hood TL, Li N, Li L *et al.* (2007). Identification of NVP-TAE684, a potent, selective, and efficacious inhibitor of NPM-ALK. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 270–275.
- George RE, Sanda T, Hanna M, Frohling S, Luther II W, Zhang J *et al.* (2008). Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature* **455**: 975–978.
- Helenius A, Aebi M. (2004). Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* **73**: 1019–1049.
- Honorat JF, Ragab A, Lamant L, Delsol G, Ragab-Thomas J. (2006). SHP1 tyrosine phosphatase negatively regulates NPM-ALK tyrosine kinase signaling. *Blood* **107**: 4130–4138.
- Iwahara T, Fujimoto J, Wen D, Cupples R, Bucay N, Arakawa T *et al.* (1997). Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene* **14**: 439–449.
- Janoueix-Lerosey I, Lequin D, Brugieres L, Ribeiro A, de Pontual L, Combaret V *et al.* (2008). Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature* **455**: 967–970.
- Janoueix-Lerosey I, Schleiermacher G, Delattre O. (2010). Molecular pathogenesis of peripheral neuroblastic tumors. *Oncogene* **29**: 1566–1579.
- Kornfeld R, Kornfeld S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* **54**: 631–664.
- Lamant L, Pulford K, Bischof D, Morris SW, Mason DY, Delsol G *et al.* (2000). Expression of the ALK tyrosine kinase gene in neuroblastoma. *Am J Pathol* **156**: 1711–1721.
- Lievens PM, Mutinelli C, Baynes D, Liboi E. (2004). The kinase activity of fibroblast growth factor receptor 3 with activation loop mutations affects receptor trafficking and signaling. *J Biol Chem* **279**: 43254–43260.
- Loren CE, Scully A, Grabbe C, Edeen PT, Thomas J, McKeown M *et al.* (2001). Identification and characterization of DALK: a novel *Drosophila melanogaster* RTK which drives ERK activation *in vivo*. *Genes Cells* **6**: 531–544.
- Martinelli E, De Palma R, Orditura M, De Vita F, Ciardiello F. (2009). Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer therapy. *Clin Exp Immunol* **158**: 1–9.
- Mathivet T, Mazot P, Vigny M. (2007). In contrast to agonist monoclonal antibodies, both C-terminal truncated form and full

- length form of Pleiotrophin failed to activate vertebrate ALK (anaplastic lymphoma kinase)? *Cell Signal* **19**: 2434–2443.
- Miyake I, Hakomori Y, Shinohara A, Gamou T, Saito M, Iwamatsu A *et al.* (2002). Activation of anaplastic lymphoma kinase is responsible for hyperphosphorylation of ShcC in neuroblastoma cell lines. *Oncogene* **21**: 5823–5834.
- Moog-Lutz C, Degoutin J, Gouzi JY, Frobert Y, Brunet-de Carvalho N, Bureau J *et al.* (2005). Activation and inhibition of anaplastic lymphoma kinase receptor tyrosine kinase by monoclonal antibodies and absence of agonist activity of pleiotrophin. *J Biol Chem* **280**: 26039–26048.
- Morris SW, Naeve C, Mathew P, James PL, Kirstein MN, Cui X *et al.* (1997). ALK, the chromosome 2 gene locus altered by the t(2;5) in non-Hodgkin's lymphoma, encodes a novel neural receptor tyrosine kinase that is highly related to leukocyte tyrosine kinase (LTK). *Oncogene* **14**: 2175–2188.
- Mosse YP, Laudenslager M, Longo L, Cole KA, Wood A, Attiyeh EF *et al.* (2008). Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature* **455**: 930–935.
- Mosse YP, Wood A, Maris JM. (2009). Inhibition of ALK signaling for cancer therapy. *Clin Cancer Res* **15**: 5609–5614.
- Motegi A, Fujimoto J, Kotani M, Sakuraba H, Yamamoto T. (2004). ALK receptor tyrosine kinase promotes cell growth and neurite outgrowth. *J Cell Sci* **117**: 3319–3329.
- Mourali J, Benard A, Lourenco FC, Monnet C, Greenland C, Moog-Lutz C *et al.* (2006). Anaplastic lymphoma kinase is a dependence receptor whose proapoptotic functions are activated by caspase cleavage. *Mol Cell Biol* **26**: 6209–6222.
- Osajima-Hakomori Y, Miyake I, Ohira M, Nakagawara A, Nakagawa A, Sakai R. (2005). Biological role of anaplastic lymphoma kinase in neuroblastoma. *Am J Pathol* **167**: 213–222.
- Palmer RH, Vernersson E, Grabbe C, Hallberg B. (2009). Anaplastic lymphoma kinase: signalling in development and disease. *Biochem* **420**: 345–361.
- Perez-Pinera P, Zhang W, Chang Y, Vega JA, Deuel TF. (2007). Anaplastic lymphoma kinase is activated through the pleiotrophin/receptor protein-tyrosine phosphatase beta/{zeta} signaling pathway: an alternative mechanism of receptor tyrosine kinase activation. *J Biol Chem* **282**: 28683–28690.
- Reiner DJ, Ailion M, Thomas JH, Meyer BJ. (2008). C elegans anaplastic lymphoma kinase ortholog SCD-2 controls dauer formation by modulating TGF-beta signaling. *Curr Bio* **18**: 1101–1109.
- Schmidt-Arras DE, Bohmer A, Markova B, Choudhary C, Serve H, Bohmer FD. (2005). Tyrosine phosphorylation regulates maturation of receptor tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* **25**: 3690–3703.
- Vernersson E, Khoo NK, Henriksson ML, Roos G, Palmer RH, Hallberg B. (2006). Characterization of the expression of the ALK receptor tyrosine kinase in mice. *Gene Expr Patterns* **6**: 448–461.
- Webb TR, Slavish J, George RE, Look AT, Xue L, Jiang Q *et al.* (2009). Anaplastic lymphoma kinase: role in cancer pathogenesis and small-molecule inhibitor development for therapy. *Expert Rev Anticancer Ther* **9**: 331–356.
- Yang HL, Eriksson T, Vernersson E, Vigny M, Hallberg B, Palmer RH. (2007). The ligand Jelly Belly (Jeb) activates the Drosophila Alk RTK to drive PC12 cell differentiation, but is unable to activate the mouse ALK RTK. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* **308**: 269–282.

Supplementary Information accompanies the paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>)

## **SUPPLEMENTARY MATERIAL**

ONC-2010-02230. Manuscript. Mazot et al

### **The constitutive activity of the ALK mutated at positions F1174 or R1275 impairs receptor trafficking**

#### **SUPPLEMENTARY FIGURES**

**Fig. S1: Effects of tyrosine kinase inhibitor NVP-TAE 684 on wild type ALK.** 3T3/WT cells were non treated (lanes 1) or pretreated 30 min with NVP-TAE684 (lane 4= 10 nM, lane 5= 20 nM, lane 6= 50 nM, lanes 2 and 7= 100 nM) and then treated with (lane 3-7) with 6nM of agonist mAb46 for 20 min. ALK immunoprecipitates were analyzed by Western blot with antibodies against ALK (REAB) and anti-phosphotyrosine (4G10 = P-ALK). Cells extracts were Western-blotted with antibodies against phospho-ERK1/2. Tubulin was used as loading control.

#### **Fig. S2: Intracellular retention of F1174L mutated ALK receptor in CLB-GE cells**

(A). CLB-GE cell were incubated with 0.5 mg/ml EZ-Link<sup>®</sup> Sulfo-NHS-LC-biotin for 30 min on ice, and then washed with cold PBS-Glycin 0.1mM. ALK were immunoprecipitated with and submitted to Western blot analysis. Total ALK were detected with polyclonal anti-ALK (REAB) and secondary anti-rabbit IgG coupled to IRdye700, biotinylated ALK (cell surface receptor) with streptavidin coupled with IRdye800. (B) ALK immunoprecipitates of CLB-GE cell extract were incubated with N-glycosidase F (lane 2) or Endoglycosidase H (lane 3) or O-glycosidase (lane 4) and analyzed by Western blot analysis using polyclonal anti-ALK (REAB). Deglycosilation patterns were compared with non-treated ALK immunoprecipitate (lane1)

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

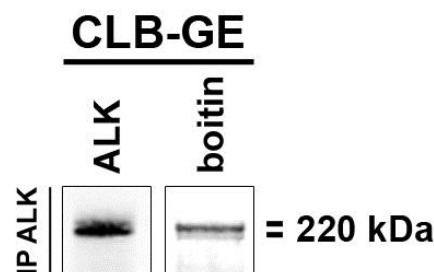
ONC-2010-02230. Manuscript. Mazot et al

**The constitutive activity of the ALK mutated at positions F1174 or R1275 impairs receptor trafficking**

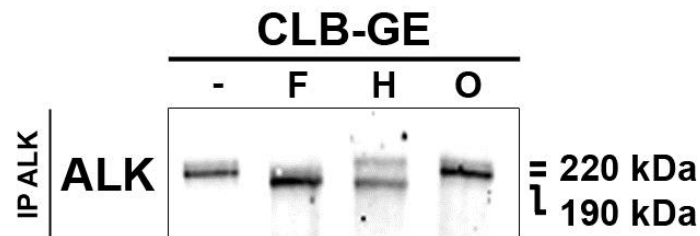
## SUPPLEMENTARY FIGURES

### Figure S1

**A**



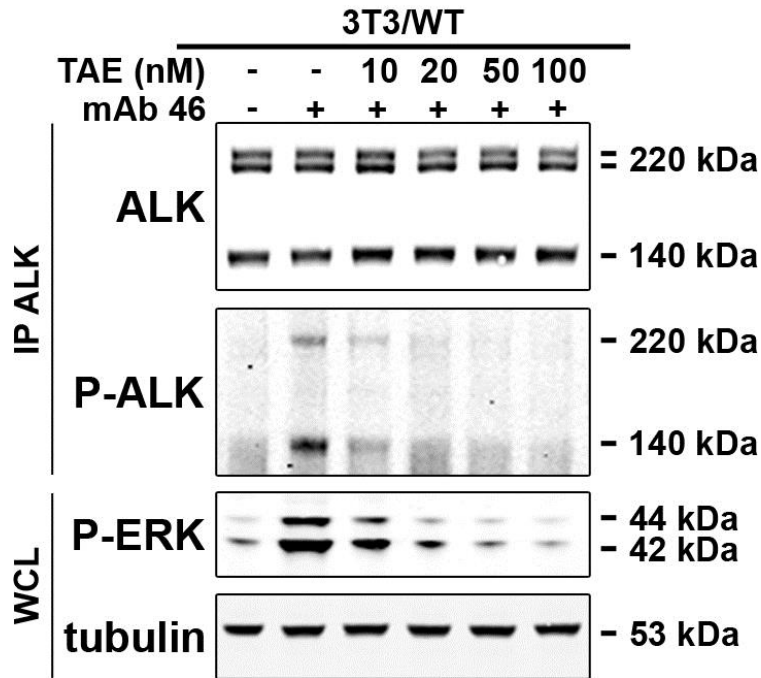
**B**



**Fig. S1: Effects of tyrosine kinase inhibitor NVP-TAE 684 on wild type ALK.** 3T3/WT cells were non treated (lanes 1) or pretreated 30 min with NVP-TAE684 (lane 4= 10 nM, lane 5= 20 nM, lane 6= 50 nM, lanes 2 and 7= 100 nM) and then treated with (lane 3-7) with 6nM of agonist mAb46 for 20 min. ALK immunoprecipitates were analyzed by Western blot with antibodies against ALK (REAB) and anti-phosphotyrosine (4G10 = P-ALK). Cells extracts were Western-blotted with antibodies against phospho-ERK1/2. Tubulin was used as loading control.



# Figure S2



**Fig. S2: Intracellular retention of F1174L mutated ALK receptor in CLB-GE cells**

(A). CLB-GE cell were incubated with 0.5 mg/ml EZ-Link<sup>®</sup> Sulfo-NHS-LC-biotin for 30 min on ice, and then washed with cold PBS-Glycin 0.1mM. ALK were immunoprecipitated with and submitted to Western blot analysis. Total ALK were detected with polyclonal anti-ALK (REAB) and secondary anti-rabbit IgG coupled to IRdye700, biotinylated ALK (cell surface receptor) with streptavidin coupled with IRdye800. (B) ALK immunoprecipitates of CLB-GE cell extract were incubated with N-glycosidase F (lane 2) or Endoglycosidase H (lane 3) or O-glycosidase (lane 4) and analyzed by Western blot analysis using polyclonal anti-ALK (REAB). Deglycosilation patterns were compared with non-treated ALK immunoprecipitate (lane1)

## Article II

### **Characterization of rearrangements involving the *ALK* gene reveals a novel truncated form associated with tumor aggressiveness in neuroblastoma**

Les mutations ponctuelles sont le principal mécanisme d'activation du récepteur ALK dans le NB. Cependant, il est aussi activé de façon constitutive dans divers cancers lorsqu'il est impliqué dans des protéines de fusion, exprimées à la suite de réarrangements chromosomiques. Au laboratoire, l'étude des profils génomiques de tumeurs et lignées cellulaires de NB a mis en évidence la présence de points de cassure dans le gène *ALK*. De plus, des expériences de FISH utilisant des sondes dirigées contre différentes parties du gène ont permis de mettre en évidence la présence de remaniements chromosomiques dans la lignée cellulaire N206/KELLY (McDermott et al., 2008). Ces données indiquent clairement que le gène *ALK* est la cible de réarrangements chromosomiques dans le NB. Afin de rechercher de tels évènements et de déterminer si ils peuvent conduire à l'activation incontrôlée du récepteur ALK, la caractérisation fine du locus a été réalisée dans les lignées cellulaires et les tumeurs de NB disponibles au laboratoire.

L'analyse des échantillons par CGH-array a permis d'identifier ceux présentant un locus réarrangé et de localiser précisément les points de cassure. La technologie de capture d'ADN suivie de séquençage à haut débit a permis de caractériser la structure des réarrangements et d'identifier les séquences partenaires du gène *ALK* mises en jeu. Cette analyse montre que le gène *ALK* est fréquemment réarrangé dans les lignées cellulaires mais que ces évènements touchent différentes parties du gène. Plusieurs types de réarrangements ont été décrits: duplication inverse, translocation, délétion. De façon intéressante, les échantillons pour lesquels le gène *ALK* est amplifié présentent tous une co-amplification entre les gènes *ALK* et *MYCN*.

Enfin, cette étude a mis en évidence la présence d'un variant de la protéine ALK, délété pour un partie de domaine extracellulaire. Ce variant protéique d'une taille de 170 kDa, nommé  $ALK^{\Delta 4-11}$ , est issu de l'expression d'un réarrangement chromosomique fusionnant l'exon 3 à l'exon 12 de l'ARNm de ALK. Identifié initialement dans la lignée cellulaire CLB-Bar, ce variant a été détecté dans la tumeur à la rechute, de laquelle est issue la lignée cellulaire. Nous avons cependant pu montrer qu'il est absent de la tumeur au diagnostic. Une analyse fonctionnelle du variant exprimé dans des NIH/3T3 a mis en évidence ses propriétés

oncogéniques et tumorigènes ainsi que son activité kinase constitutive. Ce travail indique aussi que ALK<sup>Δ4-11</sup> n'est pas adressé à la membrane plasmique comme l'est la forme pleine taille de ALK, mais qu'au contraire il présente une rétention intra-cytoplasmique associée à une maturation incomplète. Cette situation est identique à celle des protéines ALK ayant une mutation ponctuelle activatrice.

Ce travail met donc en évidence un nouveau mécanisme d'activation du récepteur ALK dans le NB, alternatif aux mutations ponctuelles.

## Characterization of Rearrangements Involving the *ALK* Gene Reveals a Novel Truncated Form Associated with Tumor Aggressiveness in Neuroblastoma

Alex Cazes<sup>1,2</sup>, Caroline Louis-Brennetot<sup>1,2</sup>, Pierre Mazot<sup>3,4,5</sup>, Florent Dingli<sup>6</sup>, Bérange Lombard<sup>6</sup>, Valentina Boeva<sup>2,7,10</sup>, Romain Daveau<sup>1,2</sup>, Julie Cappo<sup>1,2</sup>, Valérie Combaret<sup>11</sup>, Gudrun Schleiermacher<sup>1,2,8</sup>, Stéphanie Jouannet<sup>1,2</sup>, Sandrine Ferrand<sup>9</sup>, Gaëlle Pierron<sup>9</sup>, Emmanuel Barillot<sup>2,7,10</sup>, Damaris Loew<sup>6</sup>, Marc Vigny<sup>3,4,5</sup>, Olivier Delattre<sup>1,2,9</sup>, and Isabelle Janoueix-Lerosey<sup>1,2</sup>

### Abstract

Activating mutations of the *ALK* gene have been identified in sporadic and familial cases of neuroblastoma (NB), a cancer of the peripheral nervous system, and are thought to be the primary mechanism of oncogenic activation of this receptor in this pediatric neoplasm. To address the possibility that *ALK* activation may occur through genomic rearrangements as detected in other cancers, we first took advantage of high-resolution array-comparative genomic hybridization to search for *ALK* rearrangements in NB samples. Using complementary experiments by capture/paired-end sequencing and FISH experiments, various types of rearrangements were fully characterized, including partial gains or amplifications, in several NB cell lines and primary tumors. In the CLB-Bar cell line, we described a genomic rearrangement associated with an amplification of the *ALK* locus, leading to the expression of a 170 kDa protein lacking part of the extracellular domain encoded by exons 4 to 11, named *ALK*<sup>Δ4-11</sup>. Analysis of genomic DNA from the tumor at diagnosis and relapse revealed that the *ALK* gene was amplified at diagnosis but that the rearranged *ALK* allele was observed at the relapse stage only, suggesting that it may be implicated in tumor aggressiveness. Consistently, oncogenic and tumorigenic properties of the *ALK*<sup>Δ4-11</sup> variant were shown after stable expression in NIH3T3 cells. Moreover, we documented an increased constitutive kinase activity of this variant, as well as an impaired maturation and retention into intracellular compartments. These results indicate that genomic rearrangements constitute an alternative mechanism to *ALK* point mutations resulting in receptor activation. *Cancer Res*; 73(1); 195–204. ©2012 AACR.

### Introduction

Neuroblastoma (NB) is an embryonal cancer of the peripheral sympathetic nervous system observed in early childhood, characterized by a broad spectrum of clinical behaviors and a great genetic heterogeneity (1–3). The *ALK* gene, located at 2p23, encodes a receptor tyrosine kinase (RTK) that belongs to the insulin-receptor superfamily (4, 5). Activating *ALK* mutations, mainly affecting residues located within the kinase domain, have been identified in sporadic, familial, and syn-

dromic cases of NB (6–11) and *ALK* amplifications have also been reported in a subset of sporadic cases (2, 12). Furthermore, it has been suggested that the wild-type (WT) *ALK* receptor may exert oncogenic activity in NB when a critical threshold of expression is achieved (13).

In addition to *ALK* aberrations, other recurrent somatic genetic abnormalities have been characterized in-depth in NB samples. *MYCN* amplification at chromosome 2p24 is observed in about one-fourth of primary tumors and is associated with advanced-stage disease and rapid tumor progression (1, 14). Losses of chromosome arms 1p, 3p, and 11q and gains of chromosome arms 1q, 2p, and 17q are recurrently observed in NB samples and are of prognostic significance (1–3, 15). The breakpoints on these various segments seem not to be tightly clustered however their precise position remains unknown in most cases.

In several human cancers, including a subset of anaplastic large cell lymphomas (ALCL), diffuse large B-cell lymphomas, inflammatory myofibroblastic tumors (IMT), and non-small cell lung (NSCL) cancers, recurrent chromosome translocations targeting the *ALK* gene have been extensively characterized (4, 5). The resulting fusion proteins contain invariably the tyrosine kinase domain of *ALK* and the various partners provide an oligomerization domain. This leads to constitutive

**Authors' Affiliations:** <sup>1</sup>Inserm U830; <sup>2</sup>Institut Curie, Centre de Recherche; <sup>3</sup>Université Pierre et Marie Curie, UPMC; <sup>4</sup>Inserm UMRS-839; <sup>5</sup>Institut du Fer à Moulin; <sup>6</sup>Laboratoire de spectrométrie de masse protéomique; <sup>7</sup>Inserm U900; <sup>8</sup>Département de Pédiatrie, Institut Curie; <sup>9</sup>Unité de Génétique Somatique, Institut Curie, Paris; <sup>10</sup>Mines ParisTech, Fontainebleau; and <sup>11</sup>Centre Léon Bérard, Laboratoire de Recherche Translationnelle, Lyon, France

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

**Corresponding Author:** Isabelle Janoueix-Lerosey, Unité Inserm U830, Institut Curie, Centre de Recherche, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris Cedex 05 France. Phone: 331-562-46684; Fax: 331-562-46630; E-mail: janoueix@curie.fr

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1242

©2012 American Association for Cancer Research.

ALK signaling that has been shown to induce cell transformation *in vitro* and *in vivo* (4, 5). The ALK receptor is, therefore, an attractive therapeutic target in an expanding number of human malignancies, both in children and adults (16).

In the present work, we fully characterized various types of rearrangements involving the *ALK* gene in several NB cell lines and primary tumors. We documented a rearrangement leading to a novel truncated ALK variant, exhibiting oncogenic properties and associated with tumor aggressiveness.

## Materials and Methods

### NB cell lines and primary tumors

NB cell lines have been described previously (17–19). The CLB-Bar cell line was established from a stage 4 NB tumor at relapse. A subset of primary NB tumors previously characterized by whole-genome array-comparative genomic hybridization (CGH) was further analyzed in this study (15).

### Array-CGH analysis

A custom NimbleGen ultrahigh density oligonucleotide array was designed for this study. We used a 4-plex format with 72,000 features starting from chromosome 2 position 29,249,000 to position 30,018,000 [all base pair positions are referring to human genome build 36 (hg18)], thereby covering the entire *ALK* gene and extending 20 kb upstream and downstream of the gene with 1 feature every 11 bases. The precise procedure is described in supplementary methods. Twenty-six cell lines were analyzed on this array: 106C, CHP212, CLB-Ba, CLB-Bar, CLB-Br, CLB-Car, CLB-Ga, CLB-Ge, CLB-Ma, CLB-Re, CLB-Tr, GI-M-EN, IMR32, LAN-1, N206/Kelly, SJNB-1, SJNB-6, SJNB-8, SJNB-12, SK-N-AS, SK-N-BE, SK-N-BE(2C), SK-N-BE(M17), SK-N-DZ, SK-N-SH, and TR14. We also studied three primary tumors showing amplification at the *ALK* locus, 1 tumor with amplification near the *ALK* locus and 9 tumors exhibiting 2p gain, with breakpoint in the vicinity of the *ALK* gene.

For a subset of samples, Affymetrix Genome-Wide Human SNP 6.0 Array was used to obtain a whole genomic profile according to Affymetrix recommendations (Supplementary Methods).

### Capture and paired-end sequencing

The Sure Select method (Agilent Technologies) was used to capture regions of interest. The bait library was designed using the Agilent e-array software. The complete *ALK* genomic locus, together with 50 kb upstream and 30 kb downstream of the gene, was covered at  $\times 5$ , excluding repeated regions. Boundaries of other amplified regions on the 2p chromosome of IMR32 and NB838 samples, defined by SNP 6.0 arrays, were also included in the captured regions (Supplementary Table S1). Libraries for paired-end sequencing were constructed for 10 samples (CLB-Bar, CLB-Br, CLB-Ga, CLB-Ge, CLB-Ma, CLB-Re, IMR32, N206, NB838, and SJNB8) from genomic DNA according to the manufacturer's protocol (Illumina). Capture was conducted on the bait library according to the protocol provided by Agilent Technologies. Paired-end sequencing ( $2 \times 50$  bp) was conducted on the Illumina Genome Analyzer II. Reads were analyzed as described in Supplementary Methods.

### PCR validation of identified rearrangements

Information about primers used to confirm rearrangements predicted by capture and paired-end sequencing is listed in Supplementary Table S2.

### FISH experiments

For FISH experiments, we used either the LSI *ALK* dual color, Break Apart Rearrangement probe (Vysis) or bacterial artificial chromosome (BAC) probes or five-kb PCR products synthesized using TaKaRa ExTaq (Lonza) labeled with various fluorochromes by a nick-translation kit (Vysis). Primers used to generate the PCR fragment probes as well as BACs used for FISH experiments are listed in Supplementary Table S3. FISH experiments were conducted as previously described (19). Images were captured with Metamorph software and analyzed with ImageJ software.

### Immunoblots

Total ALK was detected using Zymed 18-0266 rabbit polyclonal antibody (Invitrogen). An antibody (number 3341, Cell Signaling Technologies) directed against the phosphorylated Y1604 residue was used to reveal phosphorylated ALK. Western blot analyses were conducted using anti-ERK1/2 (9102), antiphospho-ERK1/2 (4377), anti-AKT (9272), antiphospho-AKT (4056), anti-STAT3 (9132), and antiphospho-STAT3 (9145) antibodies from Cell Signalling Technologies.

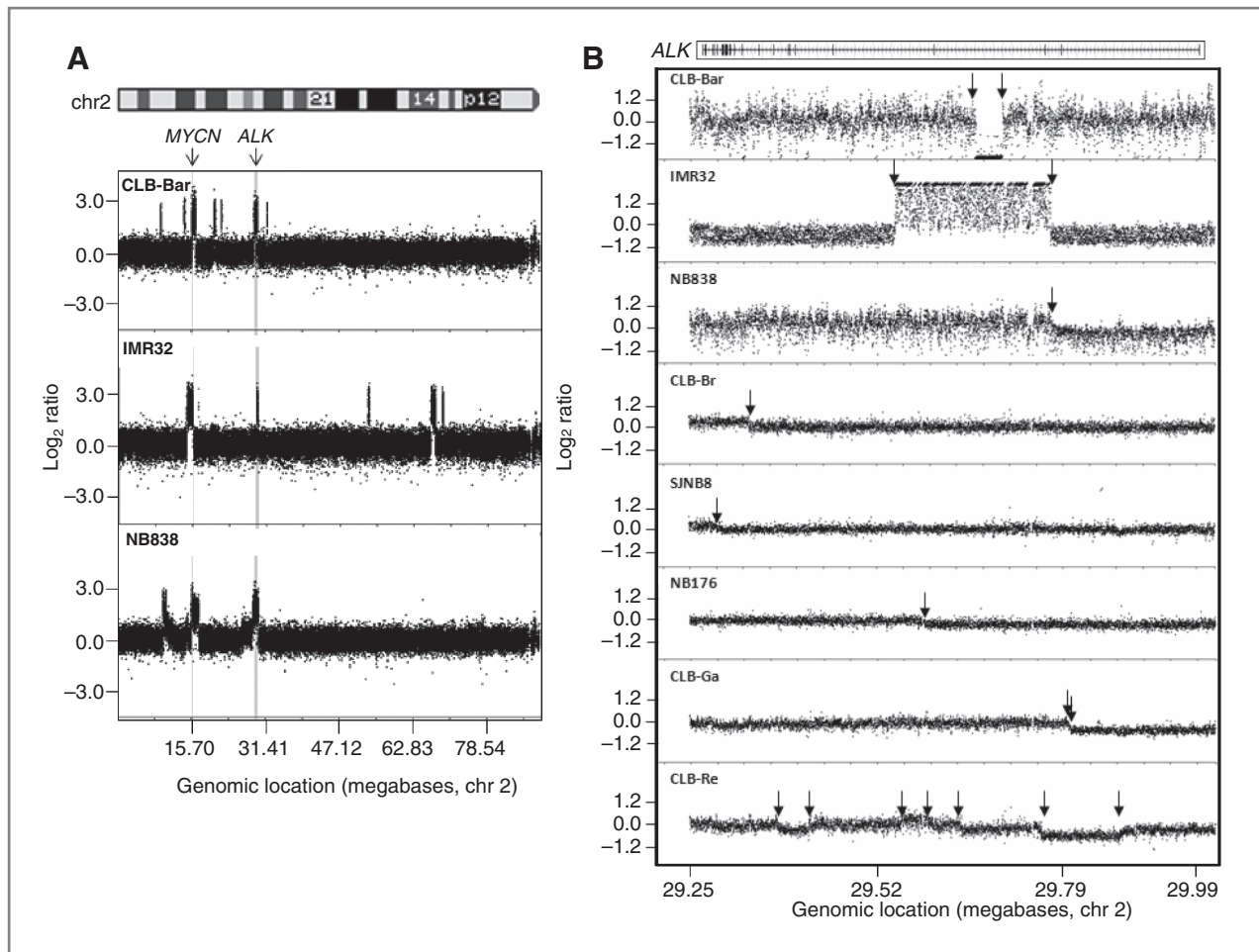
### ALK immunoprecipitation and proteomic analysis

Cell extracts were prepared as previously described (10). 10 mg of proteins were incubated with a mix of rabbit polyclonal and mouse monoclonal anti-ALK antibodies (20) for 2 hours at 4°C then with protein G Sepharose beads (Sigma) for 1 hour at 4°C. The immunoprecipitates were washed twice with cold PBS supplemented with 0.1% Triton then resuspended in gel loading buffer (50 mmol/L Tris pH = 8.2, Urea 8M, Thiourea 2M) and resolved by SDS-PAGE. For proteomic analysis, label-free quantitative analysis of immunoaffinity-purified proteins was conducted as described in Supplementary Methods.

### Transforming potential of ALK<sup>Δ4-11</sup>

NIH3T3 cells were cultured as previously described (21). The cDNA encoding the ALK<sup>Δ4-11</sup> variant was generated from total RNA of the CLB-Bar cell line using high-fidelity PCR. Its sequence was checked by Sanger sequencing and cloned into the pcDNA3 expression vector. Stably transfected cells were obtained after transfection using Lipofectamine LTX reagent and selected by 400 µg/mL geneticin (Gibco).

For proliferation assays 20,000 stably transfected cells were plated in duplicates in 24-well plates. The number of living cells was counted 3 and 6 days after using a Vi-cell XR counter (Beckman Coulter). For soft agar assays, 250,000 stably transfected cells were mixed in 0.3% agar with complete medium and plated on 0.3% agarose-coated 6-well plates (in triplicate). After 17 days, colonies were manually counted. Tumor formation was evaluated 21 days after subcutaneous injections of 1 million transfected cells in Nude mice.



**Figure 1.** *ALK* amplifications and rearrangements revealed by array-CGH in NB samples. A, multiple amplicons on chromosome 2p in NB cases presenting with whole or partial amplification of the *ALK* gene are revealed by SNP 6.0 arrays in the CLB-Bar, IMR32, and NB838 samples. B, intragenic transitions in copy number within the *ALK* gene. The ultrahigh density array covers the *ALK* gene with a median probe interval of 11 bp. As the array contains only the *ALK* locus, after normalization, the value at 0 for the  $\text{Log}_2$  ratio corresponds to the mean copy number of the locus. This explains the particular profiles observed for the CLB-Bar and NB838 samples that harbor amplification of most of the *ALK* gene. In A and B, the 2p ideogram and chart of the exon-intron structure of the *ALK* gene are shown above the copy number profiles, respectively.

### ***In vitro* kinase assay**

*In vitro* kinase assay was conducted as previously described (10) using 500  $\mu\text{g}$  of NIH3T3 cell lysates.

### **Deglycosylation of ALK with F and H-endoglycosidases and cell surface protein biotinylation**

Deglycosylation and cell surface protein biotinylation experiments were conducted on NIH3T3 cells stably expressing WT ALK or the ALK $^{\Delta 4-11}$  variant as previously described (21).

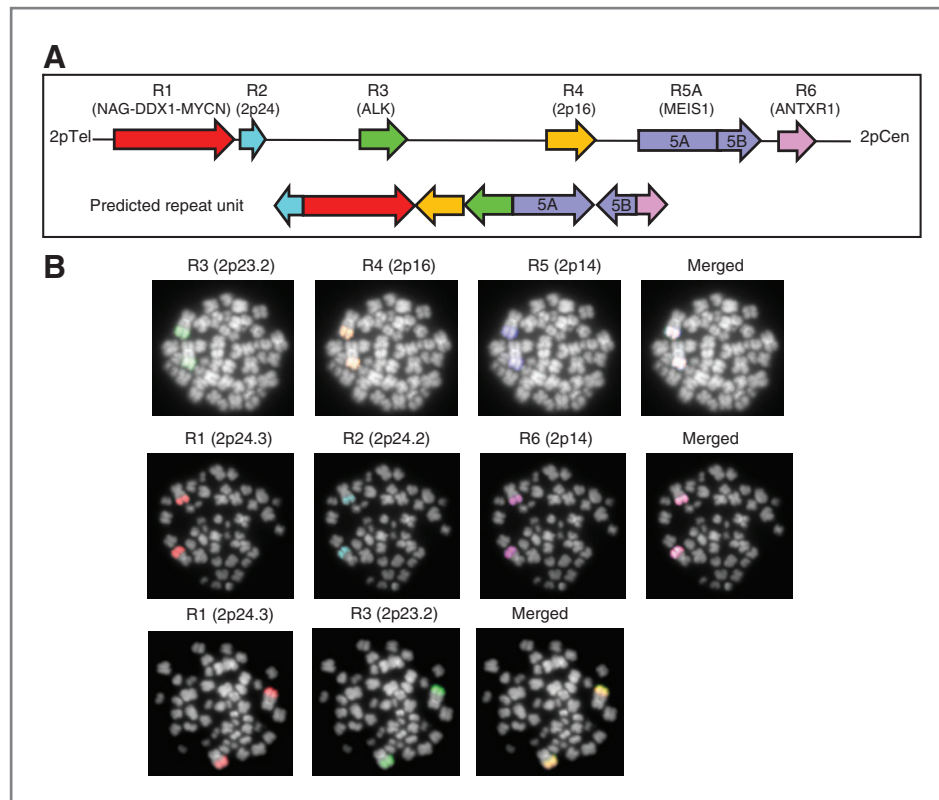
## **Results**

### **Copy number changes within the *ALK* gene in NB samples identified by high-resolution array-CGH**

To identify rearrangements targeting the *ALK* locus, we searched for intragenic transitions in copy number using an ultrahigh density array covering the entire *ALK* gene in 13 primary tumors selected for *ALK* amplification or 2p gain and

in 26 NB cell lines (see Material and Methods). The whole genomic profile of cases presenting such rearrangements associated with *ALK* amplification was further explored using SNP 6.0 arrays. Fig. 1A shows amplification of the *ALK* locus as well as several other amplified regions on the 2p arm in the CLB-Bar, IMR32, and NB838 samples. Analysis of the *ALK* locus with our ultrahigh density array indicated that these 3 samples had amplified and rearranged *ALK* alleles. In the CLB-Bar cell line, most of the locus was amplified; however, a 39-kb region from 29,668,100 to 29,707,200 positions in intron 3 showed an absence of amplification (Fig. 1B). In the IMR32 cell line, array-CGH identified a partial amplification of the *ALK* locus, between positions 29,550,200 and 29,777,700, the corresponding breakpoints being located in introns 4 and 2, respectively. For the NB838 tumor, harboring a whole *ALK* amplification, we observed a breakpoint in intron 2 close to position 29,790,000. In five samples, copy number changes were observed within the *ALK* locus in the absence of amplification (Fig. 1B).





**Figure 2.** Structure of a complex 2p amplicon involving the *ALK* locus in IMR32 cell line. **A**, scheme of the potential structure of a complex amplicon involving several 2p regions including a portion of the *ALK* gene in the IMR32 cell line. The upper part represents the normal positions of the amplified regions, whereas the lower part deciphers the organization of these regions within the amplicon. The arrows indicate the orientation of each fragment, from the lowest to the highest genomic position. Gene names or cytobands related to amplified regions are indicated. **B**, FISH experiments confirmed coamplification of part of the *ALK* locus and five distinct 2p regions in the same cell line.

Whereas in CLB-Br, NB176, and SJNB8, only 1 breakpoint was detected (in introns 11, 4, and exon 23, respectively), 2 breakpoints were observed in the CLB-Ga cell line (in intron 1) and the *ALK* locus appeared to be highly rearranged in the CLB-Re cell line. Altogether, breakpoints within the *ALK* locus were detected in 2 tumors and 6 cell lines.

#### Various *ALK* rearrangements characterized by capture and paired-end sequencing

To further explore *ALK* rearrangements observed by array-CGH and document the nature of the involved partner, we conducted paired-end sequencing after DNA capture with a specific bait library. Files were processed to identify genomic rearrangements that matched with the breakpoints detected by array-CGH. For the breakpoints identified by array-CGH for which this analysis did not identify any rearrangement, a further exploration of the capture data files was conducted with less stringent filters in the vicinity of the expected regions of breakpoint.

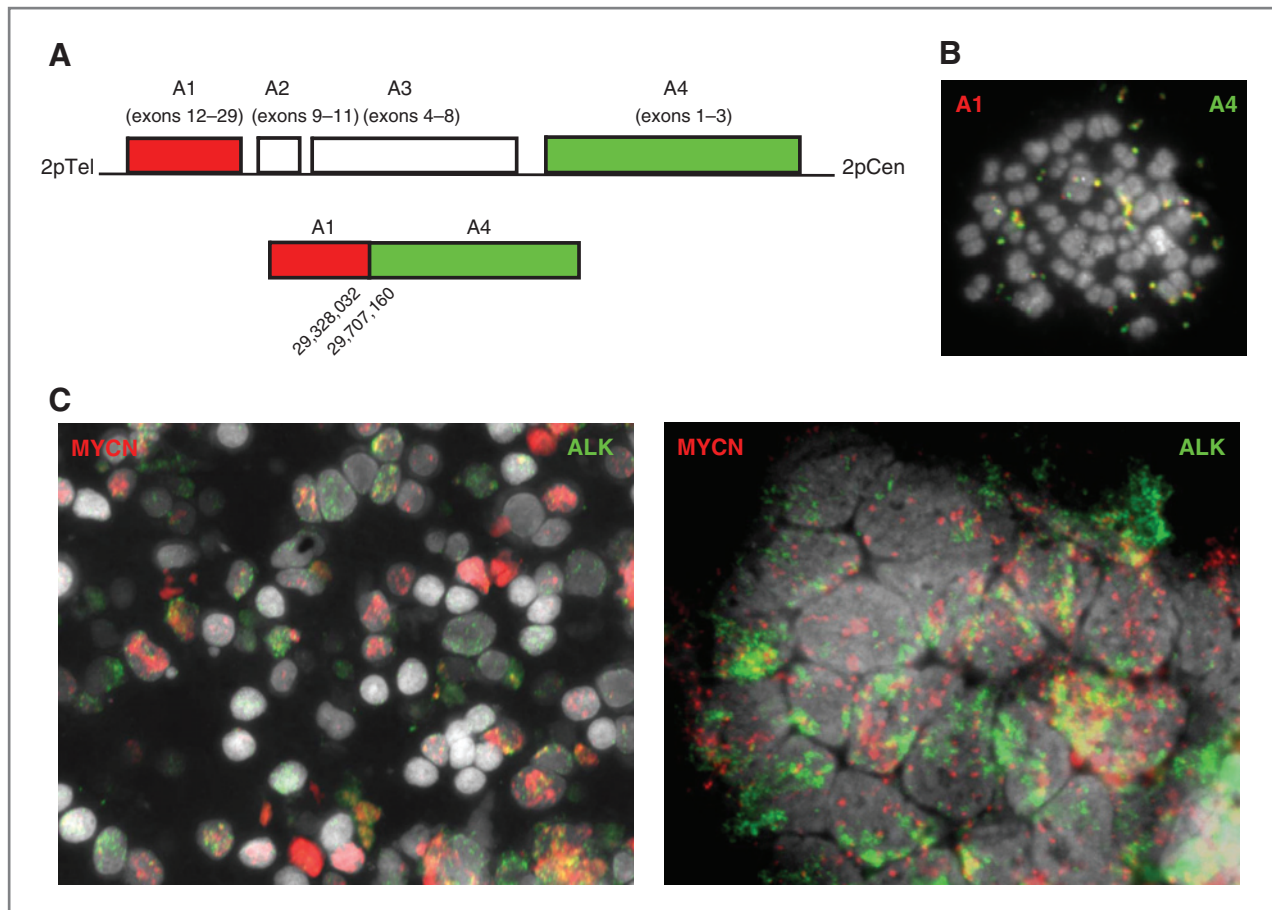
The capture and paired-end sequencing strategy identified an inverted duplication in CLB-Br and a large duplication in SJNB8, which were experimentally validated (Supplementary Table S2). In CLB-Br, the rearrangement was shown to be somatic, as it was not detected in the lymphocytes of the patient (data not shown). This rearrangement targeted the intron 11 of the *ALK* gene, however the exact position of the breakpoint could not be determined because of homology between regions of the 2p chromosome involved in this duplication, i.e. sequences extending from positions

29,335,931 to 29,336,086 and from positions 29,336,256 to 29,336,425. No fusion gene is expected from this rearrangement. In SJNB8, the *ALK* gene broken in exon 23 is fused to intron 11 of the *CLIP4* gene. These 2 genes are fused in the opposite transcriptional orientation and are therefore not expected to lead to fusion transcripts and proteins.

For the CLB-Re cell line, at least seven copy number transitions were detected within the *ALK* locus (Fig. 1B) and the capture approach allowed the identification of several intra and interchromosomal rearrangements that were experimentally validated. In particular three deletions were confirmed, as well as 3 interchromosomal rearrangements with chromosome 3 (Supplementary Table S2). FISH analysis revealed the presence of 2 abnormal derivatives in all examined metaphases of this tetraploid cell line (18), which is consistent with a highly rearranged *ALK* gene in a homogeneous cell population (Supplementary Fig. S1).

In the CLB-Ga cell line, the capture approach identified a rearrangement between the intron 1 of the *ALK* locus and a telomeric sequence (Supplementary Table S2). The repeated structure of the telomeric sequence precluded the design of primers for PCR confirmation. However, sequencing of larger fragments using a whole-genome mate-pair strategy (unpublished results) identified the same rearrangement and allowed PCR primers design and validation on genomic DNA. The precise nature of the telomere involved in this rearrangement remains unknown at that time.

For the NB176 primary tumor, inverse PCR (Supplementary Methods) allowed the characterization of an unbalanced



**Figure 3.** *ALK* amplification and rearrangement in the CLB-Bar cell line and tumors at diagnosis and relapse. **A**, in the CLB-Bar cell line, regions A1 to A4 show amplification and are separated by nonamplified regions (upper part). An intragenic rearrangement juxtaposes the region encoding exons 1 to 3 (A4 region) to the one encoding exons 12 to 29 (A1 region; bottom). **B**, FISH analysis shows that the 2 parts of the *ALK* locus, A1 (RP11-1116M6, red) and A4 (RP11-453M4, green), are juxtaposed in a same population of dmin in the CLB-Bar cell line. **C**, FISH analysis with MYCN (RP11-463P22, red) and ALK (RP11-328L16, green) BAC probes on tumor appositions. Left, tumor at diagnosis; right, tumor at relapse.

translocation between the *ALK* gene and a region of chromosome 1 that does not contain any gene (Supplementary Table S2). The positions of the breakpoints are fully consistent with the array-CGH profile showing 1p deletion and 2p gain in this sample.

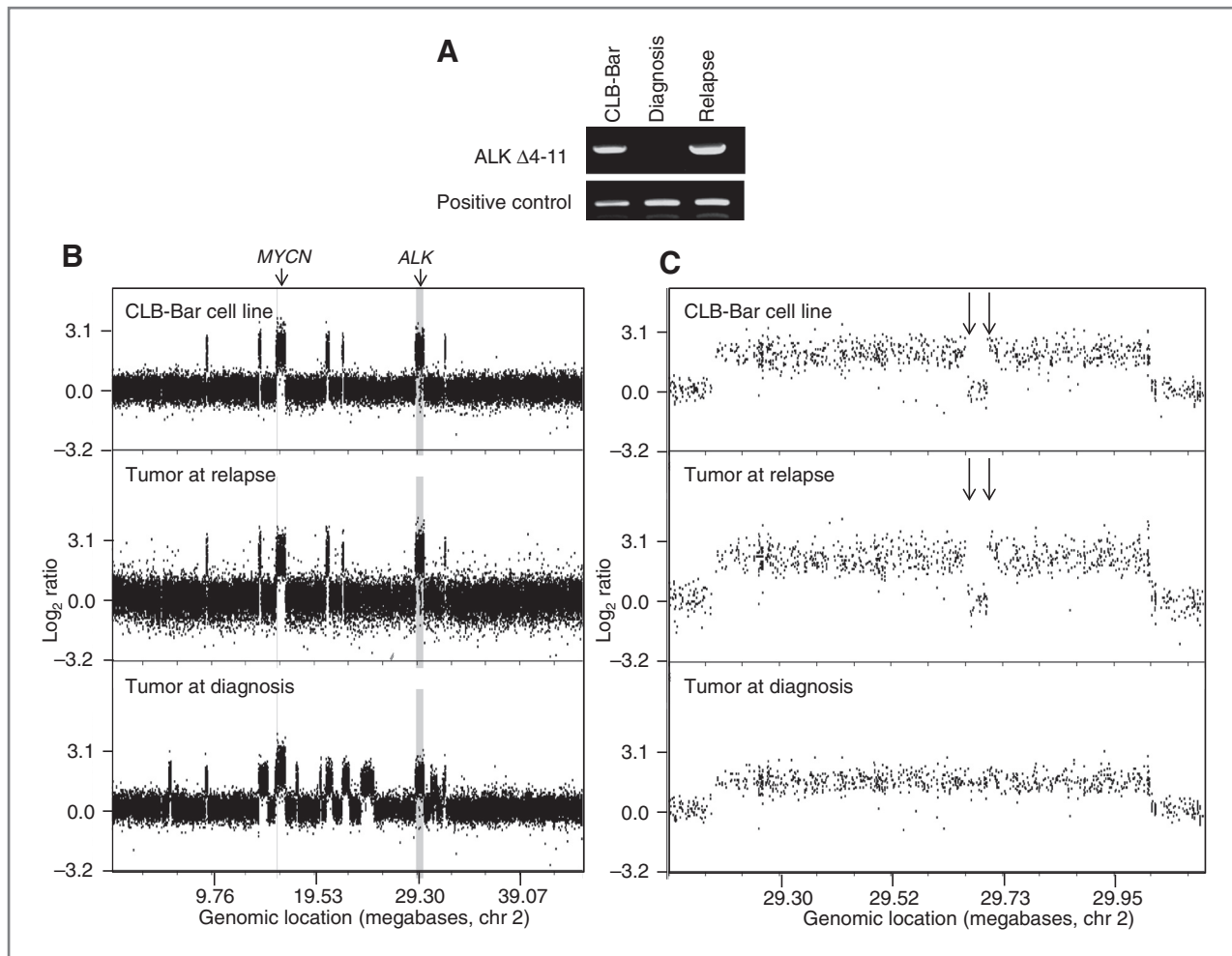
The case of the N206/Kelly cell line is different. Indeed, a translocation involving the *ALK* locus, detected by FISH analysis using the Break Apart Vysis probe, has been reported in this cell line (22). Interestingly, we did not observe any transition in copy number within the *ALK* locus, neither with our specific array, nor with the SNP 6.0 array. Nevertheless, the capture and paired-end sequencing approach allowed the identification of an interchromosomal rearrangement between the *ALK* gene and the *CLPTMIL* gene located on chromosome 5 (Supplementary Table S2). Reverse-transcriptase PCR (RT-PCR) confirmed the expression of a fusion transcript between exon 4 of the *ALK* gene and exon 8 of the *CLPTMIL* gene (data not shown). As the *CLPTMIL* sequence is not in frame, a fusion protein of 405 amino acids is predicted containing the first 385 amino acids of the ALK receptor rapidly followed by a STOP codon. FISH analysis with several BACs scattered over the *ALK*

gene clearly showed that this cell line harbors 2 normal copies of the *ALK* gene and 1 copy disrupted between positions 29,351,163 and 29,513,137 (Supplementary Fig. 2 and Supplementary Table S2). This observation is, therefore, consistent with the absence of any transition in copy number within the *ALK* locus and suggests that one part of the disrupted *ALK* copy may be translocated to chromosome 5.

#### Complex patterns of 2p coamplification involving the *ALK* gene

For IMR32, the capture and paired-end sequencing strategy indicated that the 2 breakpoints located on each side of the *ALK* partial amplicon were pasted to a part of chromosome bands 2p14 and 2p16.2, also amplified in this cell line. Additional links between the other 2p amplicons were detected as indicated in Supplementary Table S2 and confirmed by PCR. Altogether, it is possible to draw a scheme representing the structure of a complex amplicon containing various parts of chromosome 2, including a piece of the *ALK* gene (Fig. 2A). FISH experiments confirmed that the different parts of this structure were indeed present in a common homogeneous





**Figure 4.** Molecular analysis of the CLB-Bar cell line and tumor DNA at diagnosis and relapse. **A**, PCR analysis confirmed that the rearranged *ALK* allele is present in the genomic DNA of the CLB-Bar cell line and the tumor at relapse but not in that of the tumor at diagnosis. We used primers that amplify part of the *PPAPDC1A* gene on chromosome 10 as a positive control. **B**, SNP 6.0 array genomic profiles showing *ALK* amplification and various 2p amplified regions in the CLB-Bar cell line, the tumor at relapse and the tumor at diagnosis. **C**, enlargement of the *ALK* locus for the three samples; the rearranged *ALK* allele is detected in the cell line and tumor at relapse by the absence of amplification of a 39 kb region (arrows).

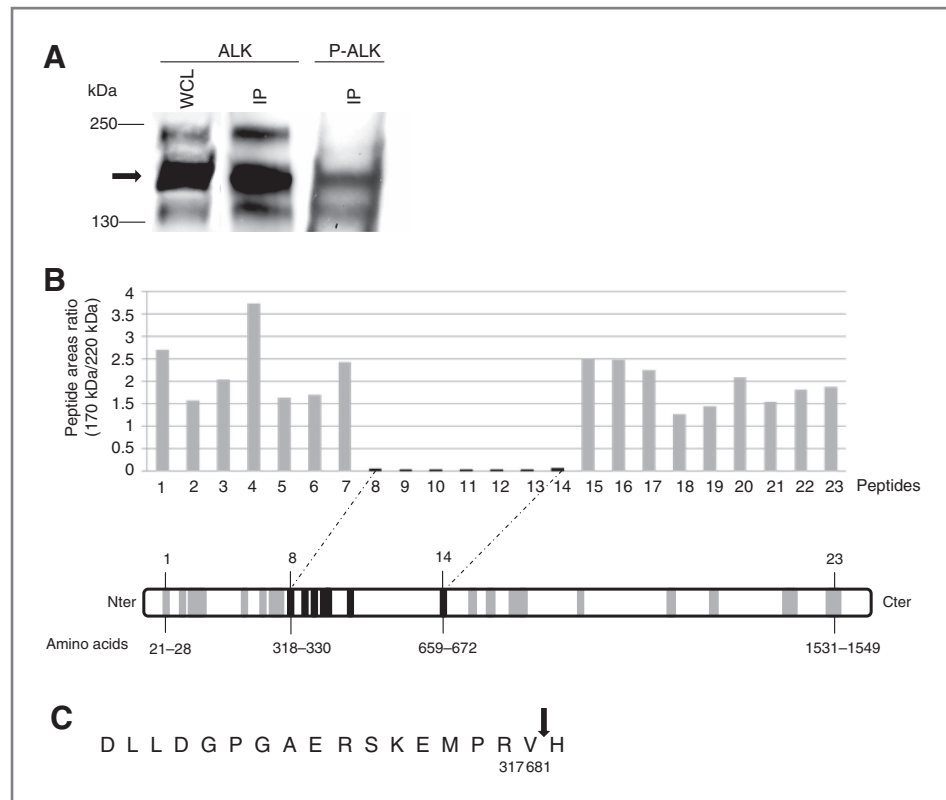
staining region (hsr), previously identified on a derivative chromosome der1 t(1qter→1p32:17q21→17qter(inshsr2)) (ref. 18; Fig. 2B).

We applied the same approach for the primary tumor NB838 and the breakpoint revealed by array-CGH was precisely mapped at position 29,778,881 in the second intron of the *ALK* gene (Supplementary Table S2). The *ALK* gene was fused to repeated sequences precluding the identification of the exact partner involved in the rearrangement. A closer examination of the capture and paired-end data revealed other rearrangements within the *ALK* gene with various 2p amplicons, indicating a highly rearranged *ALK* locus in this tumor (data not shown).

Finally, for the CLB-Bar cell line, the same strategy revealed a more complex pattern of rearrangements targeting the *ALK* gene than first expected from the ultrahigh density array. It indeed confirmed the 2 breakpoints initially detected by array-CGH but also revealed additional breakpoints within the *ALK*

locus (Supplementary Table S2). A more detailed examination of this array was consistent with these results, and other 2p amplified regions detected by SNP 6.0 array appeared to be involved in some rearrangements with the *ALK* locus (Supplementary Table S2 and Supplementary Fig. S3). Importantly, the rearrangement between positions 29,328,032 (intron 11) and 29,707,160 (intron 3) juxtaposes the region encoding exons 1 to 3 to the one encoding exons 12 to 29 of the *ALK* gene (Fig. 3A). This rearrangement was validated by PCR and complementary experiments revealed that a variant *ALK* protein is produced from this genomic rearrangement (*vide infra*). FISH experiments confirmed that the 2 *ALK* pieces involved in the rearrangement, A1 and A4, were coamplified in a common population of dmin (Fig. 3B). These dmin also contained the 2p amplicons located at around 9, 14, 20, and 22 millions, as well as the A2 and A3 regions of the *ALK* gene. The *MYCN* locus was amplified in a distinct population of dmin (Supplementary Fig. S3).

**Figure 5.** Identification of the  $ALK^{\Delta 4-11}$  protein variant in the CLB-Bar cell line. **A**, in addition to bands at 220 and 140 kDa, a major band at 170 kDa (arrow) was detected by Western blot analysis using an ALK antibody directed against the kinase domain of the receptor. The various forms are also observed after immunoprecipitation (IP) with ALK antibodies. The 170 kDa variant strongly reacts with an antiphospho-ALK (P-ALK, Tyr 1604). WCL, whole cell lysate. **B**, proteomic analysis and quantification of peptide areas ratio of the 170 kDa/220 kDa forms revealed an underrepresented amino acid region in the extracellular domain of the 170 kDa form (peptides 8–14 in black, amino acids 318–672). Position of the 23 quantified peptides along the ALK receptor is shown below the histogram. **C**, mass spectrometry analysis identified 1 peptide overlapping the junction between amino acids 317 (R, last amino acid encoded by exon 3) and 681 (V, first amino acid encoded by exon 12).



### The rearranged *ALK* locus is only observed at relapse

As the CLB-Bar cell line was derived from a NB tumor at relapse, we sought to determine when *ALK* amplification and rearrangement occurred. First, FISH analysis with *MYCN* and *ALK* probes on tumor appositions revealed a great heterogeneity in the amplification of both loci in the tumor at diagnosis (Fig. 3C, left). At relapse, heterogeneity was significantly reduced and most of the nuclei exhibited amplification of *MYCN* and *ALK* (Fig. 3C, right). Second, PCR analysis indicated that the rearranged *ALK* locus was present in the tumor at relapse, and is therefore not an event acquired during the culture process. However, this rearrangement was not detected in DNA extracted from the tumor at diagnosis (Fig. 4A). SNP 6.0 array analysis revealed that the pattern of amplicons on chromosome 2p in the CLB-Bar cell line is similar to the profile of the tumor at relapse but different from the profile of the tumor at diagnosis (Fig. 4B). Strikingly, the *ALK* locus was already amplified in the tumor at diagnosis (Fig. 4B and C) but, in agreement with data obtained by PCR, it did not appear rearranged in the tumor at diagnosis (Fig. 4C). Altogether, these results indicate that the *ALK* gene was amplified at diagnosis in a subset of tumor cells and that the rearranged allele was observed at the relapse stage only, suggesting that it may be implicated in the aggressiveness of the tumor.

### Characterization of the $ALK^{\Delta 4-11}$ protein variant in the CLB-Bar cell line

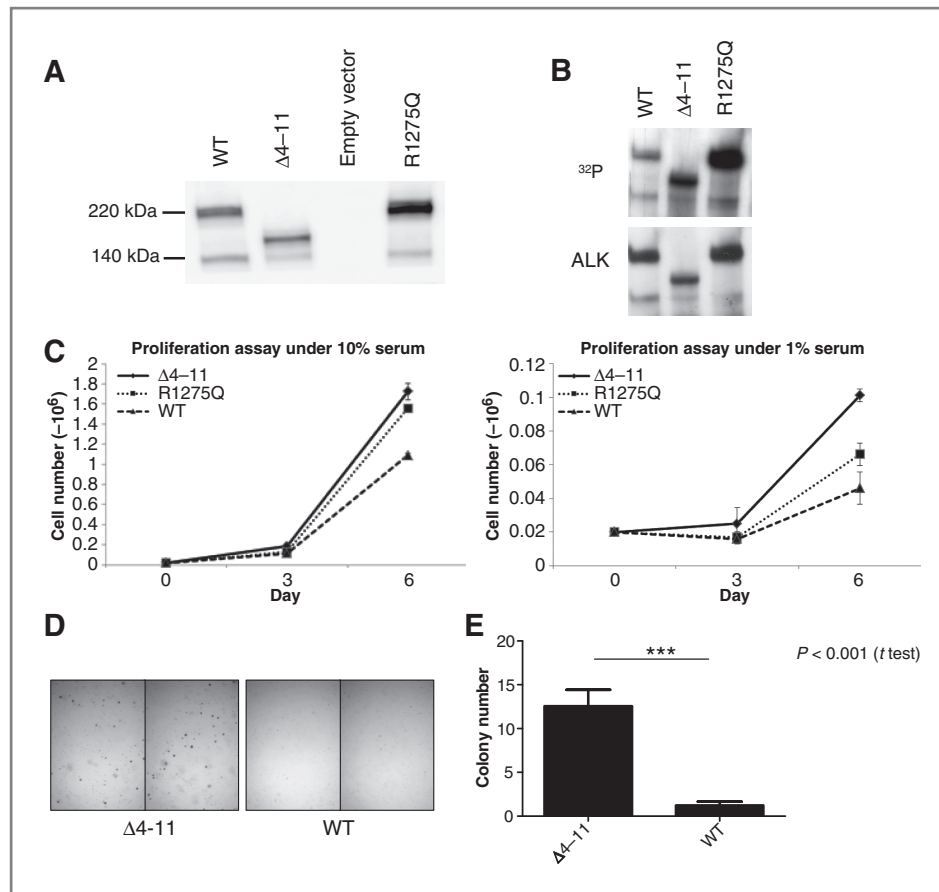
We further showed that the amplified and rearranged *ALK* allele in the CLB-Bar cell line is expressed at the protein level.

Indeed, Western blot analysis revealed that a variant protein of 170 kDa was the main ALK form in this cell line (Fig. 5A). Mass spectrometry analysis determined that a part of the extracellular domain was missing in this 170 kDa form (Fig. 5B). A peptide overlapping the junction of the ALK variant between amino acids 317 and 681 was detected in the proteomic analysis confirming that the variant lacks the amino acids encoded by exons 4 to 11 (Fig. 5C). We, therefore, named this variant,  $ALK^{\Delta 4-11}$ . The missing exons encode part of the first and the complete second Meprin, A-5, receptor protein-tyrosine phosphatase mu (MAM) domains as well as the potential ligand-binding site (391–401) and the LDLa domain (453–471; refs. 4, 5). Interestingly, we observed that the  $ALK^{\Delta 4-11}$  variant was highly phosphorylated (Fig. 5A).

### Oncogenic properties and impaired maturation of $ALK^{\Delta 4-11}$

To further characterize the  $ALK^{\Delta 4-11}$  variant, it was stably expressed in NIH3T3 cells (Fig. 6A). As compared with the WT receptor, this variant exhibited a much stronger *in vitro* kinase activity (Fig. 6B). Moreover, expression of the  $ALK^{\Delta 4-11}$  variant favored NIH3T3 cell proliferation compared with the WT ALK receptor (Fig. 6C) and led to a higher number of colonies in a soft agar assay (Fig. 6D and E). Finally, subcutaneous injection in nude mice showed that cells expressing this variant induced tumors with a higher frequency (5/5) compared with cells expressing the WT receptor (2/5).

We also analyzed the glycosylation status and the subcellular localization of the  $ALK^{\Delta 4-11}$  receptor. Figure 7A shows that the



**Figure 6.** Oncogenic properties of  $ALK^{\Delta 4-11}$ . **A**, Western blot analysis of NIH3T3 cells stably expressing ALK WT,  $ALK^{\Delta 4-11}$ , or ALK R1275Q. **B**, increased kinase activity of the  $ALK^{\Delta 4-11}$  variant.  $^{32}\text{P}$  incorporated in ALK immunoprecipitates is visualized by autoradiography (top) before immunoblotting with an anti-ALK antibody (bottom). **C**, NIH3T3 cells expressing  $ALK^{\Delta 4-11}$  showed increased proliferation compared with those expressing ALK WT. The number of living cells is reported at various time points. **D**, increased colony formation in soft agar assay of NIH3T3 cells expressing  $ALK^{\Delta 4-11}$  as compared with cells expressing ALK WT. **E**, colony number quantification of soft agar experiments conducted in triplicates.

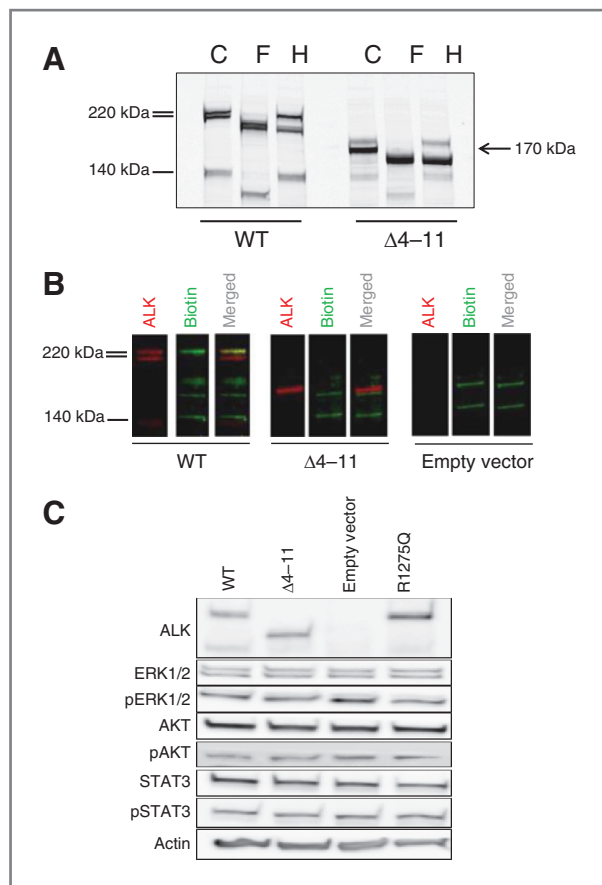
$ALK^{\Delta 4-11}$  variant was present as a major band sensitive to endoglycosidase H treatment, as it is the case for the lower band of the 220 kDa doublet of WT ALK. The various forms of WT ALK and the  $ALK^{\Delta 4-11}$  variant were sensitive to endoglycosidase F. These data provide evidence that the  $ALK^{\Delta 4-11}$  variant corresponds to a partially glycosylated form of ALK likely retained in the endoplasmic reticulum. Biotinylation experiments confirmed that the  $ALK^{\Delta 4-11}$  variant was indeed intracellular, as it was revealed by ALK antibodies but not by biotin, as the lower band of the 220 kDa doublet of WT ALK (Fig. 7B). The analysis of a subset of potential downstream targets of the ALK receptor did not reveal any significant differences between the  $ALK^{\Delta 4-11}$  form and the WT receptor (Fig. 7C).

## Discussion

The present study reports that the *ALK* locus is targeted by rearrangements at a high frequency (23%) in NB cell lines and that rearrangements are also observed in a subset of NB tumors. *ALK* amplification and some intragenic rearrangements have been previously reported in NB but not characterized in details (6, 10, 11, 23, 24). Our results show that, in contrast to ALCL, IMT, or NSCLC, neither the breakpoints observed within the *ALK* locus nor the involved partners were recurrent in the studied NB samples. It is noteworthy to mention that the *ALK* gene is highly expressed in most NB, which may render the locus especially prone to rearrange-

ments. Such a link between transcriptional regulation and genesis of genomic aberrations has recently been reported in prostate tumors presenting with a *TMPPRS2-ERG* fusion, in which rearrangements breakpoints were enriched near open chromatin (25).

This work identified 9 samples, including 7 cell lines and 2 primary tumors, in which the *ALK* gene is targeted by rearrangements. In 3 cases, we could document that abnormal transcripts are expressed from these rearrangements. In the N206 sample, we identified a chimeric transcript between ALK and *CLPTMIL* that was not in frame and the biologic function of which remains to be defined. We observed a highly rearranged *ALK* locus in the CLB-Re sample. Recently, a whole-genome mate-pair analysis of this sample revealed an extensive number of rearrangements between 2 regions of chromosomes 2p and 3p (Boeva, Jouannet and colleagues, submitted for publication). This pattern of rearrangements potentially corresponds to the phenomenon of chromothripsis (26) that may provide an explanation for the multiple breakpoints observed in the *ALK* gene. RNA-Seq analysis using a paired-end strategy confirmed the chimera predicted from our capture data between exon 11 of *ALK* and exon 2 of *FHIT* (data not shown). Subsequent RT-PCR indicated that the fusion was not in frame. It remains to be determined whether the truncated ALK formed from this rearrangement harbors biologic activity.



**Figure 7.** Impaired maturation of  $ALK^{\Delta 4-11}$  and analysis of downstream effectors. **A**, cell lysates from NIH3T3 cells expressing  $ALK$  WT or  $ALK^{\Delta 4-11}$  were untreated (C), treated with endoglycosidase F (F) or H (H), then analyzed by Western blot analysis using polyclonal anti- $ALK$ .  $ALK^{\Delta 4-11}$  is endoglycosidase H sensitive, indicating an impaired protein maturation. **B**, biotinylation experiment showing total  $ALK$  protein detected with polyclonal anti- $ALK$  in red and biotinylated proteins detected with streptavidin in green. The  $ALK^{\Delta 4-11}$  variant is not stained by biotin, showing its intracellular retention. **C**, cell extracts from NIH3T3 cells expressing  $ALK$  WT or  $ALK^{\Delta 4-11}$  were analyzed for pERK, pAKT, and pSTAT3.

In the CLB-Bar cell line, the genomic rearrangement targeting the  $ALK$  gene leads to the expression of a novel variant form of the  $ALK$  receptor. We have previously shown that this variant was highly phosphorylated as revealed by an antiphospho Y1586  $ALK$  antibody (10). Using NIH3T3 cells, we have now documented an increased kinase activity of this variant compared with the WT receptor as well as its impaired maturation and intracellular retention. We also showed that the  $ALK^{\Delta 4-11}$  form exhibits oncogenic and tumorigenic properties. Such properties are similar to the ones reported for another short  $ALK$  form,  $ALK^{\text{del}2-3}$ , also truncated in its extracellular domain (27). Whereas Okubo and colleagues observed an increased phosphorylation of STAT3 in cells expressing the  $ALK^{\text{del}2-3}$  form, expression of the  $ALK^{\Delta 4-11}$  variant was not associated with increased phospho-STAT3. This suggests that further characterization of signaling pathways triggered by the  $ALK^{\Delta 4-11}$  variant will therefore be

required. Our results indicate that although rare, genomic rearrangements associated with amplification may lead to  $ALK$  activation in a subset of NB samples through deletions of part of the extracellular domain of the receptor. These observations are reminiscent of the case of 2 others RTK, the PDGFRA<sup>Δ8,9</sup> (PDGR receptor  $\alpha$ ) and the delta epidermal growth factor receptor ( $\Delta$ EGFR)/EGFRvIII for which in-frame deletion mutants of the extracellular domain have been described as potent oncogenes in various human cancers (28–31). These variant receptors have notably been shown to be activated in a ligand-independent manner, which could be the case for the  $ALK^{\Delta 4-11}$  as it lacks the putative ligand-binding site and allows proliferation of NIH3T3 cells under low serum conditions.

The CLB-Bar cell line has been derived from a stage IV tumor at relapse and both samples harbor the same rearranged and amplified  $ALK$  locus, showing that this event was not linked to the *in vitro* culture. Strikingly, in the tumor at diagnosis, we documented an amplification of the whole  $ALK$  locus, but we could not detect the rearrangement. Our model proposes that  $ALK$  amplification occurred early in the oncogenic process. Importantly, FISH analysis documented a great heterogeneity in the amplification of the  $ALK$  locus in the tumor at diagnosis. We can, therefore, speculate that the  $ALK$  rearrangement occurred in a cell without amplification and that this allele was further amplified. Cells exhibiting this rearranged and amplified allele were likely selected during tumor progression and account for most, if not the entire, tumor at relapse. Thus, 2 independent amplification events may be suggested, an early one involving the WT  $ALK$  and a later one, involving the  $ALK^{\Delta 4-11}$  allele. Altogether, our results suggest that amplification and rearrangement would cooperate to activate the  $ALK$  receptor, resulting in an increased aggressiveness of the tumor.

In conclusion, we document a novel  $ALK$  truncated form bearing oncogenic properties and associated with tumor aggressiveness. Our data suggest that it may be useful to investigate  $ALK$  amplification and rearrangement at the time of relapse in NB patients with refractory tumors using high-resolution SNP profiling or RT-PCR experiments. Patients presenting with tumors exhibiting  $ALK$  amplification and/or deletion of the extracellular domain may potentially benefit from  $ALK$ -targeted therapy.

#### Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

#### Authors' Contributions

**Conception and design:** O. Delattre, I. Janoueix-Lerosey

**Development of methodology:** G. Schleiermacher, S. Jouannet

**Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.):** A. Cazes, C. Louis-Brennetot, P. Mazot, F. Dingli, B. Lombard, J. Cappo, V. Combaret, G. Schleiermacher, S. Ferrand, G. Pierron, M. Vigny

**Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis):** A. Cazes, C. Louis-Brennetot, V. Boeva, J. Cappo, S. Ferrand, G. Pierron, E. Barillot, D. Loew, O. Delattre, I. Janoueix-Lerosey

**Writing, review, and/or revision of the manuscript:** A. Cazes, C. Louis-Brennetot, G. Schleiermacher, G. Pierron, O. Delattre, I. Janoueix-Lerosey

**Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases):** P. Mazot, R. Daveau, V. Combaret, G. Schleiermacher, O. Delattre

**Study supervision:** I. Janoueix-Lerosey



## Acknowledgments

The authors are grateful to Marie-Claude Boutterin, Sarah Cohen-Gogo, Virginie Perrin, and Didier Surdez for their critical help and technical support. We thank the PICT-BDD of Institut Curie for imaging facilities and D. Gentien and his team from the translational department of Institut Curie for SNP 6.0 array experiments.

## Grant Support

The U830 Inserm laboratory is supported by grants from the Institut National du Cancer, the Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe labellisée), the Association Hubert Guoin, Les Bagouz à Manon, les amis de Claire and Enfance et

Santé. The Laboratory of Proteomic Mass Spectrometry is supported by the Cancéropôle Ile-de-France and the Institut National du Cancer. A. Cazes is the recipient of a fellowship of the Cancéropôle Ile-de-France. The U900 Inserm laboratory is supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe labellisée).

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

Received April 6, 2012; revised September 11, 2012; accepted October 10, 2012; published OnlineFirst November 8, 2012.

## References

- Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 2003;3:203–16.
- Janoueix-Lerosey I, Schleiermacher G, Delattre O. Molecular pathogenesis of peripheral neuroblastic tumors. *Oncogene* 2010;29:1566–79.
- Maris JM. Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med* 2010;362:2202–11.
- Chiarle R, Voena C, Ambrogio C, Piva R, Inghirami G. The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nat Rev Cancer* 2008;8:11–23.
- Palmer RH, Vernersson E, Grabbe C, Hallberg B. Anaplastic lymphoma kinase: signalling in development and disease. *Biochem J* 2009;420:345–61.
- Caren H, Abel F, Kogner P, Martinsson T. High incidence of DNA mutations and gene amplifications of the ALK gene in advanced sporadic neuroblastoma tumours. *Biochem J* 2008;416:153–9.
- Chen Y, Takita J, Choi YL, Kato M, Ohira M, Sanada M, et al. Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature* 2008;455:971–4.
- de Pontual L, Kettaneh D, Gordon CT, Oufadem M, Boddaert N, Lees M, et al. Germline gain-of-function mutations of ALK disrupt central nervous system development. *Human Mutation* 2011;32:272–6.
- George RE, Sanda T, Hanna M, Frohling S, Luther W II, Zhang J, et al. Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature* 2008;455:975–8.
- Janoueix-Lerosey I, Lequin D, Brugieres L, Ribeiro A, de Pontual L, Combaret V, et al. Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature* 2008;455:967–70.
- Mosse YP, Laudenslager M, Longo L, Cole KA, Wood A, Attiyeh EF, et al. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature* 2008;455:930–5.
- De Brouwer S, De Preter K, Kumps C, Zabrocki P, Porcu M, Westerhout EM, et al. Meta-analysis of neuroblastomas reveals a skewed ALK mutation spectrum in tumors with MYCN amplification. *Clin Cancer Res* 2010;16:4353–62.
- Passoni L, Longo L, Collini P, Coluccia AM, Bozzi F, Podda M, et al. Mutation-independent anaplastic lymphoma kinase overexpression in poor prognosis neuroblastoma patients. *Cancer Res* 2009;69:7338–46.
- Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, Dalton A, Siegel SE, Wong KY, et al. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med* 1985;313:1111–6.
- Janoueix-Lerosey I, Schleiermacher G, Michels E, Mosseri V, Ribeiro A, Lequin D, et al. Overall genomic pattern is a predictor of outcome in neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2009;27:1026–33.
- Webb TR, Slavish J, George RE, Look AT, Xue L, Jiang Q, et al. Anaplastic lymphoma kinase: role in cancer pathogenesis and small-molecule inhibitor development for therapy. *Expert Rev Anticancer Ther* 2009;9:331–56.
- Schleiermacher G, Bourdeaut F, Combaret V, Picron G, Raynal V, Aurias A, et al. Stepwise occurrence of a complex unbalanced translocation in neuroblastoma leading to insertion of a telomere sequence and late chromosome 17q gain. *Oncogene* 2005;24:3377–84.
- Schleiermacher G, Janoueix-Lerosey I, Combaret V, Derre J, Couturier J, Aurias A, et al. Combined 24-color karyotyping and comparative genomic hybridization analysis indicates predominant rearrangements of early replicating chromosome regions in neuroblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2003;141:32–42.
- Schleiermacher G, Raynal V, Janoueix-Lerosey I, Combaret V, Aurias A, Delattre O. Variety and complexity of chromosome 17 translocations in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;39:143–50.
- Moog-Lutz C, Degoutin J, Gouzi JY, Frobert Y, Brunet-de Carvalho N, Bureau J, et al. Activation and inhibition of anaplastic lymphoma kinase receptor tyrosine kinase by monoclonal antibodies and absence of agonist activity of pleiotrophin. *J Biol Chem* 2005;280:26039–48.
- Mazot P, Cazes A, Boutterin MC, Figueiredo A, Raynal V, Combaret V, et al. The constitutive activity of the ALK mutated at positions F1174 or R1275 impairs receptor trafficking. *Oncogene* 2011;30:2017–25.
- McDermott U, Iafrate AJ, Gray NS, Shioda T, Classon M, Maheswaran S, et al. Genomic alterations of anaplastic lymphoma kinase may sensitize tumors to anaplastic lymphoma kinase inhibitors. *Cancer Res* 2008;68:3389–95.
- Caren H, Erichsen J, Olsson L, Enerback C, Sjoberg RM, Abrahamsson J, et al. High-resolution array copy number analyses for detection of deletion, gain, amplification and copy-neutral LOH in primary neuroblastoma tumors: four cases of homozygous deletions of the CDKN2A gene. *BMC Genomics* 2008;9:353.
- Fix A, Lucchesi C, Ribeiro A, Lequin D, Pierron G, Schleiermacher G, et al. Characterization of amplicons in neuroblastoma: high-resolution mapping using DNA microarrays, relationship with outcome, and identification of overexpressed genes. *Genes Chromosomes Cancer* 2008;47:819–34.
- Berger MF, Lawrence MS, Demichelis F, Drier Y, Cibulskis K, Sivachenko AY, et al. The genomic complexity of primary human prostate cancer. *Nature* 2011;470:214–20.
- Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, Yang F, Bignell GR, Mudie LJ, et al. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell* 2011;144:27–40.
- Okubo J, Takita J, Chen Y, Oki K, Nishimura R, Kato M, et al. Aberrant activation of ALK kinase by a novel truncated form ALK protein in neuroblastoma. *Oncogene* 2012 Jan 16. [Epub ahead of print].
- Clarke ID, Dirks PB. A human brain tumor-derived PDGFR- $\alpha$  deletion mutant is transforming. *Oncogene* 2003;22:722–33.
- Ekstrand AJ, Sugawa N, James CD, Collins VP. Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:4309–13.
- Moscato DK, Holgado-Madruga M, Godwin AK, Ramirez G, Gunn G, Zoltick PW, et al. Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res* 1995;55:5536–9.
- Ozawa T, Brennan CW, Wang L, Squatrito M, Sasayama T, Nakada M, et al. PDGFRA gene rearrangements are frequent genetic events in PDGFRA-amplified glioblastomas. *Genes Dev* 2010;24:2205–18.

## **Supplementary Methods**

### **1. *SNP 6.0 arrays***

The arrays were scanned with an HP scanner (Hewlett-Packard Palo Alto, CA) to generate cell intensity files. A primary analysis was performed with Genotyping Console (Affymetrix) to measure quality of generated data (Contrast QC>0.4; Call rate>86%; MAPD>0.4). DNA copy number was subsequently determined using the Affymetrix Power Tools Software Package ([http://www.affymetrix.com/partners\\_programs/programs/developer/tools/powertools.affx](http://www.affymetrix.com/partners_programs/programs/developer/tools/powertools.affx)) and the profiles were then visualized using our VAMP interface (La Rosa *et al.*, 2006).

### **2. *NimbleGen arrays***

Genomic DNA was extracted from cell lines or tumors and analyzed versus reference normal DNA. The samples were labeled and co-hybridized to the NimbleGen arrays according to the manufacturer's protocol. Arrays were washed and then scanned on a GenePix 4000B Scanner using GenePix 6.0 software. Raw data were normalized using NimbleScan v2.5 software (Roche NimbleGen). The normalized data were processed using NimbleScan softwares (segMNT algorithm and then SignalMap v1.9) to obtain data with a resolution of 100 bp (average of 9 features). The data were then analyzed with our VAMP software.

### **3. *Analysis of reads obtained using capture and paired-end sequencing***

Reads that passed the purity filtering were aligned using CASAVA1.7 software (Illumina) on the hg18 version of the human genome. Reads that had a unique alignment on the reference were sorted out. Analysis of insert size distributions showed that fragment lengths followed bimodal distribution with the median between 220 and 267 bp and the standard deviation between 66 and 94 bp (Supplementary figure 4). The second mode observed around 550-650

bp is an artifact of library construction. In order to detect pairs corresponding to structural rearrangements, we then selected the reads for which the read and its mate did not align with a normal orientation and distance. The obtained files were then subjected to the SVDetect algorithm in order to create clusters of pairs corresponding to the same genomic rearrangement (25). Additional filters were applied: (1) clusters containing  $\leq 10$  correct pairs were removed, (2) rearrangements defined as deletions of around 650 bp were filtered out since they correspond to the artifact in libraries construction, (3) clusters of pairs in the vicinity of telomeres or centromeres or corresponding to a satellite or segmental duplication were eliminated, (4) clusters compatible with breakpoints position defined by array-CGH were selected, (5) for each rearrangement, we determined whether it was specific for a sample or observed in several cases.

#### ***4. Mass spectrometry analysis***

##### *1D SDS-PAGE separation and Nano-LC-MS/MS analysis*

After immunoaffinity-purification and deglycosylation with PNGaseF samples were separated directly on a 6% acrylamide SDS-PAGE gel or after TMPP labeling (Gallien et al., 2009). Proteins were visualized by coomassie blue staining (Labsafe GEL Blue, G-Biosciences). Gel slices were reduced, alkylated and subjected to digestion with trypsin (Sequence Grade, Roche Diagnostics) or elastase (Sigma Aldrich) overnight as previously described (B. Fevrier et al., 2004; A. Schlosser et al., 2002). The peptides mixtures were analyzed by nano-LC-MS/MS using an Ultimate3000 system (Dionex S. A.) coupled to an LTQ-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific. Bremen, Germany). Data-dependent acquisition was performed on the LTQ-Orbitrap mass spectrometer in the positive ion mode. Survey MS scans were acquired in the orbitrap on the 475-1200 m/z range with the resolution set to a value of 60 000. Each scan was recalibrated in real time by co-injecting an internal standard from ambient air into the

C-trap ('lock mass option'). The 5 most intense ions per survey scan were selected for CID fragmentation and the resulting fragments were analyzed in the linear trap (LTQ). Target ions already selected for MS/MS were dynamically excluded for 180 s. Data were acquired using the Xcalibur software (version 2.0.5).

#### *Database search and data analysis*

The resulting spectra were then analyzed via the Mascot™ Software created with Proteome Discoverer (version: 1.2.0.92, Thermo Scientific) using an in-house database containing only the ALK protein (gi|62088534 Description: anaplastic lymphoma kinase Ki-1 variant). Carbamidomethylation of cysteines, oxidation of methionine, protein N-terminal acetylation, protein N-terminal TMPP and lysine TMPP for labeled samples were set as variable modifications for all Mascot searches. Specificity of trypsin digestion was set for cleavage after Lys or Arg except before Pro, and three missed trypsin cleavage sites were allowed and no specificity for Elastase digestion. Deglycosylated proteins with PNGaseF were searched with a single amino acid mutation of asparagine to aspartic acid. The mass tolerances in MS and MS/MS were set to 2 ppm and 0.8 Da respectively, and the instrument setting was specified as "ESI-Trap." All data were validated by using myProMS (Pouillet et al., 2007).

#### *Label-free Quantification*

To quantify the ALK protein in bands at 220 kDa and 170 kDa, the extracted ion chromatogram (XIC) signal of the well characterized tryptic peptide ions were manually extracted from the MS survey of nano-LC-MS/MS raw files using the Xcalibur software. XIC areas were integrated in Xcalibur under the QualBrowser interface using the ICIS algorithm. Mean values were calculated for triplicate measurements of two independent experiments.



## 5. *Inverse PCR*

The restriction enzyme *MseI* was selected since one site was present 249 bp upstream the breakpoint identified by high-resolution array-CGH. Five micrograms of gDNA from tumor NB176 was digested with *MseI* at 37°C for 2 hours. After inactivation of the restriction enzyme, the digested fragments were subsequently diluted 6 fold then circularized by ligation for 16 hours at 16°C. The DNA was precipitated and subjected to PCR with primers located in the ALK known sequence upstream the breakpoint, allowing the amplification of both normal and rearranged alleles. PCR fragments were analyzed on a 1% agarose gel. The product presenting with an abnormal size was purified and further sequenced by conventional Sanger capillary sequencing methods; the sequence was aligned on the reference genome to identify the rearrangement partner.

## References

Fevrier B, Vilette D, Archer F, Loew D, Faigle W, Vidal M et al. (2004). Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 9683-9688.

Gallien S, Perrodou E, Carapito C, Deshayes C, Reyrat JM, Van Dorsselaer A et al. (2009). Ortho-proteogenomics: multiple proteomes investigation through orthology and a new MS-based protocol. *Genome Res.* 19:128-135.

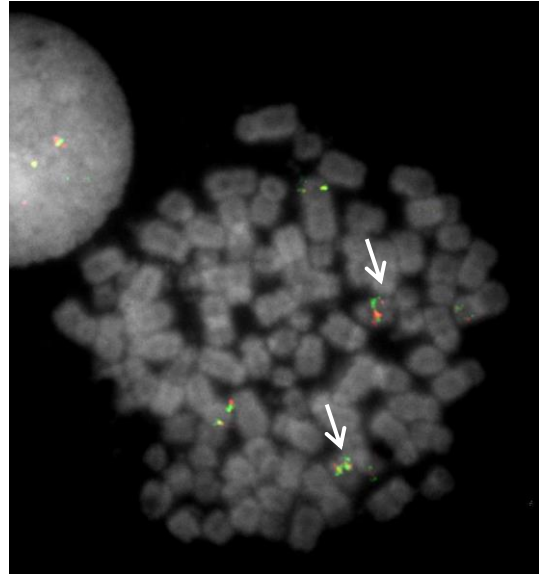
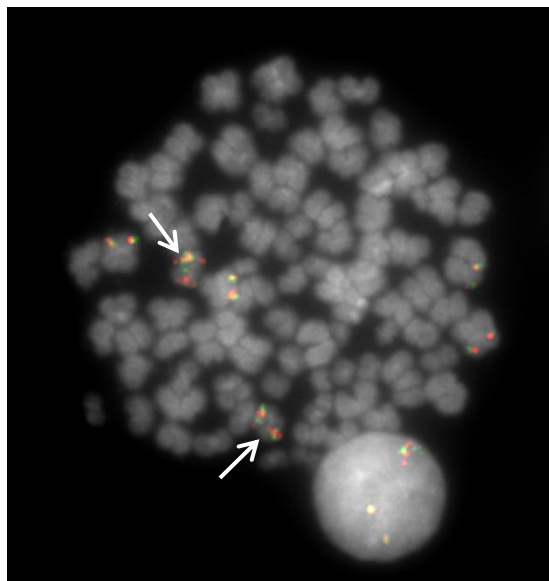
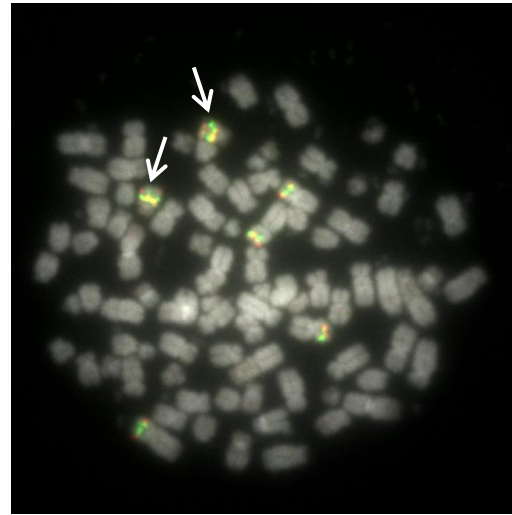
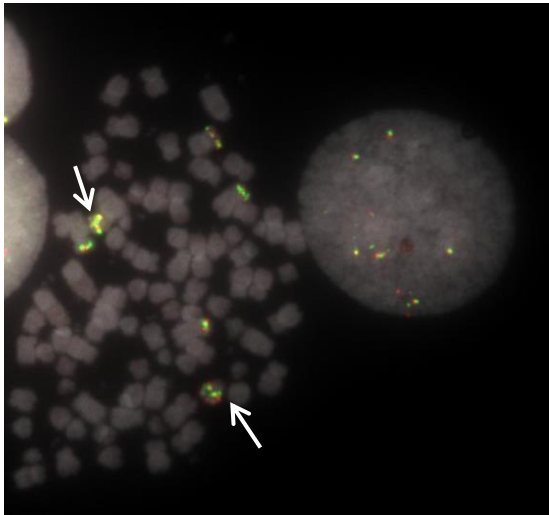
La Rosa P, Viara E, Hupe P, Pierron G, Liva S, Neuvial P, et al. VAMP: visualization and analysis of array-CGH, transcriptome and other molecular profiles. *Bioinformatics* 2006; 22:2066-2073.

Pouillet P, Carpentier S, Barillot E. (2007). *myProMS*, a web server for management and validation of mass spectrometry-based proteomic data. *Proteomics.* 7: 2553-2556.

Schlosser A, Bodem J, Bossemeyer D, Grummt I, and Lehmann WD. (2002). Identification of protein phosphorylation sites by combination of elastase digestion, immobilized metal affinity chromatography, and quadrupole-time of flight tandem mass spectrometry. *Proteomics* 2: 911-918.

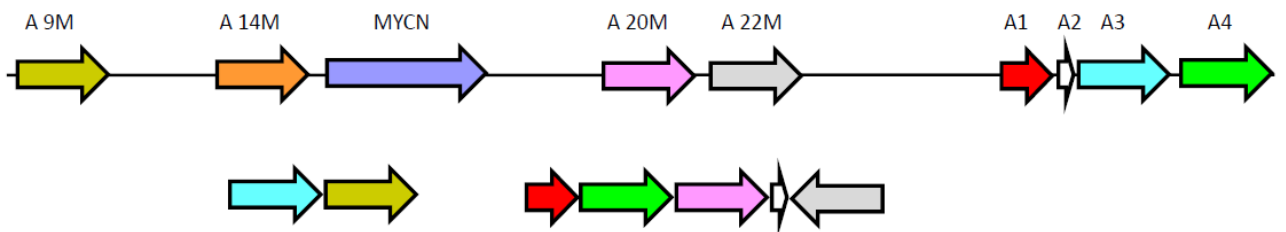
**Supplementary figure 1:** FISH analysis on the CLB-Re cell line using the LSI *ALK* dual color, Break Apart Rearrangement probe (Vysis).

In each of the four shown metaphases, two abnormal derivatives with multiple green and red signals are observed (white arrows), consistent with a highly rearranged *ALK* locus.

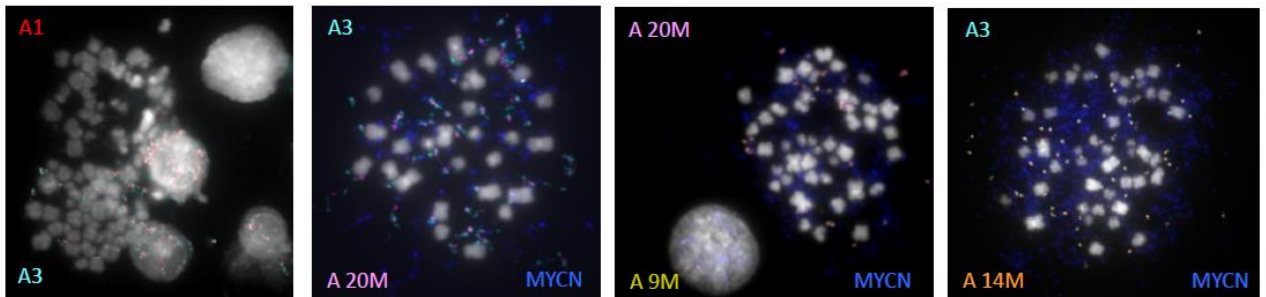


### Supplementary figure 3: 2p amplicons in the CLB-Bar cell line

- A. Scheme of the potential structure of a complex amplicon involving several 2p regions, determined from capture and paired-end sequencing data. The *ALK* gene is amplified in four non-contiguous parts (A1 to A4). The upper part represents the normal position of the regions involved in the amplicon, whereas the lower part deciphers the organization of these regions within the amplicon. The direction of the arrows indicates the orientation of each fragment, from the lowest to the highest genomic position. No links were identified from capture and paired-end sequencing data for the amplicon at 14 millions ("A 14M") and the *MYCN* amplicon.



- B. Co-amplification of parts A1 and A3 of the *ALK* gene in the same population of dmin together with amplicons at 9, 14 and 20 millions («A 9M », « A 14M » and « A 20M »). *MYCN* is amplified in a distinct population of dmin.

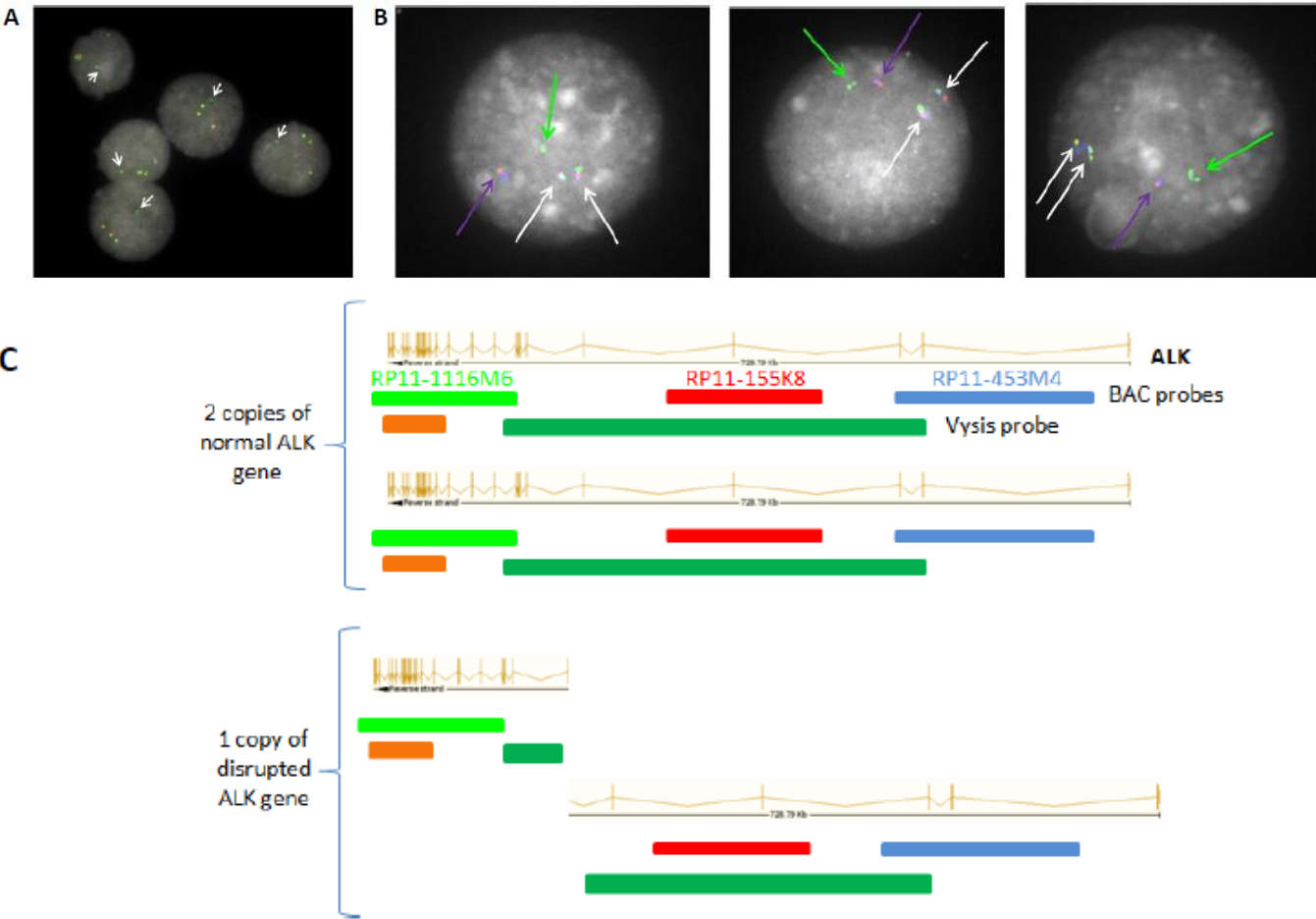


**Supplementary figure 2: FISH analysis on the N206/Kelly cell line with various BAC probes**

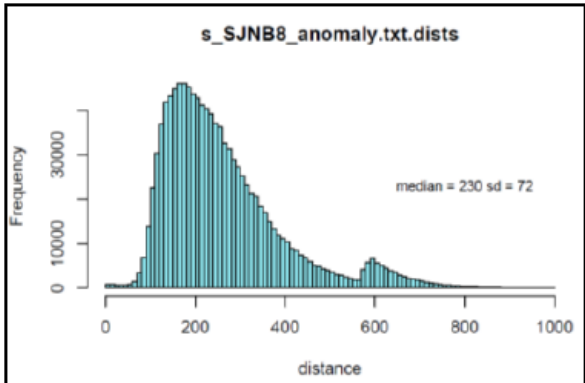
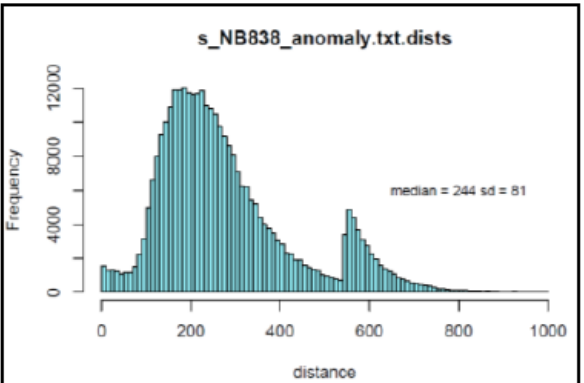
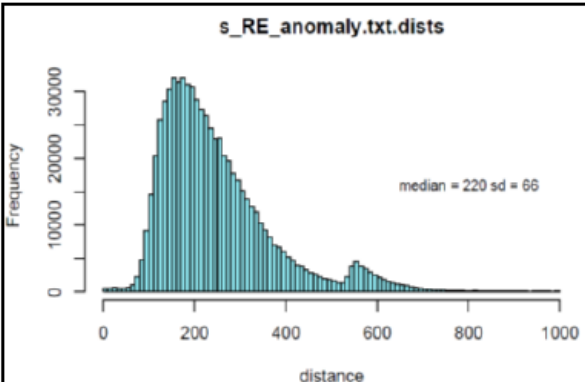
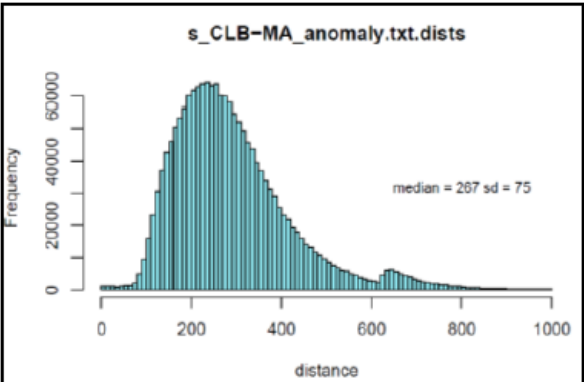
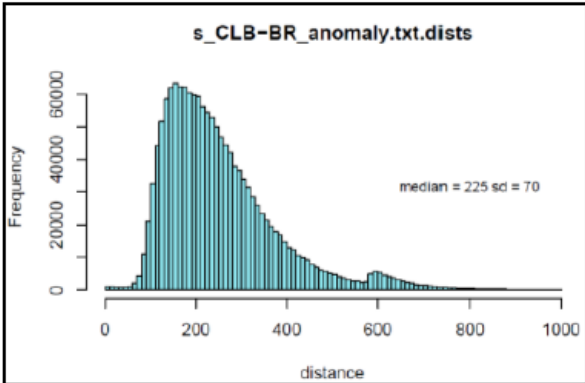
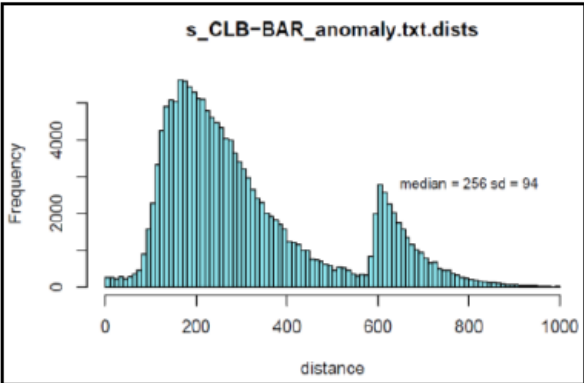
A, FISH using the LSI *ALK* dual color, Break Apart Rearrangement probe (Vysis). In each nucleus, three spots labeled with green and red are detected with the Vysis probe and one spot labeled only with the green part of the probe is seen (white arrows), suggesting a translocation within the *ALK* gene as previously reported by McDermott et al (2008).

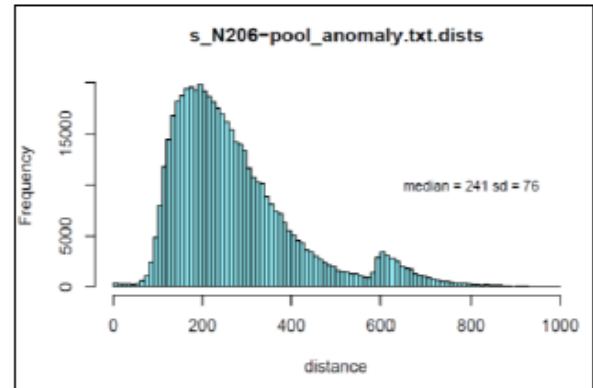
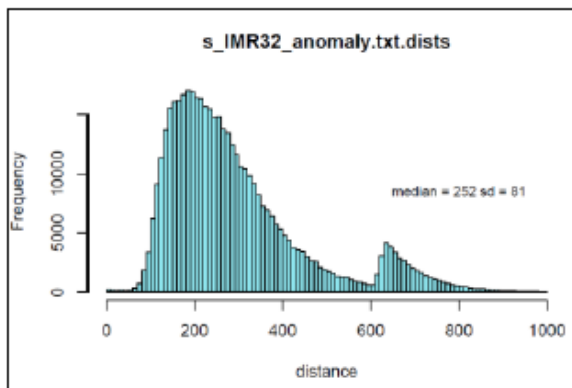
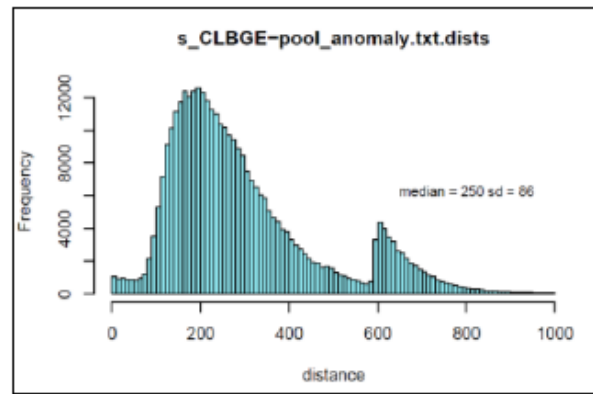
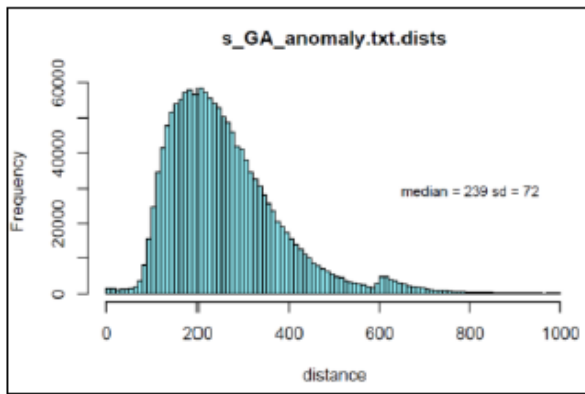
B, FISH using BACs RP11-1116M6, RP11-155K8 and RP11-453M4. Two spots are labeled with the three BACs (white arrows) whereas one spot is labeled only with BACs RP11-155K8 and RP11-453M4 (purple arrow) and one spot is labeled only with the RP11-1116M6 BAC (green arrow).

C, Scheme showing the position of the BACs on the *ALK* gene and the model deduced from the observed signals.



**Supplementary figure 4:** Insert size distributions of fragment lengths after capture and paired-end sequencing for the 10 samples studied





**Supplementary Table 1: Regions targeted for the capture/paired-end sequencing approach**

<b>Id</b>	<b>Start-End</b>	<b>region.size</b>	<b>total.coverage (%)</b>	<b>not covered (%)</b>	<b>X1 (%)</b>	<b>X2 (%)</b>	<b>X3 (%)</b>	<b>X4 (%)</b>	<b>X5 (%)</b>
ALK_50kb_5x_v2	chr2:29,239,144-30,047,936	808793	62.18	37.82	4.91	4.68	4.01	4.00	44.57
2p16_cen_5x	chr2:53,248,038-53,256,591	8554	80.58	19.42	5.42	4.45	4.49	4.49	61.73
2p16_tel_5x	chr2:53,451,500-53,458,602	7103	53.70	46.30	3.62	4.13	4.05	4.05	37.84
ANTXR1_cen_5x	chr2:68,976,912-68,992,949	16038	31.87	68.13	3.44	2.69	2.69	2.69	20.35
ANTXR1_tel_5x	chr2:69,250,540-69,259,562	9023	86.71	13.29	4.52	3.72	2.66	2.66	73.15
MEIS_cen_5x	chr2:66,566,561-66,580,950	14390	79.39	20.61	3.34	3.67	3.00	3.00	66.38
MEIS_tel_5x	chr2:67,557,518-67,568,025	10508	40.65	59.35	3.43	2.74	1.83	1.83	30.83
MYCN_cen_5x	chr2:14,653,726-14,661,433	7708	58.90	41.10	8.46	6.23	4.98	4.98	34.25
MYCN_tel_5x	chr2:16,034,960-16,047,657	12698	57.77	42.23	5.41	4.91	4.16	4.16	39.12
NB838_1_9806154_tel_3x	chr2:9,806,154-9,845,250	39097	60.83	39.17	7.03	7.14	46.65	0.00	0.00
NB838_1_10528979_tel_3x	chr2:10,528,979-10,569,209	40231	56.53	43.47	7.72	6.95	41.86	0.00	0.00
NB838_1_12015554_cen_3x	chr2:12,015,554-12,059,017	43464	46.73	53.27	6.82	6.97	32.95	0.00	0.00
NB838_2_15847603_tel_3x	chr2:15,847,603-15,890,098	42496	58.83	41.17	9.60	9.04	40.19	0.00	0.00
NB838_2_17464381_cen_3x	chr2:17,464,381-17,508,773	44393	41.98	58.02	4.23	4.31	33.43	0.00	0.00
NB838_3_26316328_tel_1x_v2	chr2:26,462,726-26,620,897	158172	52.93	47.07	52.93	0.00	0.00	0.00	0.00
NB838_3_28826255_tel_4x	chr2:28,826,255-28,865,020	38766	44.75	55.25	5.96	4.74	4.80	29.25	0.00
NB838_3_29064629_tel_4x	chr2:29,064,629-29,113,790	49162	61.97	38.03	5.31	4.86	4.88	46.93	0.00
NB838_3_30146268_cen_3x	chr2:30,146,268-30,177,029	30762	29.13	70.87	5.72	4.94	18.46	0.00	0.00
CLB-GA_17q_3x	chr17:59,971,770-60,369,628	397859	47.80	52.20	7.86	6.97	32.97	0.00	0.00

The X1, X2, X3, X4 and X5 columns indicate the percent of the region that is covered at 1, 2, 3, 4 or 5 fold, respectively.

Supplementary Table 2: Information on rearrangements detected by capture and paired-end sequencing and validated by PCR

Sample	Type	Chr A	Chr B	Gene position A	Intron/Exon A	Gene position B	Intron/Exon B	BP position A	BP position B	Orientation A	Orientation B
CLB-Bar	Coamplification	2	2	ALK	Intron 11	ALK	Intron 3	29328032	29707160	Plus	Plus
	Coamplification	2	2	∅	-	ALK	Intron 8	22390887	29381944	Plus	Minus
	Coamplification	2	2	∅	-	HS1BP3	Intron 4	30025056	20694908	Plus	Plus
	Coamplification	2	2	∅	-	ALK	Intron 11	21000250	29328889	Plus	Plus
CLB-Br	Inverted duplication	2	2	ALK	Intron 11	ALK	Intron 11	29335931/2933642	29335931/2933642	Plus	Minus
CLB-Ga	Interchromosomal	2	ND / Telomeric sequence	ALK	Intron 1	ND	-	29806574	ND	Plus	ND
CLB-Re	Interchromosomal	2	3	ALK	Intron 5	∅	-	29423161	65157963	Minus	Plus
	Interchromosomal	2	3	ALK	Intron 4	CNTN3	Intron 3	29557752	74605412	Minus	Plus
	Interchromosomal	2	3	ALK	Intron 11	FHIT	Intron 1	29346060	61180791	Plus	Plus
	Deletion	2	2	ALK	Intron 11	LTBP1	Intron 3	29344476	33156045	Plus	Plus
	Deletion	2	2	ALK	Intron 4	∅	-	29603903	42009571	Plus	Plus
	Deletion	2	2	ALK	Intron 3	VIT	Intron 13	29646730	36893802	Plus	Plus
IMR32	Coamplification	2	2	∅	-	∅	-	14657089	17219746	Minus	Plus
	Coamplification	2	2	∅	-	∅	-	16041259	53454473	Minus	Plus
	Coamplification	2	2	ALK	Intron 2	∅	-	29777721	53254630	Plus	Plus
	Coamplification	2	2	MEIS1	Intron 7	ALK	Intron 4	66576584	29549879	Minus	Plus
	Coamplification	2	2	ETAA1	Intron 1	∅	-	67479177	67559331	Plus	Minus
	Coamplification	2	2	∅	-	ETAA1	Intron 1	68987852	67479503	Minus	Plus
	Coamplification	2	2	ANTXR1	Intron 14	∅	-	69255491	17233166	Plus	Minus
SJNB8	Large duplication	2	2	CLIP4	Intron 11	ALK	Exon 23	29239910	29297152	Minus	Minus
NB838	Coamplification	2	ND/repeated sequences	ALK	Intron 2	ND	-	29778881	ND	Plus	ND
	Coamplification	2	2	∅	-	ALK	Intron 4	16799632	29513245	Minus	Plus
	Coamplification	2	2	∅	-	FAM179A	Intron 9	15867348	29098319	Minus	Plus
	Coamplification	2	2	HPCAL1	Intron 1	∅	-	10362745	10542811	Minus	Minus
N206/Kelly	Balanced translocation	2	5	ALK	Intron 4	CLPTM1L	Intron 7	29517819	1387079	Minus	Minus
NB176 *	Interchromosomal	2	1	ALK	Intron 4	∅	-	29592453	60326284	Plus	Plus

\* This rearrangement was characterized by inverse PCR



Primer F	Primer R
AGAGACAAAGATGGGGCAGA	TAAAGCCCATTTCCATGCTC
CACCATCCCCTAACTCCTCA	GAAGTGCCTGACCCTCTCAG
TCCTACAACCTTCCCCTCG	CCCATTGTGGAGAAGGAAAA
TTGCCTCCCATATCTTCACC	AGTGTGAGGACTCCGTGCT
GGATATTTTCTGGAGTTATA	GAGAGGGGTCCTGGAGAA
CCTTCATGCAGCACATCTTG	GCAGCATTCTTCTCAGCACA
ACCATCCACTCTGTGGGAAA	GATGGGACCATACAGCCAGT
ACGGTGGCTTATGCTGGTAG	TCCCGTACTGGTCTCAAAC
ACCATCCAACCTGCACCATTG	CTGCCCTGCTGATTAACCTC
TTTGTGTAAGCACCCAGCAG	TCACCACTTCCCCTCTGTT
GGTACCCAGCATGAATGCAA	GCAGTCCTTGGTGATGAGGT
AGGCCTGAAGGAACCACCT	CCATCAAAGCTGGTTCAAGA
ACAGAAATGCCAAACCAAGG	TGCCCACTTCAGTCACTTTG
TTCCCTTAGGCAATGGGAGTG	TCCCAGAAAAGTGGTGAAC
ACCACAAAAGGGGAATAGGG	ACAAGCCGCCTCAAGAGATA
AAGTATCGCTCCACGTCAGG	TGTGAAGGTCCTGTGCAAGT
CCGGAAGTTCTGTGTGTAA	ACGACAATTCCGAGATGACC
CCCATGGCTGCTTCTCTAAG	TGCAGCTTAGAGGATTATGTGTT T
CCAGGCAATTATGTGAAGCA	ACCAGAACTCAGGAGCAGGA
CACCTCCAACCTGAACCATCA	CACTCTTGCTCCTTCCATCC
CAGGACAGGAGCCAGAGTGT	AATGTGTGTAATATTTCCATTTTG
GTTGGGGTGAGGACAGAAGA	CTTTTGGCACCCCTCACTAC
TTCAACACGGCTGCTACTTG	AGTGCCTGGTGAGGCTAAGA
TGGGTTTGGGTCTGTCTTCT	TTTCGGGCATGTCTTGATCT
CATCGGGTAAGGGGAAC	TGATCAAGAGCTTCCCTGGT
TGGGCTAAGGTGAGTTCTGG	GCCGTTAGAATGGGCTGTAA

**Supplementary Table 3 : primers used to prepare 5-kb PCR probes and BAC used for FISH analysis**

PCR probes	size	Primer F	Primer F	Primer R	Primer R
		Sequence	Start position hg18	Sequence	Start position hg18
R1 (MYCN)	4,800 bp	TGCCCTGGGTATCACAGACA	chr2:15,243,112	GTCACCACGAGGCTGAATTT	chr2:15,247,911
R2 (2p24.2)	4,822 bp	GTGCAACCTCTCCTTCTTGC	chr2:17,222,517	TGCTCTGGTAGCTGGATGTG	chr2:17,227,338
R3 (ALK)	5,006 bp	GAGGATTGATGCCGATCTGT	chr2:29,555,026	AGCCAGGTTGGGTATGTGAG	chr2:29,560,031
R4 (2p16)	4,968 bp	CTGCCGTCTGATGTAACGAA	chr2:53,254,630	CCATGGGCTTGCTGTACATA	chr2:53,259,597
R5 (MEIS)	4,914 bp	CAGATTTGATCTGAGTTGGGAAC	chr2:66,647,082	GACGCAGCTGAGCAGGAT	chr2:66,651,995
R6 (ANTXR1)	4,963 bp	TCTGTGAAATGGCGGTAACA	chr2:69,150,002	ATCAAGCCATCTTGCATTCC	chr2:69,154,964

**BAC probes**

		Start position hg18	End position hg18
MYCN	RP11-463P22	chr2:16,001,629	chr2:16,171,403
ALK	RP11-328L16	chr2:29,261,112	chr2:29,453,760
ALK (region A1)	RP11-1116M6	chr2:29,203,101	chr2:29,351,163
ALK (region A3)	RP11-155K8	chr2:29,513,137	chr2:29,673,338
ALK (region A4)	RP11-453M4	chr2:29,745,130	chr2:29,949,346
Amplicon 9M	RP11-47L12	chr2:9,269,658	chr2:9,447,678
Amplicon 14M	RP11-34B17	chr2:14,364,642	chr2:14,517,726
Amplicon 20M	RP11-310O5	chr2:20,733,077	chr2:20,908,695

## Article III

### Knock-in mice with activated Alk display prolonged neurogenesis as a predisposition step to neuroblastoma

Des mutations ponctuelles touchant principalement le domaine tyrosine kinase du récepteur ALK ont été identifiées chez des patients atteints de NB. Deux résidus sont fréquemment mutés : le F1174 et le R1275. La mutation F1174L est observée uniquement dans les formes sporadiques de NB tandis que la mutation R1275Q est présente dans les formes sporadiques et familiales de NB. Afin d'évaluer le rôle développemental et tumorigène de ces mutations *in vivo*, un modèle de souris KI pour chacune des deux mutations a été développé. Les résidus chez la souris correspondants à ces mutations humaines sont les suivants : F1178 et R1279.

L'analyse de ces animaux a permis de mettre en évidence un rôle majeur du gène *Alk* dans le développement du système nerveux sympathique périphérique. En effet, les souris KI *Alk* présentent une hyperplasie des ganglions du SNS, observée des stades embryonnaires jusque chez l'adulte. Cette hyperplasie est associée à une surprolifération neuroblastique à la naissance, caractérisée au niveau histologique et transcriptionnel.

Les souris KI ne génèrent pas de NB spontanément ce qui indique qu'un évènement génétique supplémentaire est nécessaire au développement tumoral. Dans les tumeurs humaines, la mutation ALK<sup>F1174L</sup> est associée à l'amplification du gène *MYCN* (De Brouwer et al., 2010). Afin de déterminer si ces deux évènements coopèrent, les souris KI *Alk* ont été croisées avec des souris transgéniques surexprimant le gène *MYCN* (TH-*MYCN*). Les animaux doubles positifs MYCN/*Alk*<sup>F1178L</sup> et MYCN/*Alk*<sup>R1279Q</sup> génèrent des NB avec une pénétrance plus forte et une latence plus faible que les souris TH-*MYCN*. Ces résultats démontrent qu'il existe une coopération oncogénique *in vivo* entre la surexpression de *MYCN* et les deux mutations du gène *Alk*. Les propriétés tumorigènes de la mutation F1178L sont supérieures à celles de la mutation R1279Q, ce qui est en accord avec les données *in vitro* de la littérature. A la différence des tumeurs générées chez les souris TH-*MYCN*, les tumeurs des animaux MYCN/*Alk* présentent des signes de différenciation et expriment des marqueurs cholinergiques. Ces caractéristiques spécifiques indiquent que les mutations du gène *Alk* affectent les propriétés des NB chez la souris. De plus, l'analyse du profil d'expression des tumeurs combinée à des expériences d'inhibition de ALK dans des lignées cellulaires de NB humains ont permis d'identifier RET, VIP et VGF comme étant des cibles des récepteurs ALK

mutés. Enfin, les animaux KI ont été soumis à des traitements d'inhibiteurs moléculaires du récepteur ALK. Nous avons ainsi pu montrer que le crizotinib induit une réduction de la taille des tumeurs chez les KI  $Alk^{R1275Q}$ . Les NB générés sont donc dépendants de l'expression du gène *Alk* muté.

Ce travail a mis en évidence pour la première fois un rôle développemental du gène *ALK* chez le mammifère. L'hyperplasie du tissu sympathique peut expliquer la prédisposition au NB chez les personnes présentant des mutations germinales du gène *ALK*. La caractérisation des tumeurs obtenues chez ces souris apporte de nouvelles informations sur les propriétés tumorales induites par les mutations ainsi que sur les cibles des récepteurs ALK activés. Enfin, les résultats des traitements que nous avons réalisés indiquent que ces souris constituent de bons modèles d'étude pré-clinique des NB exprimant des mutations du gène *ALK*.

# **Knock-in mice with activated *Alk* display prolonged neurogenesis as a predisposition step to neuroblastoma**

Alex Cazes<sup>1,2</sup>, Lucille Lopez-Delisle<sup>1,2</sup>, Konstantina Tsarovina<sup>3</sup>, Cécile Pierre-Eugène<sup>1,2</sup>,  
Katleen De Preter<sup>4</sup>, Michel Peuchmaur<sup>5,6</sup>, André Nicolas<sup>7</sup>, Claire Provost<sup>8</sup>, Caroline Louis-  
Brennetot<sup>1,2</sup>, Romain Daveau<sup>1,2</sup>, Candy Kumps<sup>4</sup>, Gudrun Schleiermacher<sup>1,2,9</sup>, Aurélie  
Prignon<sup>8</sup>, Frank Speleman<sup>4</sup>, Hermann Rohrer<sup>3</sup>, Olivier Delattre<sup>1,2</sup> and Isabelle Janoueix-  
Lerosey<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Inserm U830, 26 rue d'Ulm, 75005 Paris, France; <sup>2</sup>Institut Curie, Centre de Recherche, 26  
rue d'Ulm, 75005 Paris, France; <sup>3</sup>Research Group Developmental Neurobiology, Max Planck  
Institute for Brain Research, Max-von-Laue-Str. 4, 60438 Frankfurt/M, Germany; <sup>4</sup>Center for  
Medical Genetics, Ghent University Hospital, De Pintelaan 185, B-9000 Ghent, Belgium;  
<sup>5</sup>Département of Pathology, AP-HP, Hôpital Universitaire Robert Debré, 48 boulevard Sérurier,  
75019 Paris, France; <sup>6</sup>Université Diderot Paris 7, Paris Sorbonne Cité, Paris, France; <sup>7</sup>Platform  
of Experimental Pathology, Institut Curie, 26 rue d'Ulm, 75005 Paris, France; <sup>8</sup>LIMP  
(Laboratoire d'Imagerie Moléculaire Positronique), Hôpital Tenon, 4 rue de la Chine, 75020  
Paris, France; <sup>9</sup>Institut Curie, Département de Pédiatrie, 26 rue d'Ulm, 75005 Paris, France.

\*Corresponding author: Isabelle Janoueix-Lerosey. Unité Inserm U830, Institut Curie  
26, rue d'Ulm, 75248 Paris Cedex 05. Phone: 33 1 56 24 66 84. E-mail: janoueix@curie.fr.

Short title: Anomalies of KI mice with *Alk* mutations

## Abstract

Neuroblastoma, an embryonal neoplasm of the sympathetic nervous system (SNS), is one of the most frequent and aggressive pediatric cancer. Activating mutations of the *ALK* (Anaplastic Lymphoma Kinase) gene, encoding a tyrosine kinase receptor that belongs to the insulin-receptor superfamily, have been identified in both sporadic and familial cases. To decipher *ALK* function in neuroblastoma predisposition and oncogenesis, we have characterized knock-in (KI) mice bearing the two most frequent mutations observed in neuroblastoma patients. A significant enlargement of sympathetic ganglia is observed in *Alk*<sup>F1178L</sup> mice from embryonic to adult stages and is associated with an increased proliferation of sympathetic neuroblasts at birth. Whereas neither *Alk*<sup>R1279Q</sup> nor *Alk*<sup>F1178L</sup> mice spontaneously develop tumors, *TH-MYCN/KI Alk* mice present neuroblastomas with much higher penetrance and shorter latency than *TH-MYCN* mice. Our data demonstrate that the oncogenic potential of the F1178L mutation is higher than the one of the R1279Q mutation *in vivo*. Furthermore, we show that tumors expressing the R1279Q mutation are sensitive to *ALK* inhibition upon crizotinib treatment. Most *MYCN/Alk* tumors exhibit signs of neuronal differentiation and a dual expression of adrenergic and cholinergic markers as previously observed in human differentiating tumors. Moreover, we identify *Ret* and *Vip* as targets of activated *Alk* in murine *MYCN/Alk* tumors and human neuroblastoma cell lines. These findings provide new insights into the role of the *ALK* gene in development and pathogenesis of the SNS and indicate that these mice represent relevant *Alk*-dependent neuroblastoma models.

**Keywords:** Tyrosine kinase, Cancer predisposition, Differentiation, Neurogenesis, Neuroblastoma

## Significance statement

Activating mutations of the *ALK* tyrosine kinase receptor have been identified in sporadic and familial cases of neuroblastoma, an embryonal neoplasm of the sympathetic nervous system. Using knock-in mice carrying the two most frequent *Alk* mutations observed in neuroblastoma patients, we demonstrate that both mutations affect neurogenesis in sympathetic ganglia. We show that *Alk* activation favors *MYCN*-driven neuroblastoma oncogenesis and that most *MYCN/Alk* tumors exhibit signs of neuronal differentiation. Moreover, our data uncover specific targets of activated *ALK*. These findings provide new insights into the role of the full length *ALK* receptor in neuroblastoma predisposition and tumor development.

## Introduction

Neuroblastoma (NB) is an embryonal cancer of the peripheral sympathetic nervous system (SNS) observed in early childhood. It is characterized by a broad spectrum of clinical behaviors (1–3) and is classified into localized or metastatic disease (4, 5). The International Pathology Classification System (INPC) distinguishes stroma rich or stroma poor, and undifferentiated, poorly differentiated or differentiating tumors (6). Two main *bona fide* cancer genes, *MYCN* and *ALK*, have been identified as major actors of NB pathogenesis. Amplification of the *MYCN* oncogene is observed in 25% of NB cases and is associated with a poor prognosis (1, 7). The *MYCN* protein belongs to the family of MYC oncoproteins, the overexpression of which plays a major role in oncogenesis through deregulation of growth and proliferation. Overexpression of *MYCN* in neuroectodermal cells under the tyrosine hydroxylase (TH) promoter leads to NB in mice, demonstrating that *MYCN* can contribute to neuroblast transformation *in vivo* (8, 9). Whereas the *MYCN* oncogene is involved in NB oncogenesis only at the somatic level, both somatic and germline activating mutations of the *ALK* gene have been identified in sporadic and familial cases of NB, respectively (10–13). The *ALK* gene encodes a receptor tyrosine kinase preferentially expressed in the developing peripheral and central nervous systems (14–18). In sporadic cases, activation of the ALK receptor is achieved either through genomic amplification (2), deletions within the extracellular domain (19, 20) or somatic point mutations, mainly affecting residues located within the kinase domain. The occurrence of *ALK* mutations in sporadic cases is around 7% with two hotspots at positions R1275 and F1174. A preferential association of F1174L mutants with *MYCN* amplification has been reported in 2010 (21) but not observed in a recent report (22). Analysis of NB families revealed that the R1275Q was the most frequent germline mutation. No germline mutation affecting the F1174 residue has been reported in such families, possibly related to an embryonal lethality (12, 13, 23). However, a syndromic presentation associating congenital NB with severe encephalopathy has now been described in two sporadic cases harbouring *de novo* germline F1174V and F1245V *ALK* mutations (24).

*In vitro*, sympathetic neuroblast proliferation has been shown to be increased upon overexpression of wild-type (Wt) ALK as well as R1275Q and F1174L mutant forms in a culture model of chick embryonic neuroblasts (25). Moreover, it has been recently reported that F1174L ALK may transform murine neural crest progenitor cells (26). *In vivo*, oncogenic cooperation between *MYCN* and *ALK*<sup>F1174L</sup> has been documented in a zebrafish model (27) and in transgenic mice (28, 29). In these models, *ALK*<sup>F1174L</sup> overexpression in cells derived from the neural crest was controlled by a Dopamine- $\beta$ -Hydroxylase and TH promoter, respectively.

Here we have developed two lines of knock-in (KI) mice carrying activating mutations of the *Alk* gene expressed under the control of its own promoter. We therefore investigated the role of *Alk* mutations in a physiological context, in both development and oncogenesis.

## Results

### Generation of *Alk*<sup>R1279Q</sup> and *Alk*<sup>F1178L</sup> KI mouse lines

In order to get insights into the role of the ALK R1275Q and F1174L mutations observed in NB patients, we developed KI mice targeting the corresponding residues in the mouse *Alk* receptor, *i.e.* R1279Q and F1178L, respectively (Fig. 1A,D). For the R1279Q mutation, a targeting vector was constructed as shown in Fig. 1B. Homologously recombined ES129 clones were selected and injected into blastocysts. Resulting chimeric mice were crossed with transgenic Cre mice in order to remove the Neo cassette. The Cre transgene was then further segregated yielding one *Alk*<sup>R1279Q</sup> KI mice line. The presence of the mutation was confirmed by direct Sanger sequencing on the mice used to expand the line; then, the status of all KI mice was determined by tail DNA PCR genotyping (Fig. 1C). Sanger sequencing of SNS ganglia cDNA showed that heterozygosity resulted in balanced amounts of Wt and mutated mRNAs (Fig. 1C).

For the F1178L mutation (Fig. 1D), we used a different approach (see Materials and Methods) that led to a KI allele (L-) bearing the mutated exon 23 flanked by one LoxP and one Lox511 sites (Fig. 1E). We confirmed that both the Wt and mutated mRNAs were expressed in *Alk*<sup>F1178L</sup> heterozygous mice (Fig. 1F).

For both mutations, heterozygous mice had a normal appearance and were fertile. Matings of C57Bl/6 heterozygotes yielded the expected proportions of Wt, heterozygous and homozygous animals at birth. However, a high post-natal lethality was noticed for the *Alk*<sup>F1178L</sup> homozygotes.

### Size and proliferation abnormalities of sympathetic ganglia in KI *Alk* mice

We first refined *Alk* expression in the SNS by RT-qPCR on mRNAs extracted from superior cervical ganglia (SCG) and stellate ganglia. As shown in Fig. 2A, *Alk* expression was highest at E16, and then decreased but remained expressed at adult stages. We then sought to determine whether KI *Alk* mice presented with abnormalities of the sympathetic ganglia. At dissection, an enlargement of the SCG and stellate ganglia was apparent in both *Alk*<sup>R1279Q</sup> and *Alk*<sup>F1178L</sup> mutants. Since this difference was more pronounced in KI *Alk*<sup>F1178L</sup> animals, we subsequently focused on this mutation. We recorded an increased size of the SCG and stellate ganglia in both heterozygotes and homozygotes at the adult stage (Fig. 2B) and at birth (Fig. 2C,D) with a stronger phenotype in homozygotes suggesting a gene dosage effect. At E12.5, we documented a significant increase in the number of neuroblasts (islet1-positive cells) in the SCG of homozygous mice compared to Wt (Fig. 2E,F). An increase was also observed for heterozygous mice but it did not reach significance. Similar data were obtained for the stellate ganglia (Fig. 2F). Since at that stage the vast majority of neuroblasts is proliferating in Wt, an effect of mutated *Alk* on proliferation may hardly be detected (Fig. 2F). Further in development, *i.e.* at E14.5, SCG and stellate ganglia of mutant mice also presented with a higher number of proliferating neuroblasts per ganglion than Wt littermate controls.

To get further insights into the mechanism leading to such abnormalities, we performed a transcriptomic profiling of sympathetic ganglia from Wt and KI *Alk*<sup>F1178L</sup> mice, at P0, P18 and adult stages. At P0, GSEA analysis of Wt versus mutant ganglia revealed a strong signature for cell cycle, S-phase and G1/S transition genes (Fig. 3A). Accordingly, ki67 staining showed an excess of proliferation in sympathetic ganglia of KI *Alk*<sup>F1178L</sup> mice (Fig. 3B,C). In addition, we observed an increased expression of the anti-apoptotic gene *Birc5* in ganglia of mutated animals compared to Wt (Fig. 3D and Supplemental Fig. 1). The analysis of a subset of cell cycle genes at P18 indicated that this signature was no more present (Fig. 3D) and the same observation was true at adult stages. An enrichment of cell cycle genes was also



observed at P0 in sympathetic ganglia of KI *Alk*<sup>R1279Q</sup> mice (Supplemental Fig. 1). These results therefore demonstrate that expression of *Alk* mutants under the control of the *Alk* endogenous promoter affects neurogenesis in sympathetic ganglia. However, we did not observe any tumor in these KI mice, indicating that activated *Alk* is not sufficient to induce neuroblastic tumors.

### **Both *Alk* R1279Q and F1178L mutations cooperate with *MYCN* to favor NB *in vivo***

We then explored the oncogenic potential of both mutations in cooperation with the *MYCN* gene by crossing *Alk*<sup>R1279Q</sup> and *Alk*<sup>F1178L</sup> KI mice with *TH-MYCN* mice. Two sets of breedings were analyzed, the first one on a mixed background (F1 between 129x1/SvJ *TH-MYCN* and C57Bl/6 KI *Alk*<sup>R1279Q</sup> or *Alk*<sup>F1178L</sup>) and the second one on a genetic background >93.5 % 129S2. On both backgrounds *Alk*<sup>R1279Q</sup> and *Alk*<sup>F1178L</sup> strongly synergized with *MYCN* overexpression to induce tumors (Fig. 4A,B). Full penetrance and shorter latency were observed in the 129S2 background. Interestingly, tumor onset was even earlier in the case of the F1178L mutation compared with the R1279Q mutation, demonstrating that the oncogenic potential of the F1178L mutation is higher than that of the R1279Q mutation.

In most cases, tumors were detectable through abdominal palpation of tough masses (Fig. 4C). A minor subset of animals presented with paralysis of the lower extremities. Autopsy revealed that abdominal tumors were median, perivascular and locally invasive without evidence of macroscopic tumor spread to other distant organs. FACS analysis of bone marrow samples of *TH-MYCN* and double *TH-MYCN/KI Alk* mice with an anti-GD2 antibody did not reveal tumor cells at this site. No tumor was observed developing from the adrenal glands. Whereas multiple primary tumors were rarely observed in *TH-MYCN* mice, tumors at two or three locations (abdominal/thoracic/cervical) were detected in 70% and 100% of *TH-MYCN/KI Alk*<sup>R1279Q</sup> and *TH-MYCN/KI Alk*<sup>F1178L</sup> mice, respectively (Fig. 4C,D). Such multifocal tumors could be detected by micro-PET analysis (Fig. 4E).

The ALK F1174L mutation has been shown to be resistant to the ALK inhibitor crizotinib, both *in vitro* and *in vivo* (28, 30). We therefore treated *MYCN/KI Alk*<sup>R1279Q</sup> mice with palpable abdominal tumors with 100 mg/kg/day crizotinib by oral gavage. After 7 to 10 days of treatment, autopsy was performed to determine treatment efficiency. Whereas 6 out of 6 mice that received DMSO presented with multifocal tumors at the end of the treatment, 5 out of 7 mice treated with crizotinib exhibited only single abdominal tumors. In addition, we observed a significant reduction in abdominal tumor weight in treated mice compared with controls (mean: 1.10±0.57 g *versus* 3.18±1.08 g, p<0.01). These results provide evidence that tumors expressing the *Alk* R1279Q mutation are sensitive to crizotinib inhibition.

In patients, three types of NB are distinguished according to the morphology of neuroblastic cells (6). We sought to apply the criteria used to classify human NB to describe mouse tumors. *MYCN* tumors could be classified in most cases as NB, stroma-poor, undifferentiated (Fig. 5A) whereas *MYCN/Alk* tumors mostly corresponded to NB, stroma-poor, poorly differentiated or differentiating (Fig. 5B-D). Indeed, fibrillary neuropil was rarely present in *MYCN* tumors but observed in most *MYCN/Alk* tumors. Moreover, Schwann cells and differentiating cells were present in a subset of *MYCN/Alk* tumors but never in *MYCN* tumors. Immunohistochemistry confirmed that all tumors expressed the adrenergic marker TH (Supplemental Fig. 2). Prominent nucleoli and/or hyperchromatic nuclei were visible in all cases. The vast majority of both types of tumors presented with a high mitosis-karyorrhexis index. Consistently, ki67 staining revealed a high proportion of proliferating cells both in *MYCN* and *MYCN/Alk* tumors (Supplemental Fig. 2). Interestingly, we obtained evidence indicating that cervical and thoracic tumors derive from the SCG and stellate ganglia, respectively. Indeed, as shown in Fig. 5E and 5F, histological analysis of cervical and thoracic tumors collected from *TH-MYCN/KI Alk* mice revealed the presence of two juxtaposed areas:

one corresponding to a normal sympathetic ganglion containing mainly mature ganglionic cells and Schwann cells, and the other presenting with the aspect of a NB, stroma-poor, poorly differentiated, infiltrating adipocytes or muscle cells. Overall, these data demonstrate that *Alk* activation not only favors *MYCN*-driven oncogenesis but also impacts on tumor properties.

### ***MYCN/Alk* mouse NB are characterized by dual expression of adrenergic and cholinergic markers**

With the aim to better characterize the impact of *Alk* activation on tumorigenesis, we generated expression profiles of *MYCN* and *MYCN/Alk* tumors. In agreement with the differences observed through histological analysis, unsupervised hierarchical clustering clearly separated both types of tumors (Fig. 6A), with the exception of one *MYCN* tumor. Differential analysis of these two categories highlighted an increased expression of the proto-oncogene *Ret* as well as the *Vgf* (non-acronymic, nerve growth factor inducible gene) and *Vip* (Vasoactive intestinal peptide) genes in *MYCN/Alk* tumors (Fig. 6B). *Ret* signaling has been shown to control cholinergic properties in immature sympathetic neurons and *Vip* is co-expressed in these cells (31). Moreover, *Vgf* expression is a hallmark of *Ret*-signaling hyperactivity (32, 33). Further Gene Ontology analysis documented an enrichment of several categories related to neuronal functions, such as neuronal cell body, axon and synapse in *MYCN/Alk* tumors (Fig. 6C). Both *MYCN/Alk* and *MYCN* tumors presented with a high expression of the adrenergic markers *Th*, *Dbh* and *Vmat2* (Supplemental Fig. 3). We could not detect expression of the cholinergic markers *Vacht* and *Cht1* in transcriptomic data of the analyzed tumors. This was likely due to a technical issue with the corresponding probes. Indeed, *Vacht* (*Slc18a3*) and *Cht1* (*Slc5a7*) expression could be detected by immunohistochemistry and RT-q-PCR, respectively, in most *MYCN/Alk* tumors but not in *MYCN* tumors. These data therefore indicate that, unlike *MYCN* tumors which are fully adrenergic, *MYCN/Alk* tumors express both adrenergic and cholinergic markers. Furthermore, we observed a strong induction of the murine *Mycn* gene expression in *MYCN/Alk* tumors compared with *MYCN* tumors (Supplemental Fig. 3) as previously described in transgenic *ALK<sup>F1174L</sup>* mice (28). In addition, this upregulation of the *Mycn* gene was higher for the F1178L mutation than for the *Alk* R1279Q mutation. We also documented an increased expression of the *Alk* gene itself in *MYCN/Alk* tumors versus *MYCN* tumors (Supplemental Fig. 3).

### ***Ret*, *Vgf* and *Vip* are target genes of activated *Alk***

To further document the link between *Alk* activation and expression of neuronal and cholinergic genes, *ALK* abrogation was first achieved in the *ALK* mutated CLB-Ga human NB cell line using the *ALK* small-molecule inhibitor TAE-684 (34). Fig. 6D shows that *RET* was strongly down-regulated upon *ALK* inhibition. Then, a panel of 10 human NB cell lines was treated for 6 hours with TAE-684. Strikingly, we observed a strong down-regulation of *RET* and *VGF* upon TAE-684 treatment in cell lines presenting with activated *ALK* (by mutation or amplification) but not in cell lines with *Wt* *ALK* (Fig. 6E and Supplemental Fig. 4). For *VIP*, a decreased expression was observed in 3 out of 7 cell lines with activated *ALK* after TAE-684 treatment (Fig. 6E). By contrast, the expression level of the adrenergic marker *DBH* was not altered by *ALK* abrogation (Supplemental Fig. 4). These data, combined with the observation of an increased expression of these genes in *MYCN/Alk* mice tumors therefore uncover *Ret*, *Vgf* and *Vip* as target genes of activated *Alk*.

### **Activated *Alk* combined with *MYCN* overexpression drives NB tumorigenesis in the absence of other genomic aberrations in the 129S2 background**

We finally explored genomic aberrations in a subset of mice tumors by array-CGH. We observed genomic alterations, occurring as whole or partial chromosome gains and losses in 7 out of 9 tumors obtained in *TH-MYCN/KI Alk* mice in the mixed background (129x1/SvJ x C57Bl/6) (Supplementary Table 1). Latency was above 90 days in 8 out of these 9 cases. In contrast, no alteration was detected in 9 tumors observed in double *TH-MYCN/KI Alk* mice in the 129S2 background in a time frame of 36-75 days. In the same background, we detected whole chromosome 3 gain in 3 out of 7 tumors from *TH-MYCN* mice (Supplementary Table 1). These observations therefore indicate that the endogenous expression of activated Alk combined with *MYCN* overexpression is sufficient to drive NB tumorigenesis in a genetic background allowing development of neuroblastic tumors.

## Discussion

In this study, we investigated in mouse models the role of activated *Alk* expressed at a physiological level in SNS development and oncogenesis. In KI *Alk*<sup>F1178L</sup> mice, we characterized an enlargement of the SCG and stellate ganglia from embryonic to adult stages. Further analysis of E12.5 and P0 stages indicated that activated *Alk* affects neurogenesis in sympathetic ganglia in two ways. First, the observation of an increased number of sympathetic neuroblasts in mutant mice at E12.5 suggests that mutated *Alk* acts at an earlier stage to elicit either the generation of more neuroblasts from progenitors or to increase the proliferation of neuroblasts. Second, our data provide evidence that *Alk* activation induces a prolonged proliferation of sympathetic neurons, revealed at P0 by transcriptomic analysis and ki67 staining. This abnormal proliferation was no more detectable at P18 or adult stages and KI mice did not develop NB. This strongly suggests that a second and cooperative genetic event (e.g. *MYCN* amplification) is required to achieve NB tumorigenesis, which is in agreement with the incomplete penetrance of *ALK* mutations in familial cases. Nevertheless, the abnormalities of the sympathetic ganglia of KI *Alk* mice described here may provide an explanation for NB predisposition in patients with germline *ALK* mutations.

Recently, an oncogenic cooperation between the *ALK*<sup>F1174L</sup> mutation and *MYCN* overexpression has been reported in zebrafish and mouse transgenic models (27–29). Furthermore, *in vitro* studies indicated a higher transforming capacity of *ALK* F1174L compared with *ALK* R1275Q (21). Using breeding with *TH-MYCN* mice, we now show that both F1178L and R1279Q KI *Alk* mutations accelerate tumor onset and increase tumor penetrance in a *MYCN* context. This is the first demonstration *in vivo* that the R1279Q mutation is able to cooperate with *MYCN* and that the oncogenic potential of the F1178L mutation is higher than that of the R1279Q mutation. In the 129S2 background, the early onset and complete penetrance of NB in *TH-MYCN/Alk* mice indicate that *MYCN* overexpression and *Alk* mutations are sufficient to promote NB formation. Consistently, we did not detect other genomic aberrations in these tumors by array-CGH. Interestingly, we show for the first time that tumors expressing the *Alk* R1279Q mutation are sensitive to crizotinib inhibition, indicating that *Alk* activation is required for tumor growth. Thus these mice represent a relevant pre-clinical model of NB mainly observed in very young children.

The higher oncogenic potential of the F1178L mutation may be related to the stronger upregulation of murine *Mycn* in *MYCN/Alk* tumors bearing the F1178L mutation compared with the R1279Q one. This is indeed consistent with the gene dosage effect of *MYCN* in transgenic mice as homozygotes develop NB tumors with a shorter latency and higher penetrance compared to heterozygotes (9). However, *Mycn* is not upregulated in sympathetic ganglia from KI *Alk* mice whatever the stage of development (Supplemental Fig. 1). Thus the induction of *Mycn* expression by mutated *Alk* is only observed in a tumor context but not in a physiological context.

Histological analysis revealed frequent signs of differentiation in *MYCN/Alk* tumors, pointing to a role of *Alk* in the differentiation of sympathetic neurons. Furthermore, transcriptomic analysis showed an upregulation of the genes associated with developing cholinergic sympathetic neurons, i.e *Vip*, *Ret* and *Vgf* in *MYCN/Alk* tumors. These observations are reminiscent of the human situation for which it has been shown that expression of cholinergic markers is associated with morphological differentiation in sporadic NB (35).

Strikingly, we obtained evidence showing that *Ret*, *Vgf* and *Vip* are targets of activated *Alk* not only in *MYCN/Alk* mice tumors but also in human NB cell lines presenting with mutation or amplification of the *ALK* gene. Since *Ret* can induce *Vgf* promoter activity (32, 33), induction of *Vgf* is likely a secondary effect of *Ret* upregulation. Importantly, *Ret* is also known to regulate neuronal migration, axonal growth and synapse formation through the entire SNS (36). Our observations of an increased *Ret* expression in *MYCN/Alk* mice tumors

together with an enrichment of genes related to neuronal cell body, axon and synapse categories are therefore in line with the aforementioned roles of Ret in the sympathetic ganglia. In addition, it has been shown that *Ret* and *Vip* expression normally becomes restricted to a small subpopulation of sympathetic neuroblasts between E12.5 and E15.5 (36, 37). We may hypothesize that expression of these genes would be maintained by activated Alk signaling in a majority of neuroblasts consequently leading to an increased expression in *MYCN/Alk* tumors. Interestingly, abnormalities of the SNS have been reported in mice bearing *Ret* alterations. *Ret*<sup>-/-</sup> mice displayed reduction in the size of the sympathetic ganglia associated with an increased cell death at birth (36) and a decreased number of neuroblasts at E18.5 (38). Conversely in KI *Alk*<sup>F1178L</sup> mice we documented an excess of proliferation in sympathetic ganglia at birth as well as an enlargement of this tissue. It is also worth mentioning that NB has been reported in a transgenic line carrying the Ret oncogene driven by a mouse metallothionein regulatory element (39). Moreover, patients affected by multiple endocrine neoplasia type 2B (MEN2B), characterized by medullary thyroid carcinoma and ganglioneuromas of the gastrointestinal tract most often bear a M918T mutation of the *RET* oncogene (40). Interestingly, ganglioneuroma of the adrenal medulla and enlargement of the associated sympathetic ganglia have been observed in a KI *Ret* M919T mouse line (41). Altogether, these data suggest that activated Alk may exert at least part of its effects on the sympathetic ganglia via Ret signaling.

Overall, this report clearly establishes the link between the developmental and oncogenic function of the ALK receptor in the sympathetic nervous system providing clues to the role of *ALK* mutations in NB predisposition and identifies key targets of activated ALK.

## Materials and Methods

### Establishment of the *Alk*<sup>R1279Q</sup> and *Alk*<sup>F1178L</sup> KI mouse lines

*Alk*<sup>R1279Q</sup> and *Alk*<sup>F1178L</sup> KI animals were generated at the Mouse Clinical Institute, Illkirch, France. The R1279 and F1178 positions in the murine *Alk* receptor correspond to R1275 and F1174 positions in the human ALK receptor, respectively. The targeting vector for *Alk*<sup>R1279Q</sup> (Fig. 1A) was constructed as follows. A fragment encompassing *Alk* exon 25 was amplified by polymerase chain reaction (PCR) to introduce the CGA > CAA point mutation (1275R > Q in human). As well, 5' and 3' homology arms were amplified by PCR. These fragments were cloned into a vector containing a neomycin resistance (Neo) cassette located between two LoxP sites. Targeted 129Sv/Pas Embryonic Stem (ES) clones were confirmed by PCR and Southern blot and injected into C57BL/6J blastocysts to generate chimeric mice. Chimeras (L2) were crossed with transgenic Cre mice (C57BL/6) to check transmission of the targeted allele in the germline and excise the Neo cassette on F1 progenies (L-). A further cross was performed to segregate the Cre transgene. PCR analysis of genomic tail biopsy DNA using primers Ef4639 (5' TAGATGCCTGGGCTGGCTTATATCTAA 3') and Er4640 (5' GAACTCGATTTCTGTGCCTCTGGG 3') was performed to discriminate Wt (357 bp) and KI (L-, 443 bp) alleles. The point mutation was confirmed by PCR using primers exon25-F (5' AACTGTTTGGACTTCACAGAAGG 3') and exon 25-R (5' TTGAGGAGACTGGCTGGTG 3') followed by Sanger sequencing.

For the *Alk*<sup>F1178L</sup> mutation, since a potential embryonal lethality was suspected, we initially planned to use a FLEx strategy to generate animals with a conditional expression of the mutated allele after Cre recombination (42). The FLEx system was expected to drive the expression of a mutated allele instead of the Wt allele after recombination of specific Lox sites flanking a mutated and inverted exon 23 placed in the intron following the normal exon 23. The targeting vector for *Alk*<sup>F1178L</sup> was constructed as shown in Supplemental Fig. 5 and contains the following parts: a 5' homology arm, the floxed arm (corresponding to exon 23 flanked by LoxP and Lox511 sites), the Flex arm (containing an inverted exon 23 exhibiting the TTC > CTC point mutation (1174F > L in human) followed by a LoxP site), the FRT-Neo region (including the Neo cassette between two FRT sites and followed by a Lox511 site) and a 3' homology arm. Targeted 129Sv/Pas ES clones were confirmed by PCR and Southern blot and injected into C57BL/6J blastocysts to generate chimeric mice. Chimeras (L3) were crossed with transgenic flippase mice (C57BL/6) to check transmission of the targeted allele in the germline and excise the FRT site-flanked NeoR cassette on F1 progenies (L2). In order to confirm that this L2 allele gives a Wt *Alk* mRNA, we extracted RNA from brain of heterozygous mice and analyzed the transcript. We observed one band at the expected size (362 bp) as well as an additional band at a smaller size (~ 230 bp) (Supplemental Fig. 5). Sanger sequencing of this band revealed that it corresponded to a mRNA in which the exon 23 (130 pb) was skipped. This lead to a frameshift resulting in the expression of a protein containing the amino acids 1 to 1175 of the mouse *Alk* receptor, followed by 25 additional amino acids before a STOP codon (Supplemental Fig. 5). The L2 allele therefore drives the expression of a truncated *Alk* and not that of a Wt mRNA as expected. Consequently, we bred mice bearing the L2 allele with a transgenic CMV-Cre deleter line and obtained two males bearing the KI allele (L-). After segregation of the Cre transgene, we obtained one *Alk*<sup>F1178L</sup> KI mice line.

PCR analysis of genomic tail biopsy DNA using primers Lf4735 (5' GTCGGCAGGAGATTCAGAGACCA 3') and Mr4736 (5' GCAGGAGTTGAATTAGCGGGAAAAG 3') was performed to discriminate Wt (374 bp) and KI (L-, 449 bp) alleles. The point mutation was confirmed by PCR using primers exon23-

F (5' CTTACAGCGTGATTGCTGA 3') and exon 23-R (5' CAGTTACCTCCCTTGCAACC 3') followed by Sanger sequencing.

The care and use of animals used in this study were strictly applying European and National Regulation in force for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (Directive 86/609). The protocol complies with internationally established 3R principles, more precisely in accordance with 'Guidelines for the generation, breeding, care and use of genetically modified and cloned animals for scientific purposes' (National Health and Medical Research Council NHMRC, Australia, 2007) and the UKCCCR guidelines (Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research) (43).

### **RT-qPCR**

First strand cDNA synthesis was performed on 1 µg of total RNA by use of High capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems). ALK and actin mouse cDNA expression were determined using TaqMan® Universal Master Mix and the TaqMan® gene expression assays Mm01226182-m1 and 4352341E (Applied Biosystems), respectively.

### **TH-MYCN mice**

TH-MYCN mice used in this study have been previously described (9). Mice on a 129x1/SvJ background were obtained from the NCI mouse repository (<http://mouse.ncifcrf.gov/>) and further backcrossed on 129S2/SvPasCrl background (abbreviated 129S2, Charles River). Genotyping was performed as previously described (44).

### **Tumor histology and immunohistochemistry**

Mice tumors were dissected at sacrifice, fixed in a mix of ethanol-acetic acid-formol and paraffin-embedded. Tissue sections were stained with hematoxylin, eosin and safran (HES) and evaluated by a pediatric pathologist. Histochemical analysis was performed with ki67 (SC, #7846; dilution 1/300) and TH (Aves, #TYH; dilution 1/100) antibodies.

### **Analysis of sympathetic ganglia**

Animals were killed and immediately dissected to collect SCG and stellate ganglia. Ganglia were fixed and surface was evaluated (x2.5, Leica DMR, Vega v2.1 ClaraVision software). Ganglia were then included in agarose and paraffin-embedded. Alternatively, they were fixed for immunostaining or immediately frozen in liquid nitrogen for RNA extraction.

### **Immunostaining and quantification of islet1- and ki67-positive cells**

E12.5 and E14.5 mouse embryos were fixed in 4% paraformaldehyde overnight, washed with PBS and immersed in 30% sucrose for 24 h. After embedding in Tissue Tek 12 µm cryosections were collected. After antigen retrieval in 10 mM sodium citrate buffer pH 6.0 at 95°C for 20 min sections were incubated overnight at 4°C in PBS/10% FCS/1% BSA with anti-mouse ki67 (BioLegend) and mouse anti-islet1 (Developmental Studies Hybridoma Bank) diluted 1:200 and 1:40, respectively. Alexa 594 anti-rat and Alexa 488 anti-mouse were used as secondary antibodies. To estimate the number of islet1-positive cells, the number of islet1-positive cells in the ganglion area were counted from every sixth section. The density of islet1-positive cells was determined from counts of positive cells. To derive the number of islet1-positive cells /ganglion, counted cells are transformed to counts per volume and corrected according to the Linderstrom-Lang/Abercrombie equation (45).

### **<sup>18</sup>F[FDG] PET Imaging**

PET acquisitions were performed with the Mosaic animal PET (Philips Medical systems, Cleveland, OH, USA). Mice were fasted for 12 h before <sup>18</sup>F[FDG] PET imaging but allowed

free access to water. 5 MBq of the radiotracer were injected intravenously in the retro-orbital sinus of the animals. Mice were maintained under anesthesia with a mixture of 1.5% isoflurane and oxygen, and a heating lamp was used to keep body temperature during data acquisition. Static acquisitions were performed one hour after injection with an exposure time of 10 minutes. Images were reconstructed in 3-dimensional using PET view software (Philips Medical).

### **Transcriptomic profiling of mice samples**

Transcriptomic profiling of tumors and sympathetic ganglia was performed using Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 arrays according to the manufacturer's instructions. RNA was collected from tumors using the miRNeasy kit (Qiagen) and from ganglia (pooled SCG and stellate ganglia) using Trizol<sup>®</sup> and RNA precipitation. Arrays were normalized by the GCRMA procedure using Brainarray annotations (46).

### **Genomic profiling**

Genomic DNA from mouse tumors was analyzed versus reference normal DNA. The samples were labeled and co-hybridized to the NimbleGen Mouse CGH 3x720K WG-T arrays according to the manufacturer's protocol. Arrays were washed and then scanned on a GenePix 4000B Scanner using GenePix 5.0 software. Raw data were normalized using NimbleScan v2.5 software (Roche NimbleGen). The normalized data were processed using NimbleScan softwares to obtain data with a resolution of around 3.5 kb.

### **Treatment of human NB cell lines with TAE-684 and expression analysis**

Human NB cell lines were grown in RPMI 1640 medium (Invitrogen) supplemented with 10% FCS and antibiotics. They were treated in triplicate with 0.3  $\mu$ M TAE-684 (Novartis) or DMSO (VWR) for 6 hours. Then expression profiling on the Affymetrix HG-U133PLUS2 platform was performed according to the manufacturer's protocol. The CLB-Ga cell line was treated with 0.3 $\mu$ M TAE-684 and harvested in duplicate at 6 different time points (10', 30', 60', 120', 240' and 360') for subsequent expression profiling on a custom Agilent 44k expression array using labeling and hybridization protocols of the manufacturer. Affymetrix array data were normalized using the RMA method, while Agilent expression profiling data were normalized using VSN (variance stabilization and normalization) in R packages affy and limma, respectively.

### **Statistical analysis**

Unless otherwise specified, two-tailed Student's t test was used to assay significance. Single, double and triple asteriks indicate statistically significant differences: \*  $P \leq 0.05$ ; \*\*  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*,  $P \leq 0.001$ . Survival curves were constructed according to the Kaplan-Meier method and compared using the log-rank test.

### **Acknowledgements**

The U830 Inserm laboratory is supported by grants from the Institut National du Cancer, the Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe labellisée), the Association Hubert Gouin, Les Bagouz à Manon, les amis de Claire and Enfance et Santé. A. C. is the recipient of a fellowship of the Fondation ARC pour la recherche sur le cancer. L. L.-D. is the recipient of a fellowship of the Ecole Polytechnique. K. De P. is a post-doctoral researcher with the FWO-Flanders (Fund for Scientific Research – Flanders). G. S. is supported by the Annenberg foundation. The laboratory of H.R. is supported by the Wilhelm-Sander-Stiftung. We thank D. Gentien and C. Hego from the translational department of Institut Curie for Affymetrix profiling experiments and S. Arrufat, D. Lequin and G. Pierron from the Unité de Génétique



Somatique for help in the NimbleGen genomic profiling. We are grateful to the animal facilities team of the Institut Curie and especially to I. Grandjean and C. Jouhanneau. We thank M. Richardson and X. Sastre from the Experimental Pathology Department of Institut Curie for their valuable help and the SIRIC-Curie for help in image analyses. We acknowledge our colleagues F. Tirode, C. Lucchesi and W. Richer for assistance in the analysis of Affymetrix data and D. Surdez and F. Bourdeaut for discussion. We thank S. Sarnacki and S. Irtan from the Necker Hospital for their expertise regarding tumor anatomy.

## References

1. Brodeur GM (2003) Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 3:203–216.
2. Janoueix-Lerosey I, Schleiermacher G, Delattre O (2010) Molecular pathogenesis of peripheral neuroblastic tumors. *Oncogene* 29:1566–1579.
3. Maris JM (2010) Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med* 362:2202–2211.
4. Cohn SL et al. (2009) The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol* 27:289–297.
5. Monclair T et al. (2009) The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol* 27:298–303.
6. Shimada H et al. (1999) The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer* 86:364–372.
7. Seeger RC et al. (1985) Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med* 313:1111–1116.
8. Chesler L et al. (2007) Malignant progression and blockade of angiogenesis in a murine transgenic model of neuroblastoma. *Cancer research* 67:9435–9442.
9. Weiss WA, Aldape K, Mohapatra G, Feuerstein BG, Bishop JM (1997) Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice. *Embo J* 16:2985–2995.
10. Chen Y et al. (2008) Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature* 455:971–974.
11. George RE et al. (2008) Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature* 455:975–978.
12. Janoueix-Lerosey I et al. (2008) Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature* 455:967–970.
13. Mosse YP et al. (2008) Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature* 455:930–935.
14. Chiarle R, Voena C, Ambrogio C, Piva R, Inghirami G (2008) The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nature reviews* 8:11–23.

15. Palmer RH, Vernersson E, Grabbe C, Hallberg B (2009) Anaplastic lymphoma kinase: signalling in development and disease. *The Biochemical journal* 420:345–361.
16. Vernersson E et al. (2006) Characterization of the expression of the ALK receptor tyrosine kinase in mice. *Gene Expr Patterns* 6:448–461.
17. Iwahara T et al. (1997) Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene* 14:439–449.
18. Morris SW et al. (1997) ALK, the chromosome 2 gene locus altered by the t(2;5) in non-Hodgkin's lymphoma, encodes a novel neural receptor tyrosine kinase that is highly related to leukocyte tyrosine kinase (LTK). *Oncogene* 14:2175–88.
19. Cazes A et al. (2013) Characterization of Rearrangements Involving the ALK Gene Reveals a Novel Truncated Form Associated with Tumor Aggressiveness in Neuroblastoma. *Cancer Res* 73:195–204.
20. Okubo J et al. (2012) Aberrant activation of ALK kinase by a novel truncated form ALK protein in neuroblastoma. *Oncogene* 31:4667–4676.
21. De Brouwer S et al. (2010) Meta-analysis of neuroblastomas reveals a skewed ALK mutation spectrum in tumors with MYCN amplification. *Clin Cancer Res* 16:4353–4362.
22. Pugh TJ et al. (2013) The genetic landscape of high-risk neuroblastoma. *Nat Genet* 45:279–284.
23. Bourdeaut F et al. (2012) ALK germline mutations in patients with neuroblastoma: a rare and weakly penetrant syndrome. *Eur J Hum Genet* 20:291–7.
24. De Pontual L et al. (2011) Germline gain-of-function mutations of ALK disrupt central nervous system development. *Hum Mutat* 32:272–6.
25. Reiff T et al. (2011) Midkine and Alk signaling in sympathetic neuron proliferation and neuroblastoma predisposition. *Development* 138:4699–4708.
26. Schulte JH et al. (2013) MYCN and ALKF1174L are sufficient to drive neuroblastoma development from neural crest progenitor cells. *Oncogene* 32:1059–1065.
27. Zhu S et al. (2012) Activated ALK collaborates with MYCN in neuroblastoma pathogenesis. *Cancer Cell* 21:362–373.
28. Berry T et al. (2012) The ALK(F1174L) mutation potentiates the oncogenic activity of MYCN in neuroblastoma. *Cancer Cell* 22:117–130.
29. Heukamp LC et al. (2012) Targeted Expression of Mutated ALK Induces Neuroblastoma in Transgenic Mice. *Sci Transl Med* 4:141ra91.
30. Bresler SC et al. (2011) Differential inhibitor sensitivity of anaplastic lymphoma kinase variants found in neuroblastoma. *Sci Transl Med* 3:108ra114.

31. Burau K et al. (2004) c-ret regulates cholinergic properties in mouse sympathetic neurons: evidence from mutant mice. *Eur J Neurosci* 20:353–362.
32. Califano D et al. (1995) Activated RET/PTC oncogene elicits immediate early and delayed response genes in PC12 cells. *Oncogene* 11:107–112.
33. Xing S, Furminger TL, Tong Q, Jhiang SM (1998) Signal transduction pathways activated by RET oncoproteins in PC12 pheochromocytoma cells. *J Biol Chem* 273:4909–4914.
34. Galkin AV et al. (2007) Identification of NVP-TAE684, a potent, selective, and efficacious inhibitor of NPM-ALK. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:270–5.
35. Bourdeaut F et al. (2009) Cholinergic switch associated with morphological differentiation in neuroblastoma. *The Journal of pathology* 219:463–472.
36. Enomoto H et al. (2001) RET signaling is essential for migration, axonal growth and axon guidance of developing sympathetic neurons. *Development* 128:3963–3974.
37. Tyrrell S, Landis SC (1994) The appearance of NPY and VIP in sympathetic neuroblasts and subsequent alterations in their expression. *J Neurosci* 14:4529–4547.
38. Gonsalvez DG et al. (2013) Proliferation and cell cycle dynamics in the developing stellate ganglion. *J Neurosci* 33:5969–5979.
39. Iwamoto T, Taniguchi M, Wajjwalku W, Nakashima I, Takahashi M (1993) Neuroblastoma in a transgenic mouse carrying a metallothionein/ret fusion gene. *Br J Cancer* 67:504–507.
40. Pasini B, Ceccherini I, Romeo G (1996) RET mutations in human disease. *Trends Genet* 12:138–144.
41. Smith-Hicks CL, Sizer KC, Powers JF, Tischler AS, Costantini F (2000) C-cell hyperplasia, pheochromocytoma and sympathoadrenal malformation in a mouse model of multiple endocrine neoplasia type 2B. *EMBO J* 19:612–622.
42. Schnutgen F et al. (2003) A directional strategy for monitoring Cre-mediated recombination at the cellular level in the mouse. *Nature biotechnology* 21:562–565.
43. Workman P et al. (2010) Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *Br J Cancer* 102:1555–1577.
44. Haraguchi S, Nakagawara A (2009) A simple PCR method for rapid genotype analysis of the TH-MYCN transgenic mouse. *PLoS One* 4:e6902.
45. Hedreen JC (1998) What was wrong with the Abercrombie and empirical cell counting methods? A review. *Anat Rec* 250:373–380.
46. Dai M et al. (2005) Evolving gene/transcript definitions significantly alter the interpretation of GeneChip data. *Nucleic Acids Res* 33:e175.

## Figure legends

**Figure 1: Generation of  $Alk^{R1279Q}$  and  $Alk^{F1178L}$  KI mice.** (A) Nucleotide and protein sequences surrounding the mutated residue in exon 25 of mouse *Alk*. The R1275 residue in the human ALK receptor corresponds to the R1279 position in the mouse *Alk* receptor. (B) Schematic representation of the strategy used to obtain  $Alk^{R1279Q}$  KI mice. The Neo cassette was removed *in vivo* by Cre recombination. (C) PCR analysis of genomic tail biopsy DNA using primers Ef and Er detects successful recombination events in the KI mice (left panel). Direct Sanger sequencing on genomic DNA (middle panel) confirmed that one mutated allele was present in heterozygous mice. Heterozygosity resulted in equal amounts of Wt and mutated mRNAs (right panel). (D) Nucleotide and protein sequences surrounding the mutated residue in exon 23 of mouse *Alk*. The F1174 residue in the human ALK receptor corresponds to the F1178 position in the mouse *Alk* receptor. (E) Schematic representation of the KI allele of the  $Alk^{F1178L}$  KI mice line. (F) The same panels as in (C) are shown for the F1178L mutation. PCR analysis of genomic tail biopsy DNA was performed using primers Lf and Mr to detect the KI allele (left panel).

**Figure 2: Abnormalities of superior cervical and stellate ganglia in  $Alk^{F1178L}$  KI mice.** (A) Expression of *Alk* mRNA in the sympathetic ganglia of Wt animals determined by RT-qPCR from E16 to adult stages. *Alk* expression was calculated relative to the mean expression at P250. (B) Enlargement of SCG and stellate ganglia in adult  $Alk^{F1178L}$  KI mice. (C) Example of increased size of SCG and stellate ganglia at birth in  $Alk^{F1178L}$  KI mice compared with littermate control. (D) Quantification of SCG and stellate ganglia size at P0. (E) Immunofluorescence with islet1 and ki67 antibodies was performed on SCG sections of Wt, heterozygous (Hz) and homozygous (Ho)  $Alk^{F1178L}$  embryos at E12.5. (F) Quantification of islet1-positive cells and double positive cells for islet1 and ki67 revealed a significant increase in the number of neuroblasts of the SCG and stellate ganglia in homozygous mice. Error bars represent standard deviation.

**Figure 3: Increased proliferation of sympathetic neurons at P0 in  $Alk^{F1178L}$  KI mice.** (A) GSEA of cell cycle and G1/S transition pathway genes in transcriptomic analysis of Wt and mutated ganglia at P0. The normalized enrichment score (NES) and the nominal p-value are indicated. (B) Ki67 staining on SCG and stellate ganglia of Wt and KI  $Alk^{F1178L}$  mice at birth. Representative images are shown for the 3 genotypes (scale bars, 50 $\mu$ m). (C) Quantification of ki67 positive cells. (D) Heatmap of genes belonging to the “Mitosis” category (GO:0007067) in P0 and P18 mutated and Wt ganglia.

**Figure 4: Both  $Alk^{R1279Q}$  and  $Alk^{F1178L}$  mutations cooperate with MYCN *in vivo* to induce NB tumors.** (A and B) Kaplan-Meier analysis showing that the  $Alk^{R1279Q}$  and  $Alk^{F1178L}$  mutations cooperate with *MYCN* to induce NB in a 129B6F1 (A) and 129S2 (B) background, respectively. 129B6F1: F1 background from 129x1/SvJ x C57Bl6/N intercrosses. Mice were sacrificed upon detection of abdominal palpable tumors or paralysis of the lower extremities. (C) Examples of abdominal and thoracic tumors at autopsy. Tum: tumor; K: kidney. Stars mark the adrenal glands. (D) Example of cervical tumors deriving from the SCG. The stellate ganglia of the same mice are shown next to the cervical tumors. (E) Detection of one multifocal (abdominal and thoracic) tumor in a *MYCN*/KI  $Alk^{R1279Q}$  mice by molecular imaging using  $^{18}\text{F}$ [FDG] micro-PET. H: heart; Bl: bladder (left panel). Mouse autopsy confirmed the presence of both tumors (right panel).

**Figure 5: Histology analysis reveals frequent signs of differentiation in *MYCN/Alk* tumors and confirms multifocal tumors arising from SCG and stellate ganglia.** (A) *MYCN* tumors exhibited typical histology of NB, stroma-poor, undifferentiated. (B) In contrast, *MYCN/Alk*<sup>F1178L</sup> tumors frequently showed signs of differentiation. (C and D) In some instances, *MYCN/Alk* tumors presented with areas of different aspects as shown for one *MYCN/Alk*<sup>R1279Q</sup> case: one area is typical of a NB, stroma-poor, poorly differentiated (C) and another area corresponds to a NB, stroma-poor, differentiating (D). (E) HES staining of one cervical tumor in a *MYCN/Alk*<sup>F1178L</sup> mouse revealed several areas: the upper part corresponds to the remaining native SCG composed mainly of Schwann cells and normal ganglionic cells as shown in the zoom of areas 1 and 2, respectively. Area 3 in this upper part contains tumor cells infiltrating the normal SCG. The lower part of the SCG shows the aspect of a NB, stroma-poor, poorly differentiated (area 4 as an example). (F) As well, HES staining of one thoracic tumor in a *MYCN/Alk*<sup>R1279Q</sup> mouse indicated that most of the structure (A) was composed of tumor cells consistent with a NB, stroma-poor, poorly differentiated (area 1 as an example). However, we observed in this main part a small area containing normal ganglionic cells (area 2) and one part of the native ganglia (B, as shown in area 3) is still detected close to the main tumorigenic part. (Scale bars, 50  $\mu$ m).

**Figure 6: Transcriptomic analysis uncovers *Ret* and *Vip* as targets of activated *Alk*.** (A) Unsupervised hierarchical clustering using the top 5% genes with the highest IQR clearly separates *MYCN* and *MYCN/Alk* tumors. (B) The list of the top 50 upregulated genes in *MYCN/Alk* tumors is shown together with a heatmap. It includes the *Ret*, *Vgf* and *Vip* genes. (C) Gene Ontology analysis of the differentially expressed genes in *MYCN/Alk* tumors versus *MYCN* tumors reveals an enrichment of genes related to neuronal functions in *MYCN/Alk* tumors. (D) RET down-regulation in CLB-Ga upon TAE-684 treatment (blue). Untreated cells are shown in red. (E) Decreased expression of *RET* and *VIP* upon TAE-684 treatment in human NB cell lines with amplified ALK (blue), F1174L ALK (green) or R1275Q ALK (red). Cell lines with Wt ALK appear in grey. C: Control cells; T: TAE-684 treated cells. 1: NB-1; 2: Kelly; 3: SK-N-SH; 4: SMS-KNCR; 5: CLB-Ga; 6: LAN5; 7: UKF-NB-3; 8: IMR-32; 9: NGP; 10: SK-N-AS. P values were calculated using one-sided Wilcox-test.

Figure 1

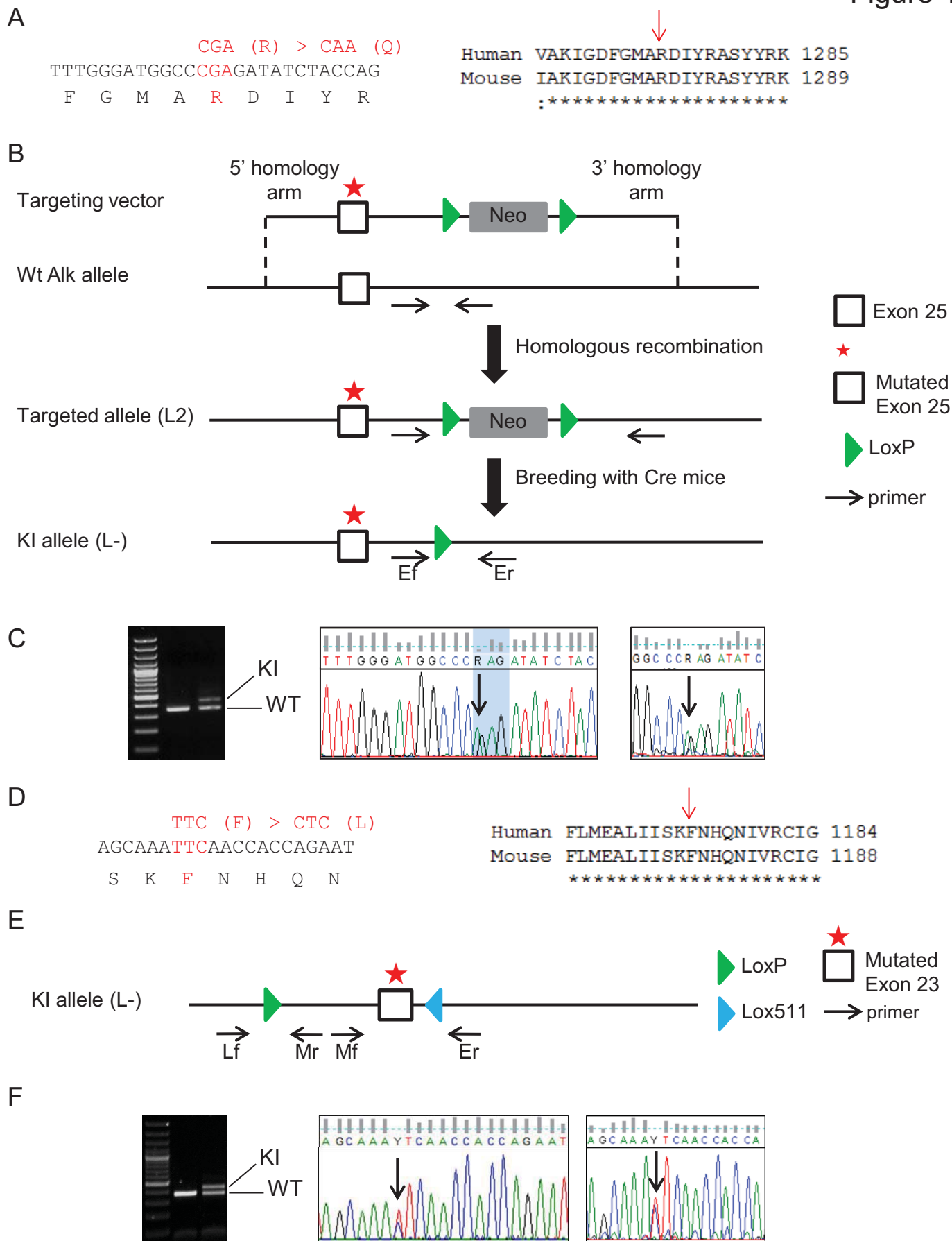


Figure 2

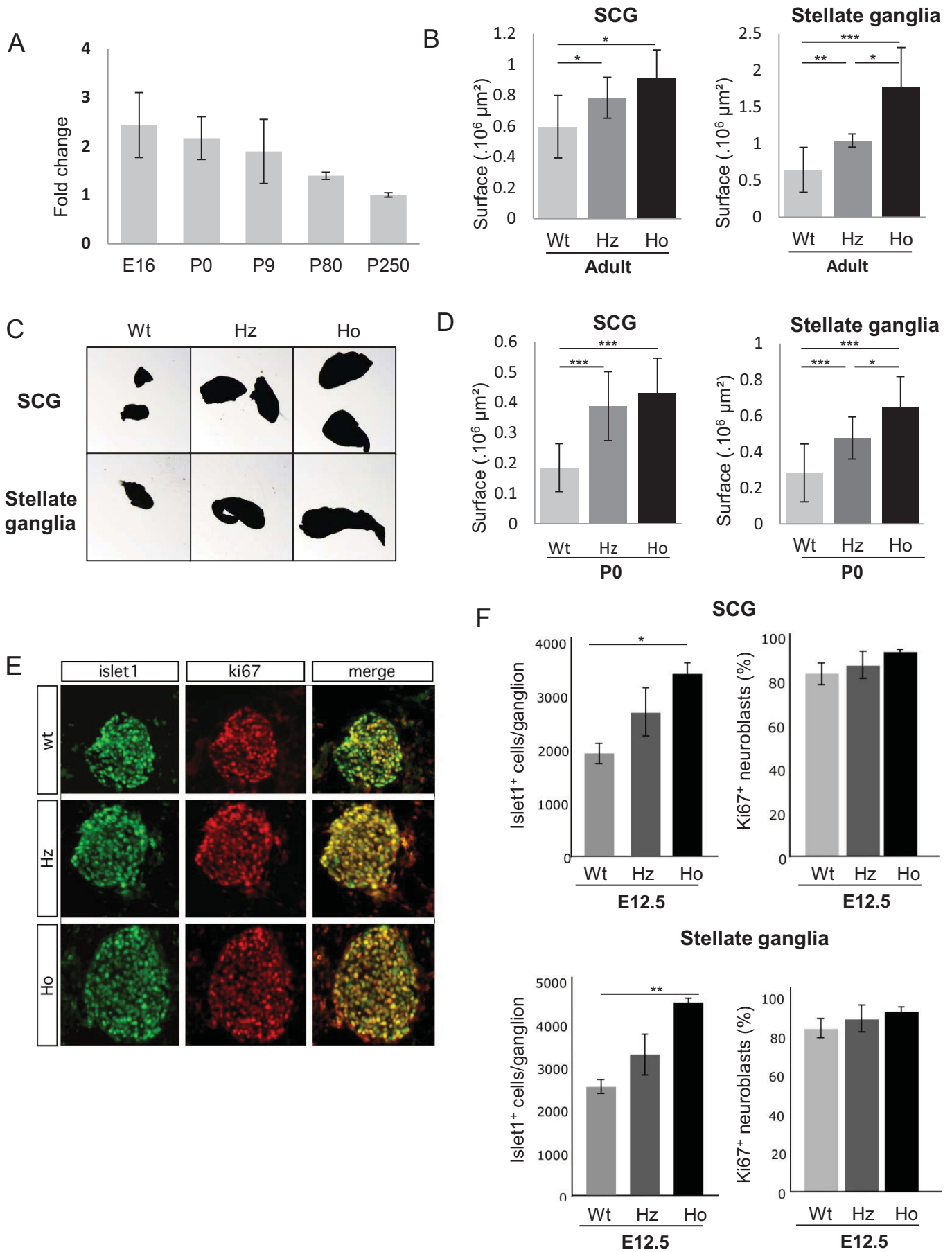


Figure 3

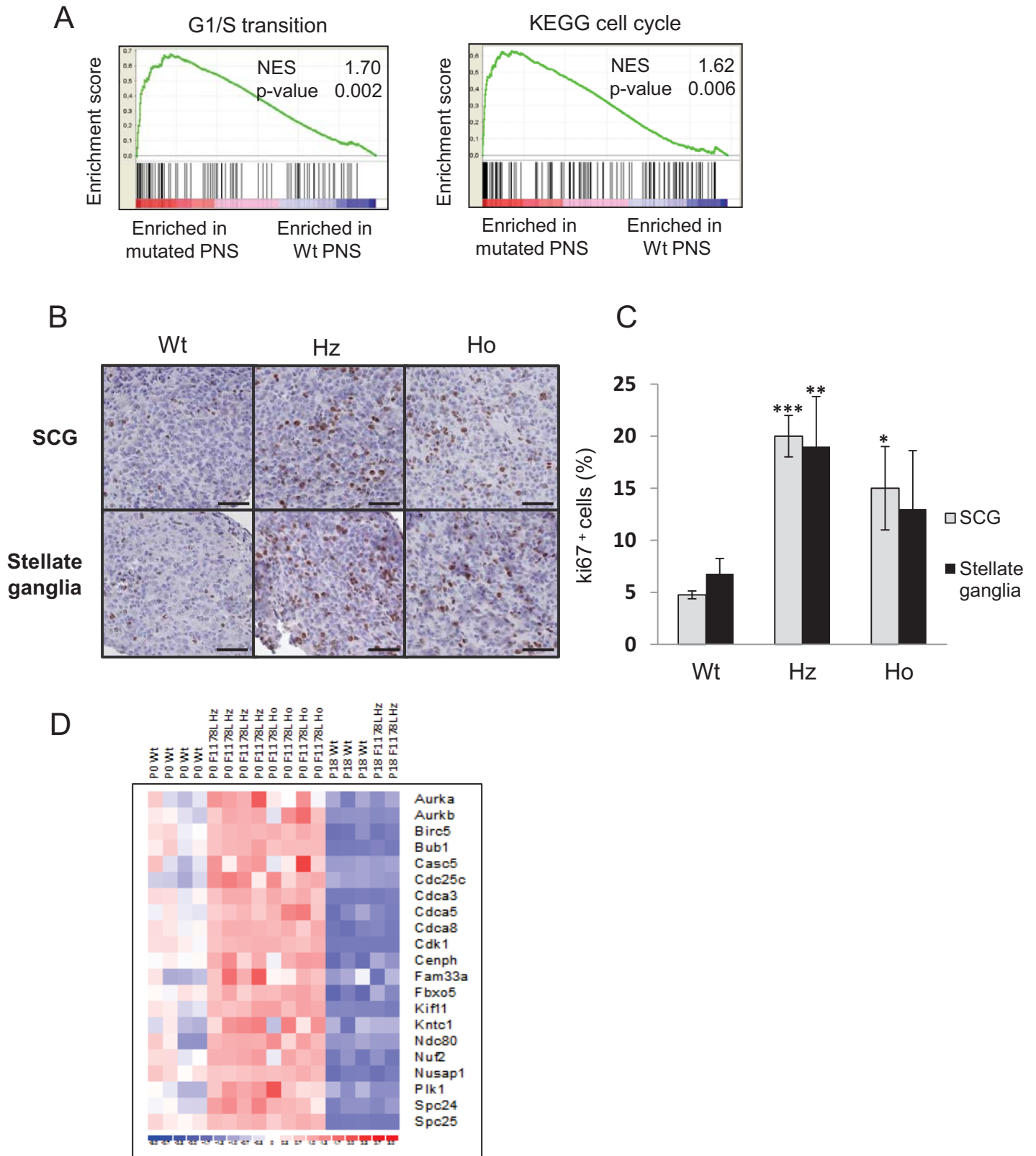
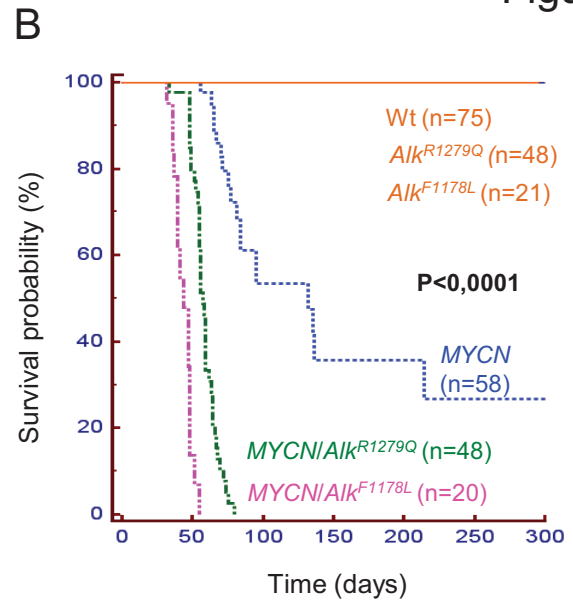
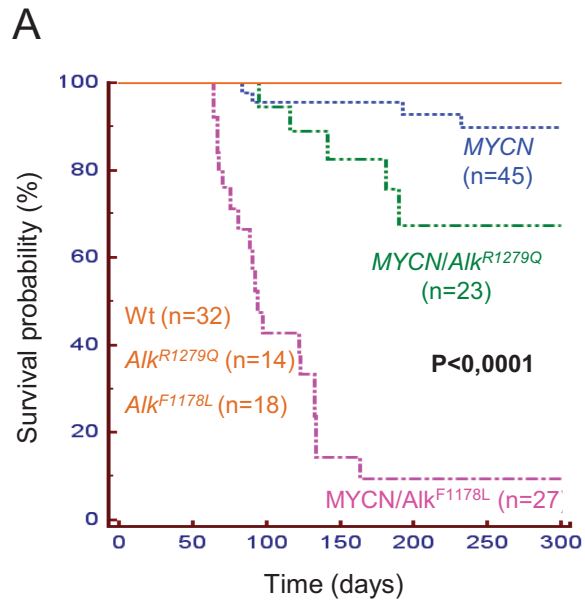
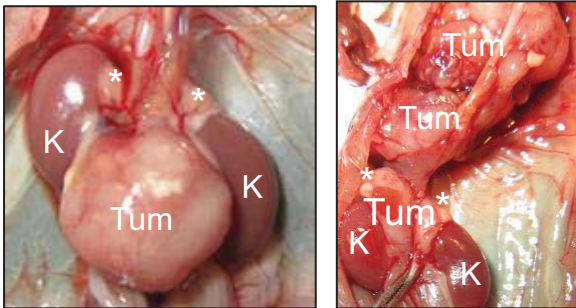




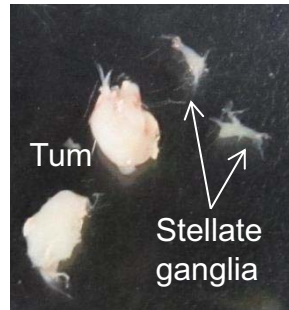
Figure 4



**C**



**D**



**E**

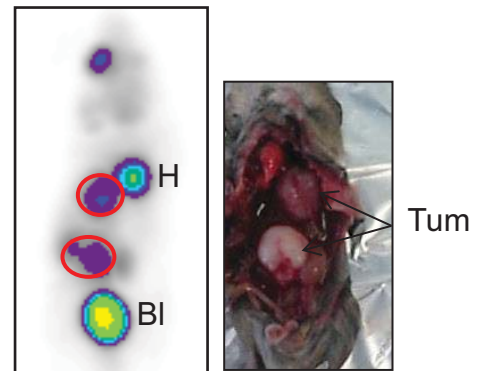


Figure 5

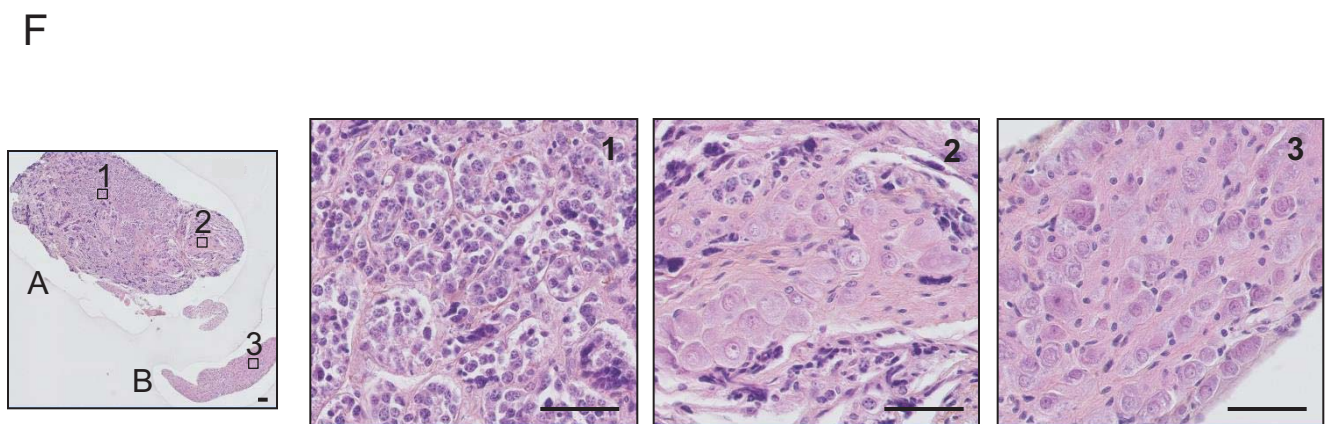
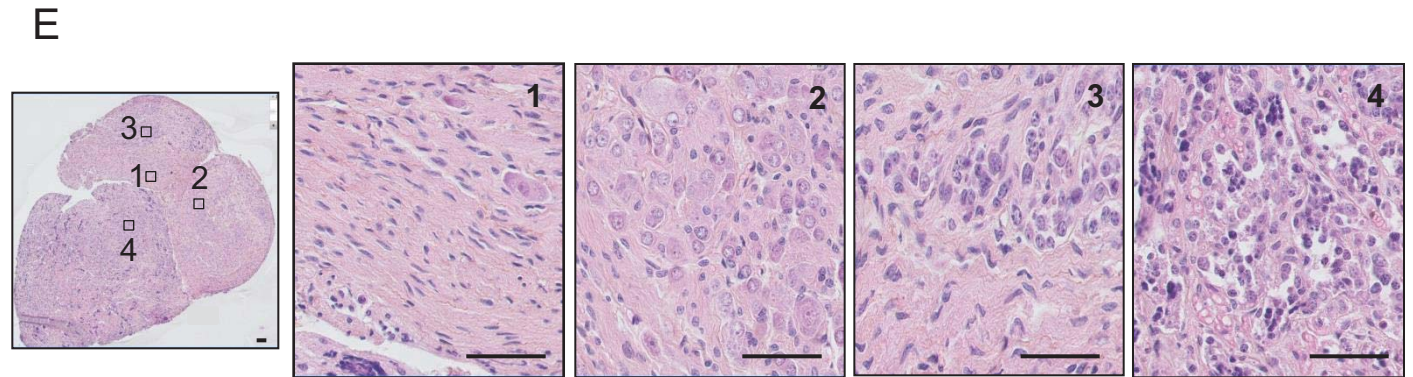
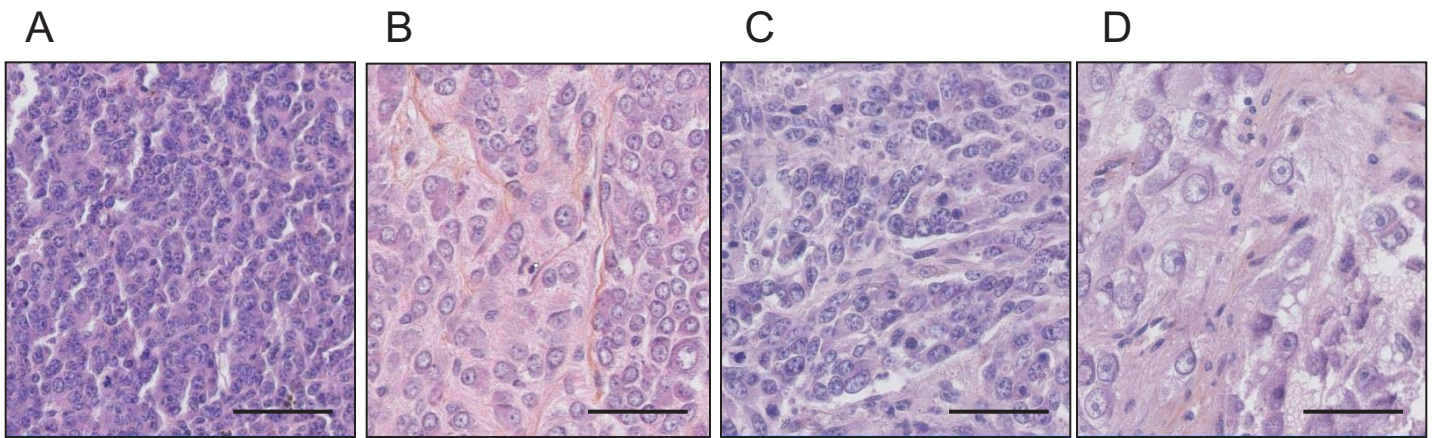
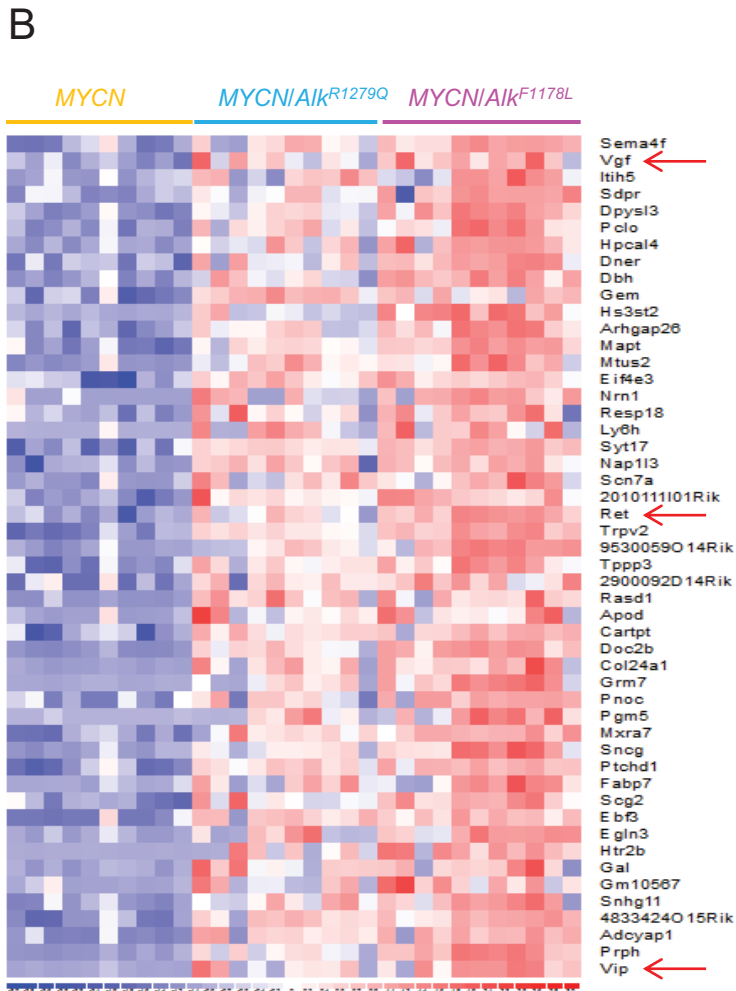
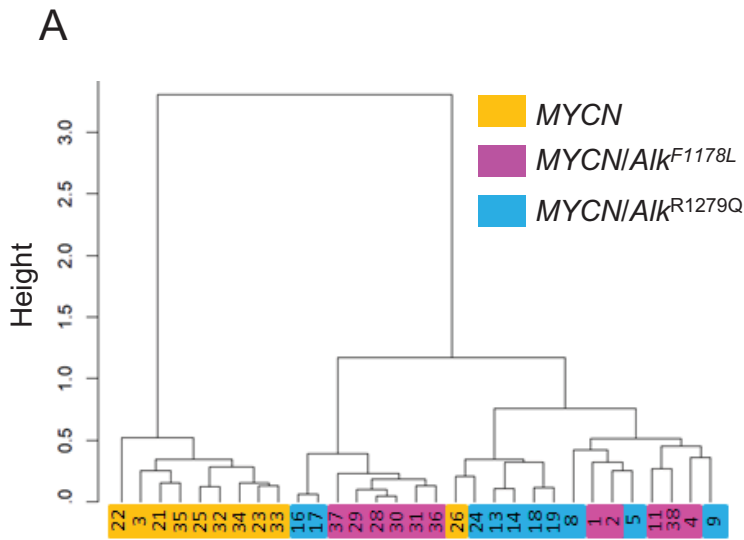
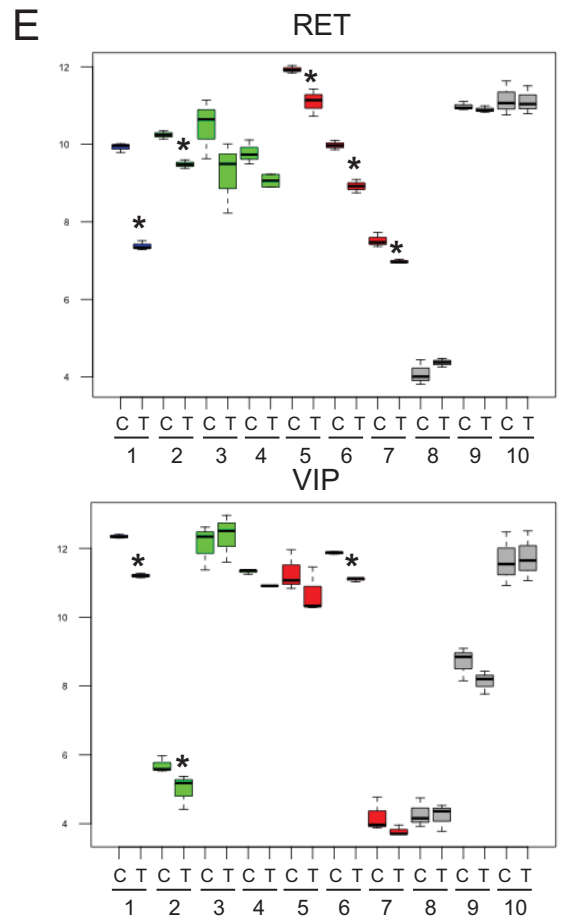
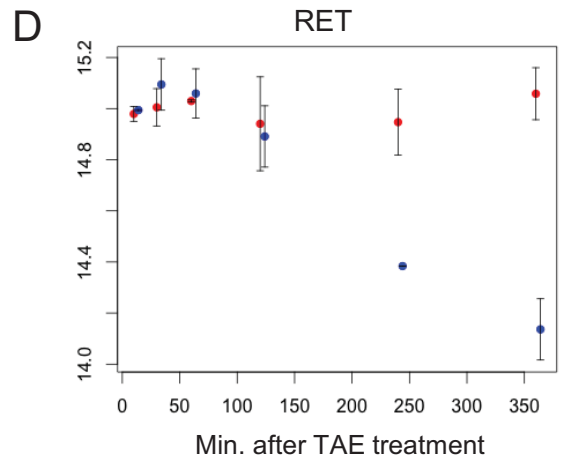


Figure 6

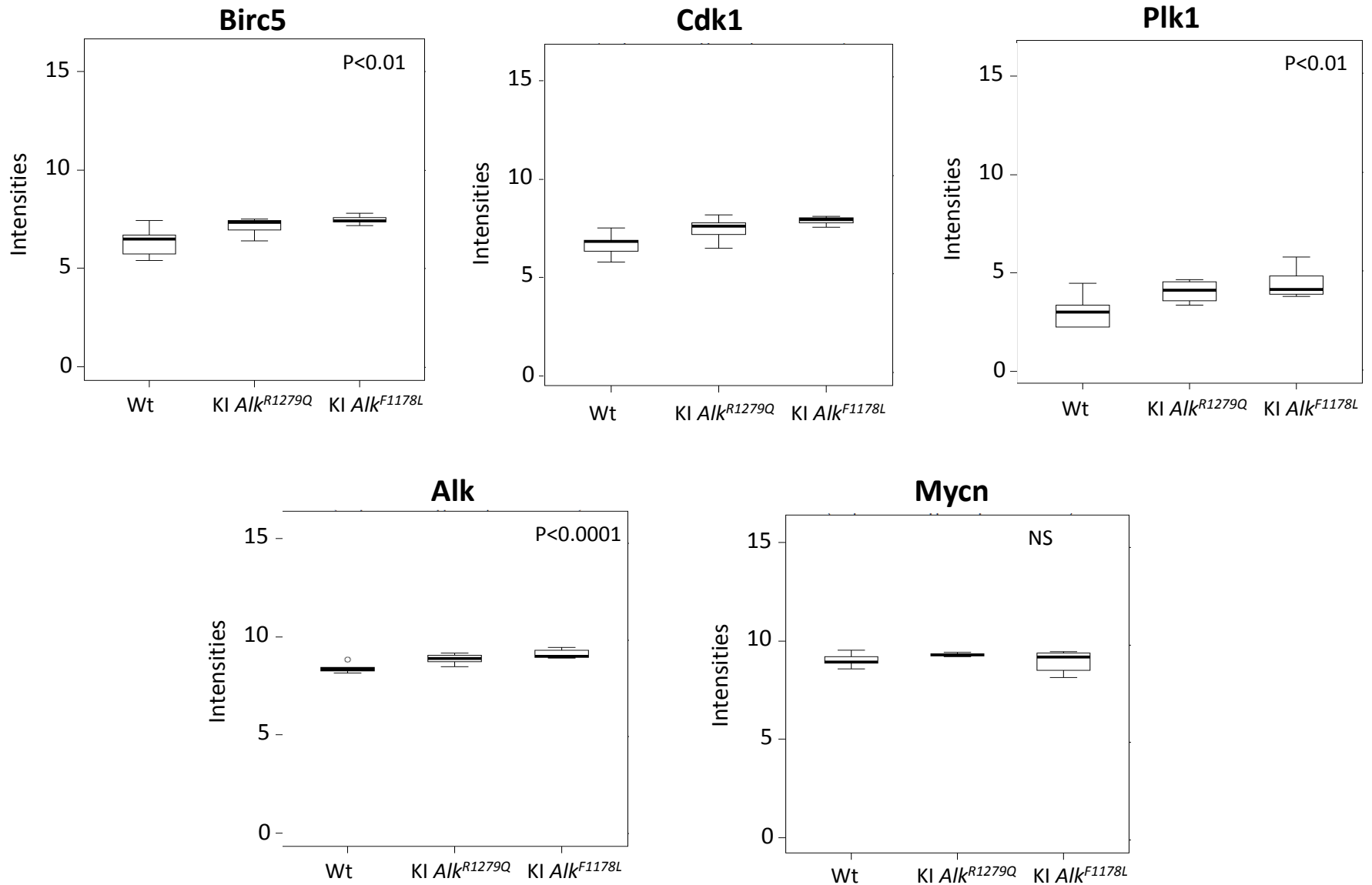


**C**

Z-Score	GO.Term
6.72	terminal button
6.43	neuronal cell body
5.69	axon
4.77	dendritic shaft
4.75	caveola
4.69	synapse
3.85	cell surface
3.84	membrane fraction
8.00	regulation of action potential in neuron
6.84	phagocytosis



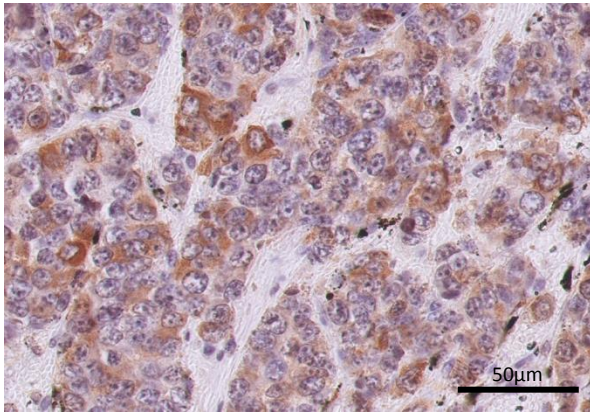
**Supplementary figure 1:** Boxplots showing expression of different genes in the 3 groups of PNS ganglia at birth.



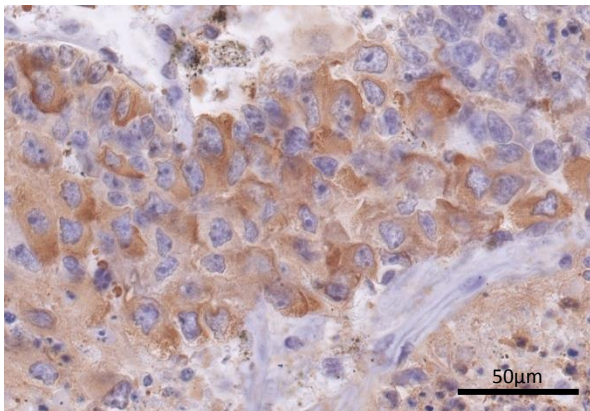
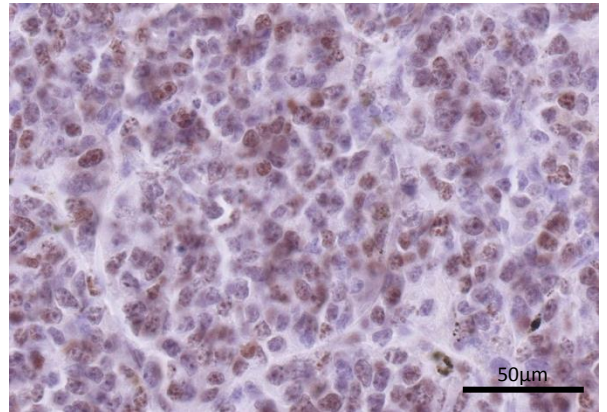
P-values were determined using a two-sided ANOVA test. (NS: not significant)



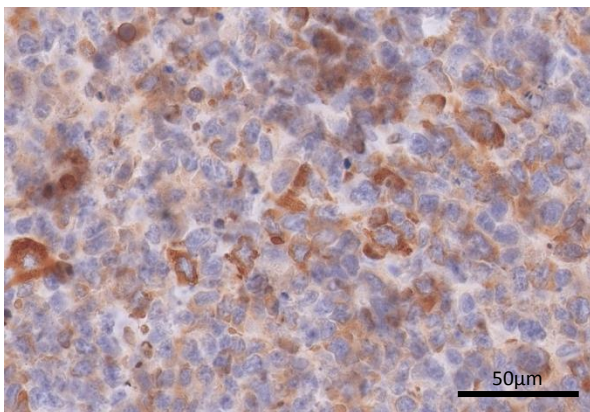
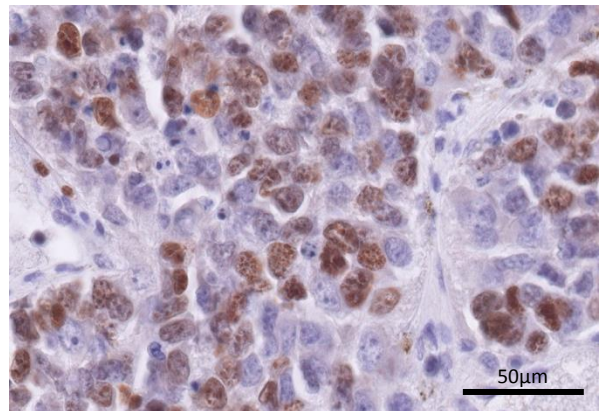
**Supplementary figure 2:** TH and ki67 stainings of *MYCN* and *MYCN/Aik* tumors. Representative figures are shown for each tumor group. (Left column: TH; right column: ki67)



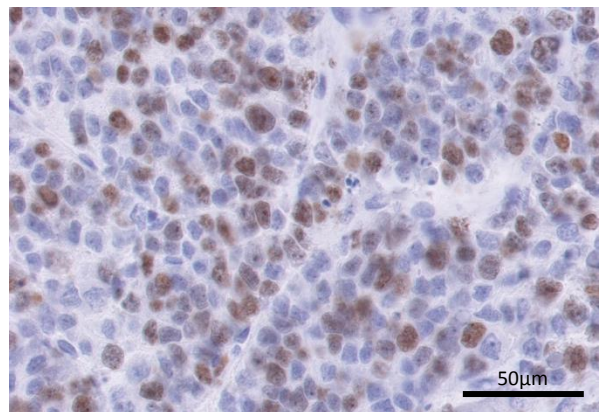
*MYCN* tumor



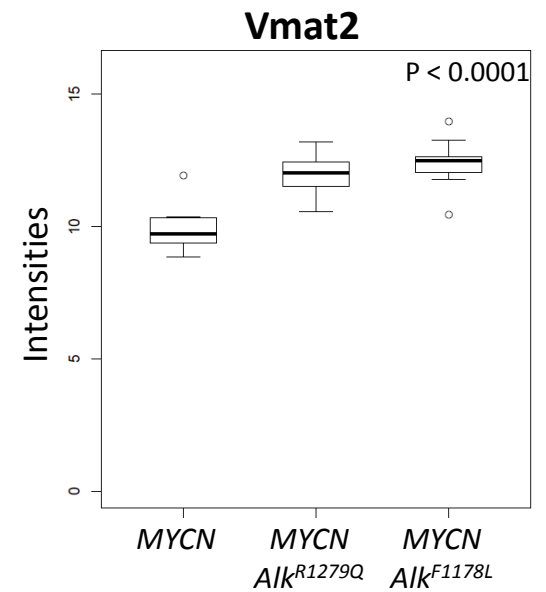
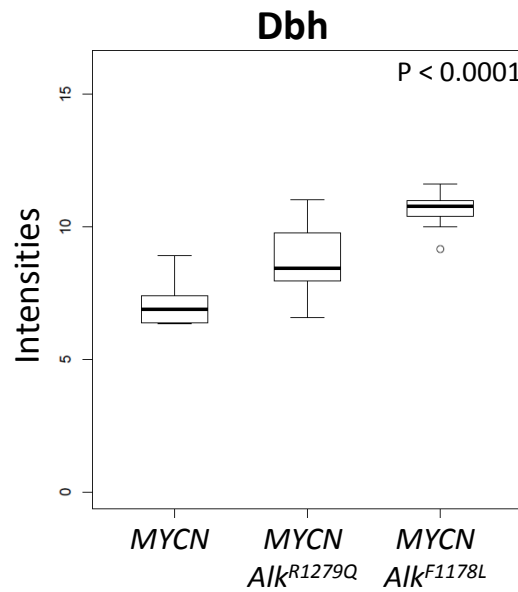
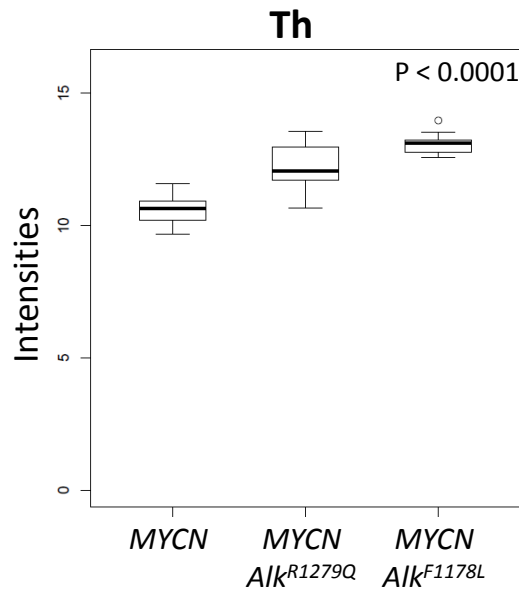
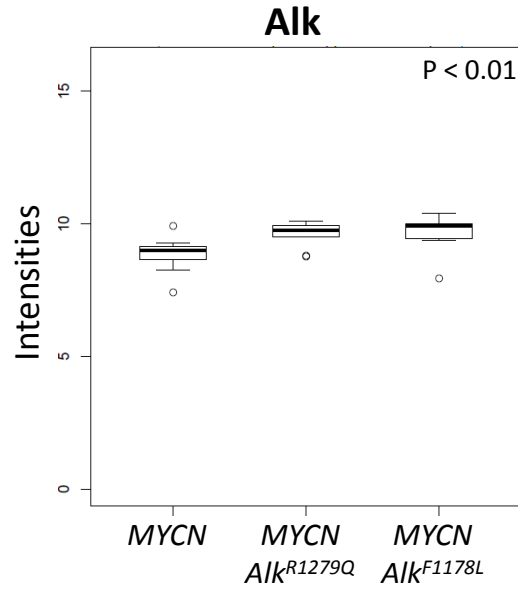
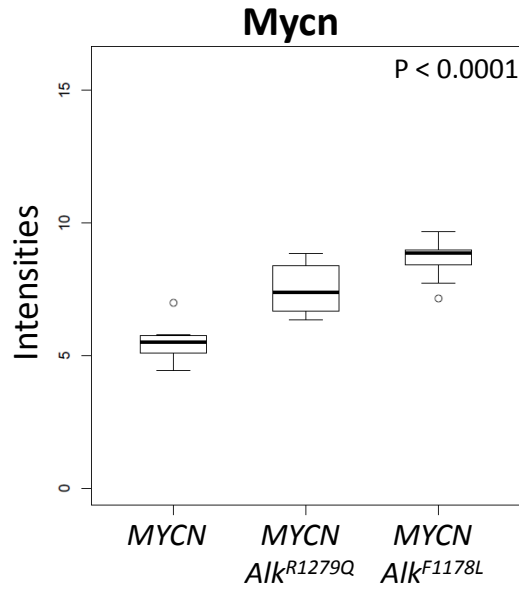
*MYCN/Aik*<sup>F1178L</sup> tumor



*MYCN/Aik*<sup>R1279Q</sup> tumor

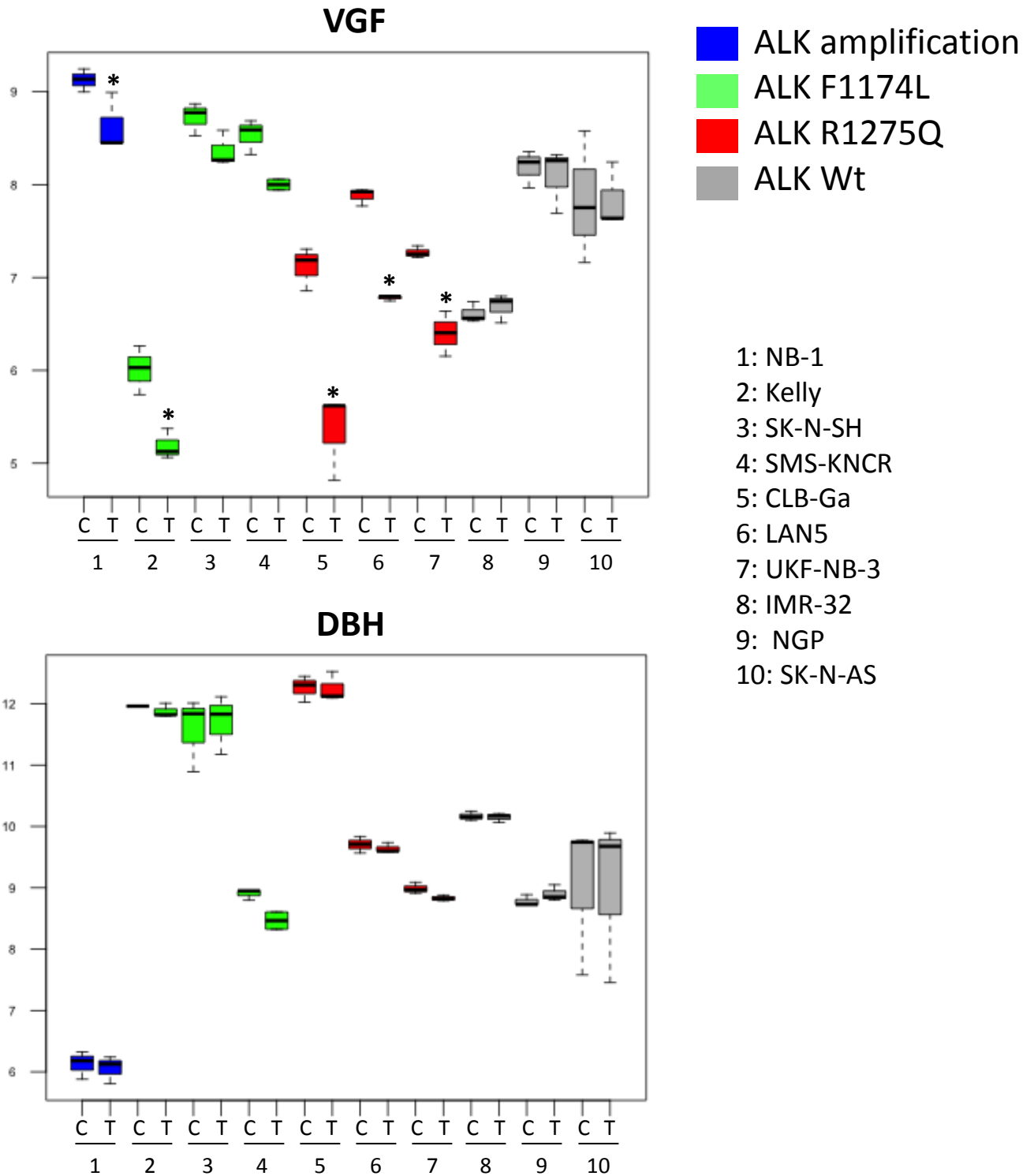


**Supplementary figure 3:** Boxplots showing expression of different genes in the 3 groups of tumors.



P-values were determined using a two-sided ANOVA test.

**Supplementary figure 4:** Expression of *VGF* and *DBH* upon ALK abrogation in human NB cell lines.



P values were calculated using one-sided Wilcoxon-test.





# **DISCUSSION**

## 1. La rétention intracellulaire de RTK, une marque d'activation

En collaboration avec le groupe du Pr. Marc Vigny, nous avons pu mettre en évidence la rétention intracellulaire associée à une maturation incomplète des récepteurs ALK. L'activité enzymatique constitutive du récepteur est responsable de cette rétention intracellulaire car lorsque l'on inhibe ALK à l'aide de l'inhibiteur spécifique NVP-TAE684, le récepteur muté est de nouveau adressé correctement à la membrane plasmique. Ce travail démontre également qu'une faible proportion du récepteur sauvage fait l'objet d'une rétention intracellulaire associée à une glycosylation incomplète. Ce phénomène pourrait être la conséquence d'une dimérisation spontanée du récepteur sauvage conduisant à son autophosphorylation. Des expériences d'inhibition de ALK par ARN interférence dans la lignée cellulaire IMR32 exprimant *ALK* sauvage conduit à une inhibition de la prolifération cellulaire (Janoueix-Lerosey et al., 2008; Passoni et al., 2009). Ces résultats suggèrent que même en absence de mutations ponctuelles, le récepteur sauvage puisse s'autoactiver. Ce travail met aussi en évidence qu'une faible partie des récepteurs ALK mutés sont tout de même adressés à la membrane plasmique et que ceux-ci ont un niveau de phosphorylation supérieur aux récepteurs retenus dans le réticulum endoplasmique. Une étude récente identifie la phosphatase PTP1B comme étant l'enzyme capable de déphosphoryler les récepteurs ALK mutés retenus au sein de la cellule (Boutterin et al., 2013).

Enfin, cette anomalie d'adressage est aussi observée dans la lignée CLB-Bar et dans les lignées cellulaires NIH3T3 exprimant le récepteur ALK muté ou exprimant  $ALK^{\Delta 4-11}$ .

Un défaut d'adressage membranaire est décrit pour de nombreux RTK mutés tels que : PDGFR, KIT, FGFR2 et 3 ou encore RET dans diverses pathologies (Kjaer and Ibáñez, 2003; Lievens et al., 2004; Schmidt-Arras et al., 2005; Xiang et al., 2007). Les altérations touchant ces récepteurs conduisent à leur activation constitutive, ce qui provoque leur rétention. Cependant, tous les RTK constitutivement actifs ne subissent pas de rétention intracellulaire. Par exemple, le variant EGFRvIII, exprimé dans les glioblastomes est constitutivement actif et correctement adressé à la membrane plasmique (Davies et al., 2006).

Une localisation subcellulaire anormale peut avoir des conséquences majeures sur les voies de signalisation activées par le récepteur. Cette situation a notamment été décrite dans le cas de la duplication interne du gène *FLT3* (*FLT3-ITD*) chez des patients majoritairement atteints de leucémies myéloïdes aiguës. Dans ce cas, le mutant oncogénique *FLT3-ITD* est retenu au niveau du réticulum endoplasmique, ce qui conduit à l'activation anormale de STAT5 et à la

transcription de ses cibles PIM1/2. Par contre, FLT3-ITD n'active pas la signalisation PI3K ou MAPK comme FLT3 le fait (Choudhary et al., 2009). La rétention intracellulaire de RTK peut donc avoir des conséquences importantes sur les voies de signalisation.

Ces informations sont à prendre en considération car les voies de signalisation activées par la forme sauvage de ALK ne sont probablement pas toutes les mêmes que celles activées par la forme mutée ou tronquée. De la même manière, les voies qui sont jusqu'à présent attribuées à ALK sont en fait celles décrites pour la fusion NPM-ALK. Or cette protéine de fusion ne possède pas le domaine d'adressage membranaire du récepteur ALK, la localisation sub-cellulaire est régulée par NPM, ce qui conduit cette fusion à être localisée dans le cytoplasme, le noyau et le nucléole. Là encore, les voies de signalisation associées à NPM-ALK ne doivent pas être exactement les mêmes que celle de ALK pleine taille.

## 2. Les anticorps inhibiteurs: futur outil clinique ?

L'utilisation d'anticorps monoclonaux capables d'activer ou d'inhiber le récepteur ALK nous a permis de mettre en évidence des mécanismes de dégradation bien distincts entre les récepteurs localisés à la membrane plasmique et ceux retenus au sein des organites intracellulaires. Ces anticorps se fixent au récepteur et permettent de suivre son internalisation, mais aussi de contrôler son état d'activation.

Le traitement de lignées de NB à l'aide d'anticorps inhibiteurs conduit à une diminution de la prolifération cellulaire de lignées de NB. De plus, une combinaison entre le crizotinib et un anticorps inhibiteur conduit à une inhibition plus forte de la prolifération cellulaire par rapport au crizotinib seul (Carpenter et al., 2012). Le seul inhibiteur du récepteur ALK ayant fait l'objet d'essais cliniques est le crizotinib (Mossé et al., 2013). Cette molécule a été utilisée chez des patients atteints de cancers du poumon à petites cellules ou de tumeurs myofibroblastiques inflammatoires (Butrynski et al., 2010; Choi et al., 2010; Kwak et al., 2010). Chez ces patients, l'activation constitutive du récepteur ALK est la conséquence de réarrangements chromosomiques fusionnant le domaine tyrosine kinase à des partenaires protéiques. Malgré un bénéfice du traitement sur la plupart des patients testés, des mutations secondaires sont apparues suite au traitement aux positions 1156 et 1196 du récepteur ALK en conférant une résistance au crizotinib chez un patient atteint d'un cancer du poumon à petites cellules (Choi et al., 2010). De la même manière, une mutation à la position 1174 a été

rapporté chez un patient atteint d'une tumeur myofibroblastique inflammatoire et traité au crizotinib (Sasaki et al., 2010).

Le développement de stratégies alternatives permettant d'empêcher ou de répondre à ces mécanismes de résistance est donc indispensable. Dans ce contexte l'utilisation d'un anticorps inhibiteur en combinaison avec un inhibiteur moléculaire permettrait de cibler deux parties bien distinctes du récepteur. Cette stratégie thérapeutique réduirait le risque de développer une résistance au traitement acquise suite à une mutation secondaire.

Ces résultats mettent en évidence l'intérêt que peuvent représenter ces anticorps pour la thérapie du NB. L'association entre un inhibiteur pharmacologique et un anticorps antagoniste pourrait constituer une approche thérapeutique ciblée et complète afin de supprimer les risques de résistance acquise suite à une monothérapie.

### 3. Caractérisation des réarrangements chromosomiques du gène *ALK*

Ce travail de thèse a mis en évidence une fréquence élevée de réarrangements du gène *ALK* dans les échantillons de NB analysés. En effet, 23% des lignées cellulaires présentent au moins un point de cassure dans ce gène. On peut donc considérer que le gène *ALK* est un point chaud de réarrangement dans le NB. Cependant, les points de cassure affectent différents introns du gène. Il s'agit là d'une différence majeure entre ce qui se produit dans le NB et ce qui a été décrit dans différents cancers présentant des réarrangements chromosomiques du gène *ALK* systématiquement localisés dans l'intron 19. Concernant les tumeurs primaires, 2 sur les 13 analysées présentent un gène *ALK* réarrangé. Il est cependant difficile de définir un pourcentage représentatif sur cette étude. En effet, seules les tumeurs avec un gain du 2p ou une amplification du gène *ALK*, mis en évidence à l'aide de profils de CGH-array peu résolutifs, ont été analysées ensuite par notre puce à haute résolution. On ne peut donc pas exclure qu'un nombre plus important de tumeurs aient en réalité des points de cassure au sein du gène *ALK*.

Sur un total de neuf échantillons réarrangés, trois présentent une expression du réarrangement au niveau messager. La translocation équilibrée de la lignée cellulaire N206/Kelly conduit à l'expression d'un transcrite chimérique fusionnant *ALK* et *CLPTMIL*. Un transcrite de fusion entre les gènes *ALK* et *FHIT* a été détecté dans la lignée CLB-Re. Cependant, aucun de ces deux transcrits de fusion ne conserve le cadre de lecture complet ce qui indique qu'ils n'ont

probablement pas de rôle oncogénique. Enfin, le troisième échantillon est la lignée cellulaire CLB-Bar dans laquelle un réarrangement chromosomique fusionnant deux portions distantes du gène a été identifié. Ce réarrangement conduit à l'expression d'un variant protéique tronqué pour une partie du domaine extracellulaire. Cependant, la plupart des réarrangements chromosomiques ne conduisent pas à l'expression de variants transcriptionnels. Il n'y a pas de récurrence concernant la structure et la localisation des réarrangements. Ces informations suggèrent que la plupart de ces événements ne sont pas impliqués dans la tumorigenèse mais qu'ils doivent plutôt être la conséquence de l'instabilité génétique causée par la transformation cellulaire.

#### 4. $ALK^{\Delta 4-11}$ est associé à l'agressivité tumorale

Le variant  $ALK^{\Delta 4-11}$  a été découvert dans la lignée cellulaire CLB-Bar. Sa présence a été confirmée dans la tumeur à la rechute, de laquelle a été dérivée la lignée cellulaire. Ce variant n'est donc pas la conséquence d'un réarrangement chromosomique ayant pu se produire lors de la mise en culture de la lignée. La rechute tumorale s'est développée chez un patient diagnostiqué initialement à l'âge de 2 ans et traité par chirurgie et chimiothérapie. L'analyse de l'ADN tumoral au diagnostic nous indique que le gène *ALK* y est amplifié mais que le réarrangement chromosomique conduisant à l'expression du variant  $ALK^{\Delta 4-11}$  n'y est pas détecté. L'expression de ce variant protéique est donc associée à l'agressivité tumorale. L'hétérogénéité tumorale de la tumeur au diagnostic suggère que le réarrangement puisse y être présent mais uniquement dans un sous-clone trop minoritaire pour être détecté. Le sous-clone exprimant le variant  $ALK^{\Delta 4-11}$  aurait donc été sélectionné entre le diagnostic et la rechute. Plusieurs données favorisent cette hypothèse de sélection clonale :

- La tumeur au diagnostic est très hétérogène concernant l'amplification des gènes *ALK* et *MYCN* alors que la tumeur à la rechute est beaucoup plus homogène (cf. figure 3, article II).
- Les profils SNP6.0 du chromosome 2p indiquent qu'un nombre plus important de régions chromosomiques sont amplifiées au diagnostic par rapport à la rechute. De plus, toutes les régions amplifiées à la rechute l'étaient déjà au diagnostic (cf. figure 4, article II).
- Ces mêmes profils montrent aussi une évolution du niveau d'amplification des régions du 2p entre le diagnostic et la rechute. Alors qu'au diagnostic le gène *MYCN* est plus

amplifié que les autres amplicons, le même niveau d'amplification entre les amplicons est observé à la rechute (cf. figure 4, article II).

- L'analyse des SNP a révélé que le même allèle du gène *ALK* est amplifié au diagnostic et à la rechute.

Le variant  $ALK^{\Delta 4-11}$  devait donc être présent dans un sous-clone dès le diagnostic. Le clone contenant a dû être sélectionné par la cellule tumorale, puis amplifié. Dans un deuxième temps, cette cellule a été elle-même sélectionnée. Elle correspond au précurseur des cellules constituant la tumeur à la rechute (cf. figure 19). Le patient a été traité par chimiothérapie, il est donc possible que l'expression du variant  $ALK^{\Delta 4-11}$  ait conféré une résistance au traitement. Des expériences de traitement par chimiothérapie de la lignée CLB-Bar ou d'un modèle cellulaire de surexpression permettraient de vérifier cette hypothèse.

## 5. Délétion partielle de la protéine ALK, un évènement récurrent

### 5.1. Récurrence dans le neuroblastome

L'équipe de S. Ogawa a fait une observation similaire à celle du variant  $ALK^{\Delta 4-11}$  dans une lignée cellulaire de NB (Okubo et al., 2012). Les auteurs décrivent un variant protéique de ALK tronqué, ayant perdu les exons 2 et 3 et présentant des propriétés oncogéniques et tumorigènes semblables à celles de la protéine  $ALK^{\Delta 4-11}$ . Ce variant, nommé  $ALK^{\Delta 2-3}$ , conserve son site de liaison au ligand et ne perd qu'une partie d'un des domaines MAM (cf figure 20). Cela suggère que ces domaines sont impliqués dans les capacités oncogéniques des variant protéiques. Il est intéressant de noter que la protéine ALK est le seul RTK à posséder ce type de domaine extracellulaire. Ces domaines sont présents sur les protéines transmembranaires de type meprin ou récepteur tyrosine phosphatase. Les deux domaines MAM sont indispensables à l'activation de dALK, l'orthologue de *ALK* chez la drosophile (Lorén et al., 2003). Dans le cas des variants du récepteur ALK, il subsiste au moins une partie d'un domaine MAM (le premier pour  $ALK^{\Delta 4-11}$ ). Cette portion restante pourrait donc être suffisante pour permettre l'activation du récepteur, tandis qu'une absence totale empêcherait toute activation. Il serait intéressant de déterminer si chez l'homme, comme chez la drosophile, l'absence totale de domaines MAM empêche l'activation du récepteur. Les mécanismes d'activation de ALK ne sont pas clairement établis, il est donc difficile de déterminer si l'absence de cette portion du domaine extracellulaire peut induire une

dimérisation constitutive ou même si elle modifie la conformation du récepteur, permettant une activation constitutive. Enfin, même si les variants  $ALK^{\Delta 4-11}$  et  $ALK^{\Delta 2-3}$  sont tous les deux activés de façon constitutive et retenus dans le compartiment intracellulaire, leurs mécanismes d'oncogenèse peuvent être différents. En effet, STAT3 est activé lorsque le variant  $ALK^{\Delta 2-3}$  est exprimé alors que nous n'avons pas observé cet effet concernant le variant  $ALK^{\Delta 4-11}$ . Une analyse transcriptomique ou phosphoprotéomique comparative entre les modèles cellulaires exprimant les différentes formes de ALK (sauvage, mutée, tronquée) permettrait de mieux comprendre les mécanismes oncogéniques liés à ces variants.

## 5.2. Réarrangement dans un rhabdomyosarcome

Un variant messenger du même type a été identifié au laboratoire dans un rhabdomyosarcome embryonnaire. Dans cette tumeur, le profil CGH-array indique un gain de la région génomique portant le gène *ALK*. Mais au milieu de cette région gagnée, la séquence codant pour les exons 2 à 17 est manquante. La présence d'un ARN messenger correspondant à l'expression de cet allèle réarrangé a été confirmée par RT-PCR. La région correspondant à cette délétion comprend les acides aminés 261 à 971 du domaine extracellulaire. Cette région, plus large que celles décrites dans les deux variants du NB, couvre l'intégralité des deux domaines MAM et englobe aussi la région riche en glycine, également indispensable à la fonction du récepteur chez la drosophile (Lorén et al., 2003) (cf. figure 20). Même si aucune étude fonctionnelle n'a été réalisée avec ce variant pour le moment, il est probable qu'il se comporte de façon similaire aux variants observés dans le NB et qu'il possède donc des propriétés oncogéniques.

Le récepteur ALK est fortement exprimé dans une majorité de RMS alvéolaires mais aussi dans certains RMS embryonnaires. Une mutation ponctuelle dans l'exon 24 et des délétions exoniques dans le domaine kinase ont aussi été observées, cependant leur impact fonctionnel n'a pour le moment pas été étudié (Van Gaal et al., 2012). L'ensemble de ces données suggèrent que le gène *ALK* puisse jouer un rôle important dans le développement de certains rhabdomyosarcomes.

En conclusion, ce travail démontre que les réarrangements chromosomiques affectant le gène *ALK* constituent un mécanisme alternatif aux mutations ponctuelles conduisant à l'activation du récepteur. Pour le moment, seuls deux cas de NB et un cas de rhabdomyosarcome présentant ce type d'activation ont été identifiés. Un crible précis réalisé sur une cohorte importante de ces deux types de tumeurs permettra de conclure quant à la récurrence de tels

mécanismes dans le cancer. D'autres mécanismes peuvent aussi conduire à l'expression de variants protéiques, tels que l'épissage alternatif ou le clivage protéique. Ainsi l'analyse du profil génomique seul peut limiter le nombre d'échantillons impliqués dans ce mécanisme d'activation du gène *ALK* et ne semble donc pas suffisante. Le crible devra donc rechercher la présence de variants messagers ou protéiques.

## 6. Modélisation *in vivo* des mutations ponctuelles du gène *ALK*

Plusieurs équipes ont précédemment modélisé la mutation F1174L chez le zebrafish et la souris. Ces modèles ont permis de décrire la coopération oncogénique entre cette mutation du gène *ALK* et l'amplification de *MYCN*. Cependant, tous ces modèles expriment la mutation par l'intermédiaire d'un transgène. Le niveau d'expression est donc dépendant du site d'insertion du transgène et ne correspond pas au niveau d'expression physiologique du gène dans l'espèce concernée. Le promoteur du transgène régule aussi la localisation tissulaire de l'expression, qui ne sera donc pas totalement identique à celle du gène endogène. L'expression est ainsi souvent restreinte aux cellules du tissu sympathique adrénergique, ce qui est cohérent avec l'origine tissulaire du NB mais ne permet pas d'élargir l'étude à l'analyse du rôle développemental global du gène *ALK*. Enfin, ces modèles expriment la séquence mutée de l'ADNc humain *ALK* chez la souris et le zebrafish. L'homologie de séquence n'étant pas totale entre les espèces, l'activation des voies de signalisation et l'interaction avec différents partenaires protéiques peut en être affectée.

Pour ces différentes raisons, la réalisation de modèles KI permet de s'affranchir de ces problèmes et apporte un complément indispensable aux modèles transgéniques. En effet, l'expression étant contrôlée par le promoteur endogène, la régulation spatio-temporelle de l'expression est physiologique. De tels modèles permettent donc d'évaluer le potentiel tumorigène du gène *Alk in vivo* mais aussi d'étudier les effets sur le développement.

## 7. Les souris KI *Alk*, un modèle de prédisposition au NB

L'effet développemental du gène *ALK* sur le SNS a été décrit principalement chez les souris KI *Alk*<sup>F1178L</sup> car ce sont les animaux qui présentaient le phénotype le plus marqué lors des dissections. Cependant, une augmentation de taille des ganglions du SNS associée à une



surprolifération neuronale à la naissance a aussi été caractérisée chez les souris KI Alk<sup>R1279Q</sup>. Chez nos souris, la mutation F1178L conduit à un phénotype plus marqué que la mutation R1279Q. De plus, le phénotype observé au niveau des ganglions du SNS est sensible au dosage génique concernant la mutation du gène *Alk*. Le contrôle du gène *Alk* dans la régulation développementale du SNS dépend donc de la quantité de protéines Alk activées et leur niveau d'activation.

Les tumeurs de NB se développent à partir du SNS. Les anomalies développementales de ce tissu décrites dans ce travail procurent une explication à la prédisposition au NB chez des personnes ayant une mutation germinale du gène *ALK*. En effet, l'hyperplasie induite par les mutations du gène *ALK* peut être considérée comme une première étape vers la transformation neuroblastique. Cette hypothèse est compatible avec la pénétrance incomplète des mutations germinales chez l'homme.

Les KI Alk ne génèrent pas de NB spontanément. Si par contre ces souris présentent une autre anomalie génétique capable de coopérer avec les mutations du gène *ALK*, alors ces animaux développent des NB à partir du tissu sympathique. C'est ce qui se produit chez les souris MYCN/Alk.

## 8. La coopération oncogénique

Dans la méta-analyse publiée par De Brouwer *et al.*, la mutation ALK<sup>F1174L</sup> est préférentiellement associée à l'amplification de *MYCN* dans les tumeurs humaines. Afin de déterminer si ces deux types d'altérations coopèrent *in vivo*, nous avons croisé des souris TH-MYCN avec les souris KI Alk et mis en évidence une coopération oncogénique. Cependant, le gène *MYCN* n'est sûrement pas le seul à pouvoir coopérer avec les mutations du gène *ALK* car certaines tumeurs humaines de NB expriment une mutation du gène *ALK* sans amplification de *MYCN*. Les événements génétiques supplémentaires, potentiellement capables de coopérer avec les mutations du gène *ALK*, ne sont pas encore identifiés.

Jusqu'à récemment, la coopération oncogénique entre la mutation ALK<sup>R1275Q</sup> et l'amplification de *MYCN* n'avait jamais été étudiée auparavant. Notre travail met en évidence pour la première fois cette coopération *in vivo*. Nous observons également que la mutation F1178L présente un pouvoir tumorigène et un effet développemental supérieur à la mutation R1279Q, ce qui est en accord avec les données obtenues *in vitro* décrivant la supériorité du potentiel oncogénique de la mutation ALK<sup>F1174L</sup> (Chen *et al.*, 2008).

Nous décrivons un effet d'activateur de la transcription des mutants *ALK* à la fois sur l'expression du gène *ALK* mais aussi sur l'expression de *MYCN*. Or le niveau d'expression de *MYCN* est un facteur important au regard de ses propriétés tumorigènes. En effet, le groupe de J. Schulte a réalisé une lignée de souris transgéniques surexprimant le gène *MYCN* humain sous le contrôle du promoteur CAG. *MYCN* y est plus fortement exprimé que dans le modèle TH-*MYCN* ce qui permet de générer des tumeurs de NB avec une incidence plus forte (Schulte J., présentation orale, ANR 2012). Ainsi la surexpression du gène *MYCN* induite par les mutations du gène *ALK* dans les tumeurs des souris *MYCN/Alk* suggère qu'au moins une partie de l'effet tumorigène du gène *ALK* muté soit dû à l'augmentation de la transcription de *MYCN* dans les NB murins.

L'équipe de J. Schulte a aussi développé une souris transgénique *ALK* (pActin - *ALK*<sup>F1174L</sup>/TH-IRES-Cre) qui génère des NB avec une pénétrance incomplète et un temps de latence très important (130 à 351 jours) (Heukamp et al., 2012). Ceci qui indique qu'un deuxième évènement génétique est nécessaire pour générer des NB. La plupart de ces tumeurs ne présentent pas d'amplifications secondaires de *MYCN* ce qui indique que l'évènement génétique coopérant avec la mutation *ALK*<sup>F1174L</sup> n'est pas systématiquement l'amplification de *MYCN*. Cette situation est en accord avec ce qui est observé chez l'humain où certaines tumeurs présentent une mutation du gène *ALK* sans amplification de *MYCN*.

L'absence de tumorigenèse spontanée chez nos modèles KI est identique à la situation observée chez les souris TH-*ALK*<sup>F1174L</sup> développées par l'équipe de R.A. Georges (Berry et al., 2012). Le niveau d'expression de la mutation peut expliquer cette différence du potentiel tumorigène entre les modèles. Il serait donc intéressant de comparer les niveaux d'expression du gène *ALK* des différentes souris. Cela permettrait de déterminer si la tumorigenèse spontanée des souris pActin-*ALK*<sup>F1174L</sup> est la conséquence d'un niveau d'expression supérieur aux autres modèles.

## 9. Caractéristiques des tumeurs murines *MYCN/Alk*

Les NB générés chez les souris *MYCN/KI Alk* présentent des propriétés non décrites précédemment. Les critères anatomopathologiques de la classification de Shimada, utilisés pour classer les NB humains en fonction de leur composition cellulaire et de leur état de différenciation, ont été utilisés pour analyser les tumeurs de souris (Shimada et al., 1999). En collaboration avec le Pr. Peuchmaur, nous avons ainsi pu montrer que les NB générés chez les

souris MYCN sont indifférenciés et adrénrgiques, alors que les tumeurs générées chez les souris MYCN/Alk sont classées en NB peu différenciés ou différenciant. De plus, ces tumeurs expriment à la fois des marqueurs adrénrgiques et cholinergiques. Ces propriétés de différenciation et de cholinergicité semblent étroitement liées. D'une part, les IHC réalisées sur les tumeurs MYCN/Alk montrent que seules les populations de cellules différenciées expriment VIP et VACHT, deux marqueurs de propriétés cholinergiques (cf. figure 21). D'autre part, ces propriétés des NB murins MYCN/Alk correspondent à celles de certains NB humains, décrits comme présentant des signes de différenciation et exprimant des marqueurs cholinergiques (Bourdeaut et al., 2009) (cf. figure 22).

## 10. Le gène *RET*, une cible du récepteur ALK activé

### 10.1. Cible dans le développement du SNS

Le gène *RET* (Rearranged During Transfection) apparaît particulièrement intéressant. Ce gène code pour un RTK activé par des cytokines appartenant à la famille des facteurs neurotrophes dérivés de la glie (ou GDNF pour Glial-Derived Neurotrophic Factors). Cette famille comprend le GDNF, la Neurturine, l'Artémine et la Perséphine. L'activation du récepteur RET nécessite la formation d'un complexe avec le ligand et un co-récepteur de la famille GFR $\alpha$  (GDNF-family receptor- $\alpha$ ) lié à la membrane plasmique par une ancre GPI (GlycosylPhosphatidyInositol) (cf. figure 23). RET est un RTK dont les fonctions sont notamment de réguler la migration neuronale, la croissance des axones et la formation des synapses au niveau du SNS. Ce gène contrôle les propriétés cholinergiques des neuroblastes du SNS (Bureau et al., 2004). Les souris *Ret*<sup>-/-</sup> présentent une atrophie et une mauvaise localisation des structures ganglionnaires du SNS (Enomoto et al., 2001). Ces souris meurent peu de temps après la naissance et présentent aussi des défauts de développement des reins et du système nerveux entérique (Schuchardt et al., 1994). Enfin, les souris KO *Gdnf* ou *Gfra1* présentent aussi des anomalies de formation du rein et du système nerveux entérique (Enomoto et al., 1998; Sánchez et al., 1996). Les souris KO pour *Gfra3* présentent une réduction de la taille ou une absence totale du ganglion supérieur cervical, relai ganglionnaire du SNS (Nishino et al., 1999). Le récepteur RET et sa signalisation jouent donc un rôle majeur dans le développement du tissu sympathique.

Chez les KI *Alk* homozygotes, les ganglions sont plus gros et prolifèrent plus que chez les animaux hétérozygotes. L'analyse transcriptomique indique que le niveau d'expression du

gène *Ret* est plus important chez les souris homozygotes que chez les hétérozygotes, qui ont elles-mêmes un niveau d'expression supérieur à celui des souris sauvage (cf. figure 24). Ces informations suggèrent que le gène *Ret* est une cible des mutations du gène *Alk* dans les ganglions sympathiques et que la surexpression du gène *Ret* peut avoir un rôle dans l'hyperplasie ganglionnaire des souris KI *Alk*.

L'hyperplasie du SNS est déjà présente à E12.5, ce qui indique que les mutations du gène *Alk* ont un effet très précoce. Cet effet pourrait consister à augmenter le nombre de précurseurs sympathiques ou à favoriser leur prolifération. Cependant, la mesure de la prolifération des neuroblastes à E12.5 n'a pas permis de mettre en évidence de prolifération accrue dans les ganglions de souris KI *Alk*. En effet, à cette période de développement, le niveau de prolifération cellulaire est physiologiquement très élevé. L'évaluation de la situation à E10 devra être faite car elle peut apporter des précisions quant au rôle précoce de *Alk*, au moment de la mise en place des ganglions.

La proportion de neuroblastes sympathiques *Ret*<sup>+</sup> jusqu'au 14<sup>ème</sup> jour du développement embryonnaire est très importante dans les ganglions sympathiques de souris. Puis cette proportion chute et se maintient à environ 20% après le 15<sup>ème</sup> jour de développement (cf. figure 25) (Furlan et al., 2013). Or, à la naissance, le gène *Ret* est plus fortement exprimé chez les KI *Alk*. Les mutations de *Alk* pourraient donc agir en prolongeant l'expression du récepteur *Ret* dans les neuroblastes. Ce phénomène conduirait à conserver des propriétés cholinergiques au sein des ganglions et pourrait expliquer les propriétés cholinergiques et adrénergiques des NB chez les animaux MYCN/KI *Alk*.

Afin de déterminer si le gène *Ret* est une cible indispensable à la mise en place de l'hyperplasie sympathique induite par les mutations du gène *Alk*, des croisements entre les souris KI *Alk* et les souris *Ret*<sup>-/-</sup> seront réalisés. Et afin de déterminer si la double propriété adrénergique/cholinergique des tumeurs est la conséquence d'un effet développemental du gène *Alk* muté dans la différenciation neuronale, le profil d'expression spatio-temporel de gènes développementaux dans le tissu sympathique des souris KI *Alk* devra être réalisé. Un intérêt particulier devra être porté aux gènes *Ret*, *Trkc*, *Hmx1* et *Phox2b*, ayant un rôle majeur dans la différenciation sympathique.

## 10.2. RET comme cible de ALK dans le cancer

Les résultats de ce projet montrent que le gène *RET* est une cible du récepteur ALK activé dans le NB. Des mutations ponctuelles activatrices somatiques et germinales de ce gène ont

été identifiées dans des cancers médullaires de la thyroïde, glande endocrine dont une partie des cellules sont dérivées des CN, ainsi que des néoplasies endocrines multiples de type 2b associant souvent des phéochromocytomes (cancers de la médullosurrénale) (Phay and Shah, 2010). Ce spectre de pathologies est en accord avec le rôle du gène *RET* dans le développement du SNS.

L'activation constitutive du récepteur RET se produit aussi via des réarrangements chromosomiques conduisant à l'expression de protéines de fusion. Ce mécanisme a été décrit dans les cancers papillaires de la thyroïde (CCDC6-RET et NCOA4-RET) (Nikiforov and Nikiforova, 2011), dans des adénocarcinomes du poumon (CCDC6-RET et KIF5B-RET) (Ju et al., 2012; Kohno et al., 2012; Takeuchi et al., 2012) et dans des cancers du poumon à petites cellules (CCDC6-RET, KIF5B-RET et NCOA4-RET) (Wang et al., 2012). Des altérations du gène *ALK* ont aussi été identifiées dans ces cancers (cf. chapitre 2.6.2), ainsi les gènes *RET* et *ALK* partagent des propriétés oncogéniques dans des cancers communs. Le gène *RET* pourrait donc être aussi une cible de ALK activé dans les cancers exprimant une protéine fusion X-ALK. Si tel est le cas, l'inhibition de RET pourrait être envisagée afin de pallier à la résistance au crizotinib observée chez des patients atteints de cancers du poumon à petites cellules et de tumeurs myofibroblastiques inflammatoires.

Afin de déterminer si RET est un gène clé de la signalisation de la protéine ALK dans le NB, des expériences fonctionnelles devront être réalisées. Il s'agira de déterminer si l'inhibition de la protéine ou de la synthèse protéique de RET conduit à une diminution de la prolifération neuroblastique *in vivo* et *in vitro*.

## 11. Etude préclinique des inhibiteurs moléculaires du récepteur ALK

### 11.1. Le NVP-TAE684

Une autre différence importante entre les différents modèles concerne la réponse au traitement par un inhibiteur moléculaire du récepteur ALK, le NVP-TAE684. Le traitement des souris pActin-ALK<sup>F1174L</sup> par cet inhibiteur induit une régression totale des tumeurs après 14 jours de traitement. Les tumeurs des souris TH-MYCN/pActin-ALK<sup>F1174L</sup> sont elles aussi sensibles au NVP-TAE684, après 14 jours de traitement les tumeurs ont fortement régressées mais demeurent visibles. Cette approche thérapeutique n'a pas produit de régression tumorale chez nos modèles KI, même pour des doses d'inhibiteur trois fois plus fortes (résultats non publiés).

Les souris transgéniques expriment le ADNc muté humain de *ALK* alors que les modèles KI expriment la version murine de la mutation. Une moindre sensibilité du récepteur  $ALK^{F1178L}$  murin au TAE684 pourrait être responsable d'un échec thérapeutique chez les souris KI bien que le domaine tyrosine kinase soit très conservé entre les 2 espèces. Afin de répondre à cette hypothèse, des tests de sensibilités *in vitro* au TAE684 sur des modèles cellulaires exprimant soit  $ALK^{F1174L}$  humain soit  $ALK^{F1178L}$  murin vont être réalisés. Le niveau d'expression de *ALK* chez les souris pActin- $ALK^{F1174L}$  est très différent d'une lignée de souris à l'autre or ce niveau d'expression n'est pas renseigné concernant les souris traitées. Une différence de niveau d'expression de la mutation entre les modèles pourrait donc aussi expliquer cette différence de sensibilité. Obtenir un modèle dont le niveau d'expression du gène étudié est reflète la situation observée chez le patient est important afin d'évaluer correctement l'efficacité d'un traitement ciblé. Les modèles murins KI offrent donc une plateforme d'étude biologique et clinique idéale.

#### 11.2. Le crizotinib

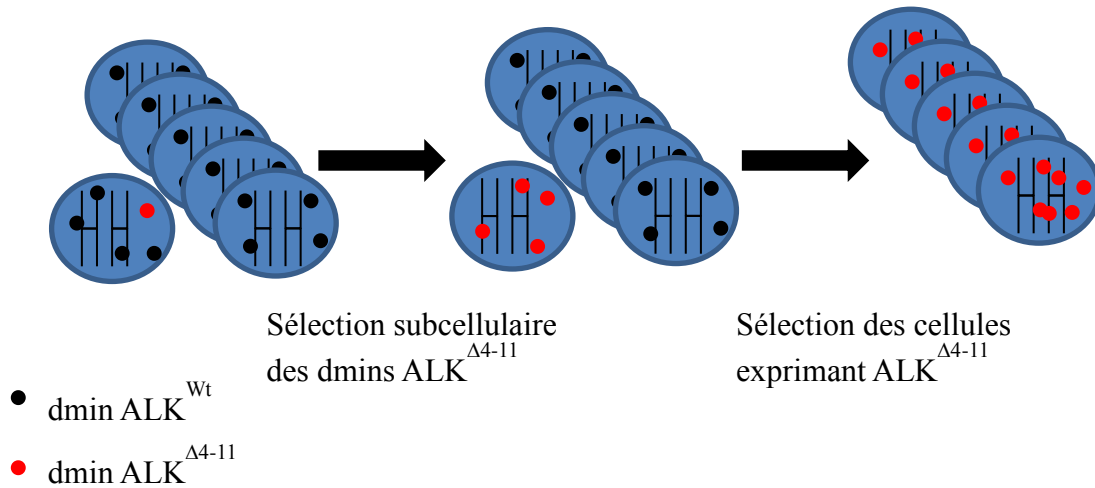
Les souris TH- $ALK^{F1174L}$  du groupe de R.A. Georges ont été soumises à un traitement de 100mg/kg/jour de crizotinib pendant 7 jours. Les souris traitées présentent une réduction de la phosphorylation du récepteur *ALK* dans la tumeur, mais la réduction du volume tumoral dans cette étude n'est pas significative. Cette expérience récapitule donc la résistance de la mutation F1174L au crizotinib.

Compte-tenu de ces informations, nous n'avons pas traité les souris KI  $ALK^{F1178L}$  avec du crizotinib. Cependant, les lignées cellulaires de NB exprimant la mutation R1275Q s'avèrent être sensibles à cet inhibiteur (Bresler et al., 2011). Nous avons donc traité les KI  $ALK^{R1279Q}$  avec 100mg/kg/jour de crizotinib. Après 10 jours de traitement, nous avons observé une régression significative de la taille des tumeurs abdominales. Nos données montrent également que ce traitement réduit la fréquence de tumeurs multifocales par rapport aux souris contrôles. D'un point de vue histologique, les tumeurs traitées ne semblent pas différer des tumeurs contrôles, ce qui reste à confirmer compte tenu du faible nombre de tumeurs analysées jusqu'à présent. L'inhibition de la mutation R1279Q ne semble pas induire une apoptose ou une nécrose accrue. N'ayant pas observé de régression complète des NB, on peut donc penser que le crizotinib inhibe la prolifération des neuroblastes empêchant le développement des tumeurs. L'évaluation de la prolifération neuroblastique sur des tumeurs à différents temps de traitement sera réalisée.

En conclusion, plusieurs aspects portant sur le rôle du gène *ALK* dans l'oncogenèse du NB auront été traités lors de cette thèse. Des informations ont été apportées concernant la régulation de la localisation, de l'activation et de la dégradation des récepteurs mutés au sein de la cellule tumorale. De plus, la caractérisation des réarrangements chromosomiques touchant le gène *ALK* dans le NB aura notamment mis en évidence un nouveau mécanisme d'activation constitutive, conférant des propriétés oncogéniques au récepteur. Enfin, l'analyse des souris KI pour des mutations ponctuelles du gène *Alk* aura mis en évidence un rôle majeur de ce gène lors du développement du SNS. Cette étude aura aussi permis de démontrer la coopération oncogénique *in vivo* des deux principales mutations du gène *Alk* avec l'amplification du gène *MYCN*. L'analyse des NB murins aura mis évidence les caractéristiques conférées par ces mutations, ainsi que les cibles du récepteur ALK activé.

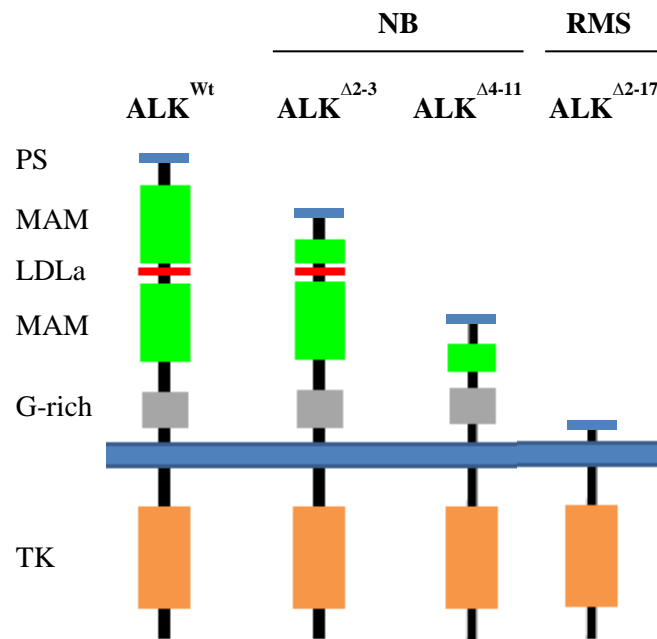
## Tumeur au diagnostic

## Tumeur à la rechute



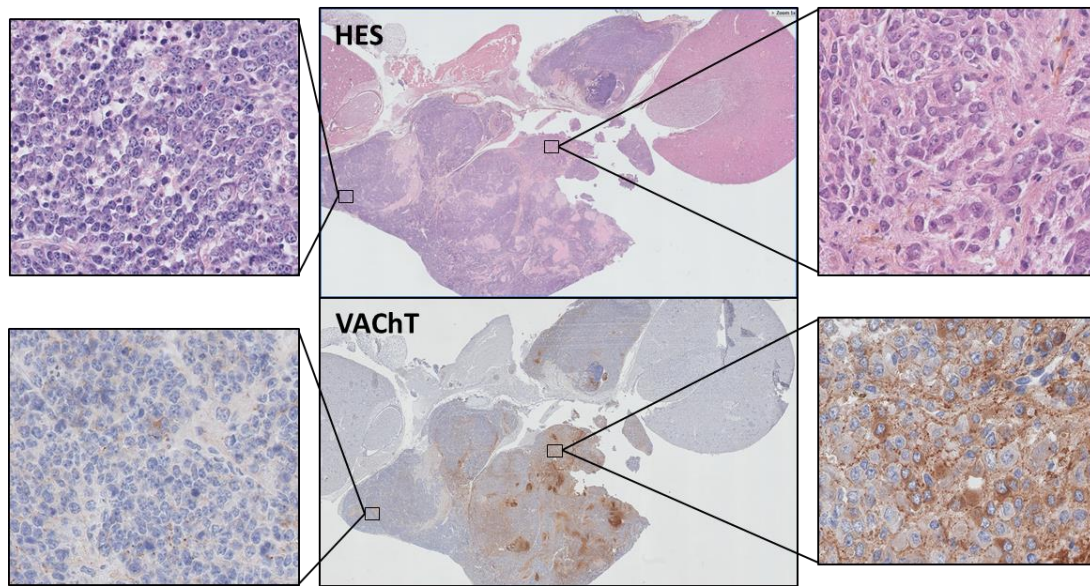
**Figure 19 : Hypothèse d'une double sélection du variant ALK<sup>Δ4-11</sup>.** Le réarrangement chromosomique conduisant à l'expression du variant ALK<sup>Δ4-11</sup> n'est pas détecté dans la tumeur au diagnostic. Dans la tumeur à la rechute, ce réarrangement est non seulement amplifié mais il est aussi présent dans la plupart des cellules de la tumeur. L'hypothèse principale permettant d'expliquer cette différence entre le diagnostic et la rechute est la suivante : le réarrangement a dû se produire dans une cellule de la tumeur au diagnostic. Cette cellule a ensuite amplifié ce type de dmin en éliminant progressivement les dmins contenant un gène ALK non réarrangé. Enfin, l'expression forte de ce variant protéique du récepteur ALK a conféré un avantage sélectif à cette cellule qui a donné naissance à la population majoritaire de la tumeur à la rechute.



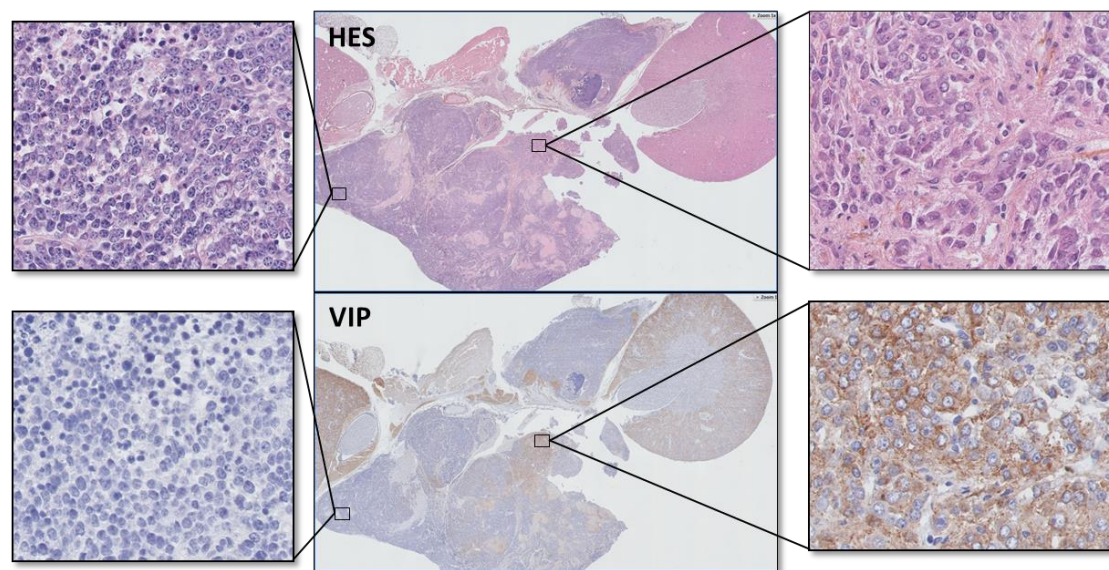


**Figure 20: Structure des variants protéiques du récepteur ALK.** Différentes parties du domaine extracellulaire du récepteur ALK sont délétées dans les variants identifiés dans le NB. Dans un cas de rhabdomyosarcome (RMS), le variant messenger identifié doit conduire à l'expression d'une protéine ALK ayant perdue la majorité de son domaine extracellulaire. PS: peptide signal, TK: domaine tyrosine kinase, G-rich: domaine riche en glycine

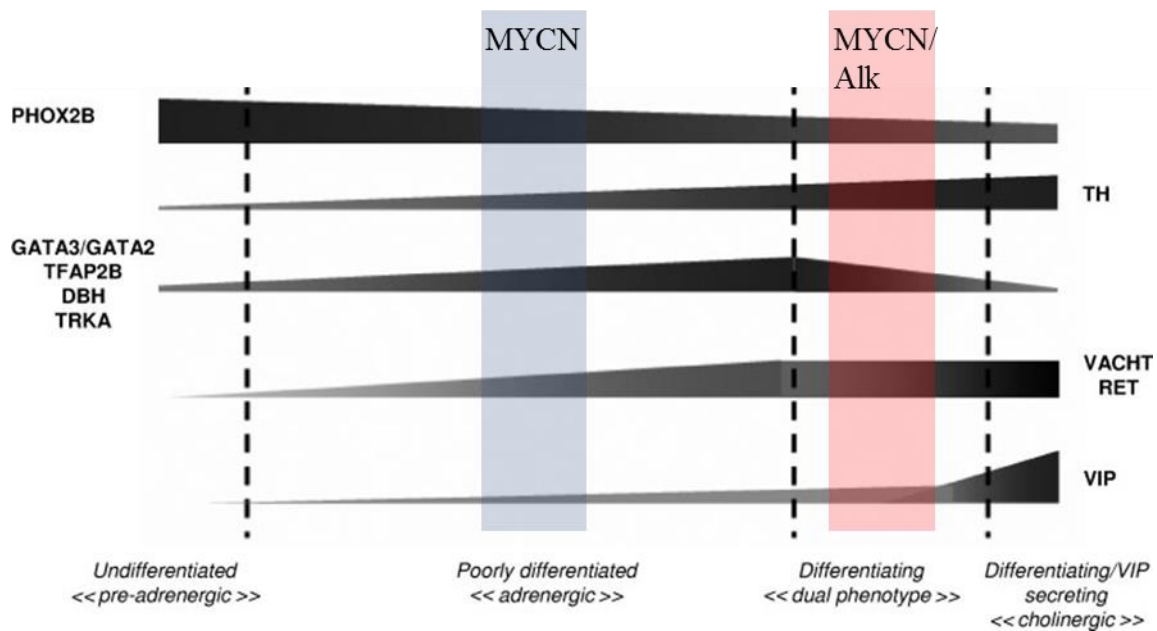
**A**



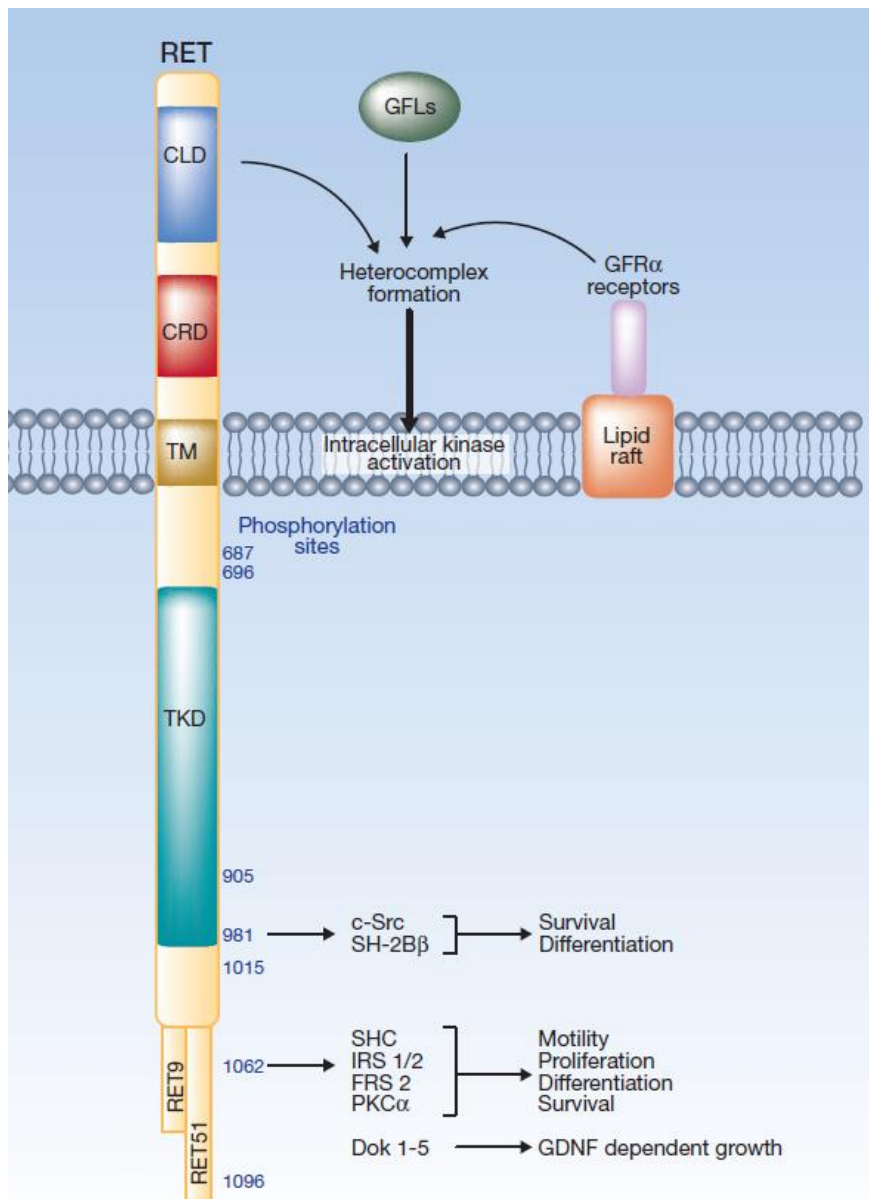
**B**



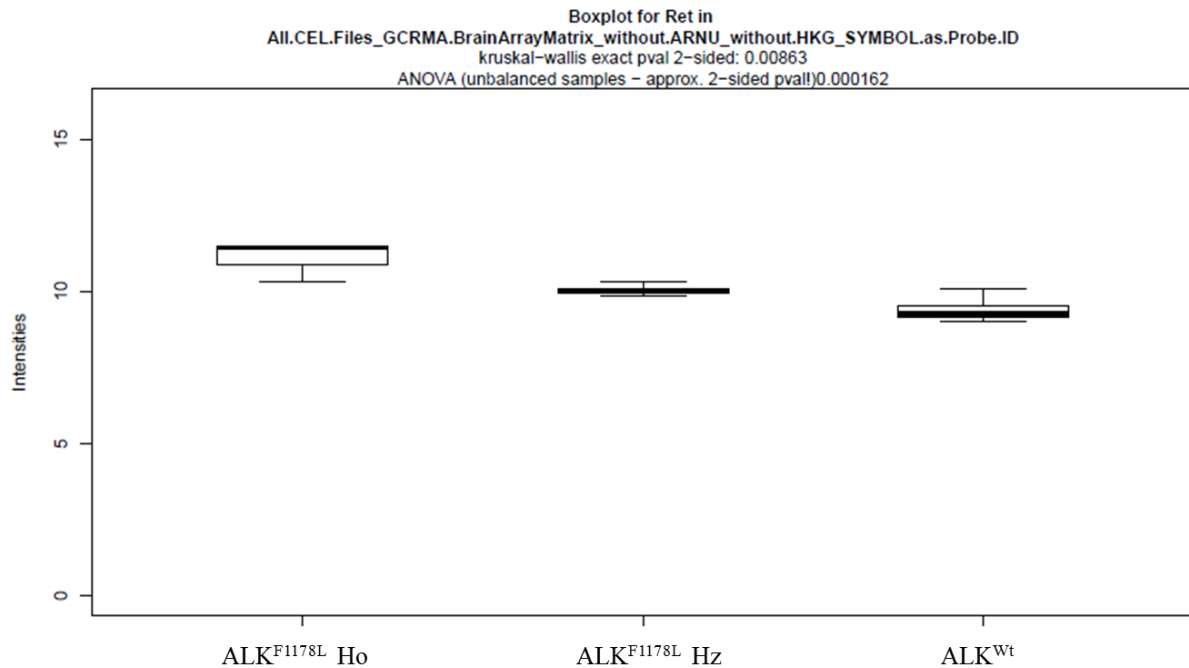
**Figure 21: Les régions tumorales différenciées expriment des marqueurs de propriétés cholinergiques.** Les immunohistochimies (panneaux du bas) contre les protéines VAcHT (A) et VIP (B) indiquent que seules les régions tumorales différenciées expriment ces protéines. L'état de différenciation peut être observé sur les photos des mêmes régions colorées par HES (panneaux du haut).



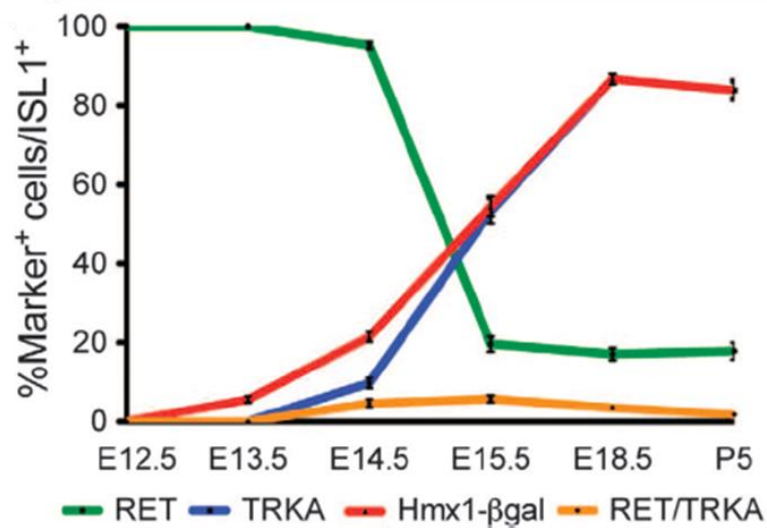
**Figure 22: Classification moléculaire et histologique des NB.** Les tumeurs humaines peuvent être placées sur ce schéma en fonction de l'expression d'un groupe de marqueurs des propriétés adrénergiques ou cholinergiques. Ce schéma va du NB indifférencié, pré-adrénergique, jusqu'au NB différenciant totalement cholinergique. En se basant sur ces critères, les tumeurs murines peuvent être approximativement placées. Les tumeurs MYCN occupent le centre du graphique, dédié aux tumeurs adrénergiques, n'exprimant pas RET ou VACHT mais exprimant TH. Tandis que les tumeurs MYCN/Alk occupent la droite du graphique, ces tumeurs expriment les marqueurs adrénergiques et cholinergiques, elles ont donc le « double phénotype » (Bourdeaut et al. J Pathol, 2009).



**Figure 23 : Activation et phosphorylation du récepteur RET.** Le récepteur RET va être activé suite à la formation d'un complexe avec un ligand de la famille GFL (Glial-Derived Neurotrophic Factors) et un co-récepteur de la famille GFRα (GDNF-family receptor-α). A la suite de la multimérisation du récepteur, les sites aux positions indiquées vont être phosphorylés. Les voies de signalisation activées sont impliquées dans la survie, le différenciation, la prolifération et la motilité cellulaire (adapté de Phay et al., Clin. Can. Res., 2010).



**Figure 24 :** Le gène *Ret* est plus exprimé dans ganglions sympathiques de souris KI Alk. L'analyse transcriptomique des ganglions sympathiques à la naissance indique que le gène *Ret* est plus exprimé chez les animaux exprimant une mutation  $Alk^{F1178L}$ . Le niveau d'expression de *Ret* est dépendant du nombre de copies mutées du gène *Alk*. Le graphique indique les valeurs d'expression en log2.



**Figure 25 :** Expression des gènes *Ret*, *Trka* et *Hmx1* au cours du développement sympathique chez la souris. Le pourcentage de neurones sympathiques exprimant *Ret* diminue considérablement à partir de E15. Les gènes *Trka* et *Hmx1* ont un profil d'expression développemental opposé à celui de *Ret* (Furlan et al., EMBO J., 2013).

## BIBLIOGRAPHIE

- Amiel, J., Laudier, B., Attie-Bitach, T., Trang, H., De Pontual, L., Gener, B., Trochet, D., Etchevers, H., Ray, P., Simonneau, M., et al. (2003). Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome. *Nat Genet* 33, 459–461.
- Amin, H.M., and Lai, R. (2007). Pathobiology of ALK+ anaplastic large-cell lymphoma. *Blood* 110, 2259–2267.
- D' Andon, A., Pein, F., Valteau-Couanet, D., and Hartmann, O. (2004). Le neuroblastome.
- Aoki, Y., Niihori, T., Kawame, H., Kurosawa, K., Ohashi, H., Tanaka, Y., Filocamo, M., Kato, K., Suzuki, Y., Kure, S., et al. (2005). Germline mutations in HRAS proto-oncogene cause Costello syndrome. *Nat. Genet.* 37, 1038–1040.
- Attiyeh, E.F., London, W.B., Mosse, Y.P., Wang, Q., Winter, C., Khazi, D., McGrady, P.W., Seeger, R.C., Look, A.T., Shimada, H., et al. (2005). Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. *N Engl J Med* 353, 2243–2253.
- Bai, R.Y., Dieter, P., Peschel, C., Morris, S.W., and Duyster, J. (1998). Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase of large-cell anaplastic lymphoma is a constitutively active tyrosine kinase that utilizes phospholipase C-gamma to mediate its mitogenicity. *Mol. Cell. Biol.* 18, 6951–6961.
- Bai, R.Y., Ouyang, T., Miething, C., Morris, S.W., Peschel, C., and Duyster, J. (2000). Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase associated with anaplastic large-cell lymphoma activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt antiapoptotic signaling pathway. *Blood* 96, 4319–4327.
- Bazigou, E., Apitz, H., Johansson, J., Lorén, C.E., Hirst, E.M.A., Chen, P.-L., Palmer, R.H., and Salecker, I. (2007). Anterograde Jelly belly and Alk receptor tyrosine kinase signaling mediates retinal axon targeting in *Drosophila*. *Cell* 128, 961–975.
- Berry, T., Luther, W., Bhatnagar, N., Jamin, Y., Poon, E., Sanda, T., Pei, D., Sharma, B., Vetharoy, W.R., Hallsworth, A., et al. (2012). The ALK(F1174L) mutation potentiates the oncogenic activity of MYCN in neuroblastoma. *Cancer Cell* 22, 117–130.
- Bilsland, J.G., Wheeldon, A., Mead, A., Znamenskiy, P., Almond, S., Waters, K.A., Thakur, M., Beaumont, V., Bonnert, T.P., Heavens, R., et al. (2008). Behavioral and neurochemical alterations in mice deficient in anaplastic lymphoma kinase suggest therapeutic potential for psychiatric indications. *Neuropsychopharmacology* 33, 685–700.
- Van Bokhoven, H., Celli, J., Van Reeuwijk, J., Rinne, T., Glaudemans, B., Van Beusekom, E., Rieu, P., Newbury-Ecob, R.A., Chiang, C., and Brunner, H.G. (2005). MYCN haploinsufficiency is associated with reduced brain size and intestinal atresias in Feingold syndrome. *Nature Genetics* 37, 465–467.
- Bossi, R.T., Saccardo, M.B., Ardini, E., Menichincheri, M., Rusconi, L., Magnaghi, P., Orsini, P., Avanzi, N., Borgia, A.L., Nesi, M., et al. (2010). Crystal structures of anaplastic lymphoma kinase in complex with ATP competitive inhibitors. *Biochemistry* 49, 6813–6825.
- Bourdeaut, F., Janoueix-Lerosey, I., Lucchesi, C., Paris, R., Ribeiro, A., De Pontual, L., Amiel, J., Lyonnet, S., Pierron, G., Michon, J., et al. (2009). Cholinergic switch associated with morphological differentiation in neuroblastoma. *The Journal of Pathology* 219, 463–472.



- Boutterin, M.C., Mazot, P., Faure, C., Doly, S., Gervasi, N., Tremblay, M.L., and Vigny, M. (2013). Control of ALK (wild type and mutated forms) phosphorylation: Specific role of the phosphatase PTP1B. *Cell. Signal.* 25, 1505–1513.
- Boyerinas, B., Park, S.-M., Hau, A., Murmann, A.E., and Peter, M.E. (2010). The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 17, F19–36.
- Bresler, S.C., Wood, A.C., Haglund, E.A., Courtright, J., Belcastro, L.T., Plegaria, J.S., Cole, K., Toporovskaya, Y., Zhao, H., Carpenter, E.L., et al. (2011). Differential inhibitor sensitivity of anaplastic lymphoma kinase variants found in neuroblastoma. *Sci Transl Med* 3, 108ra114.
- Brodeur, G.M. (2003). Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 3, 203–216.
- Brodeur, G.M., Seeger, R.C., Schwab, M., Varmus, H.E., and Bishop, J.M. (1984). Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 224, 1121–1124.
- Brodeur, G.M., Seeger, R.C., Barrett, A., Berthold, F., Castleberry, R.P., D'Angio, G., De Bernardi, B., Evans, A.E., Favrot, M., and Freeman, A.I. (1988). International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma. *J. Clin. Oncol.* 6, 1874–1881.
- Brodeur, G.M., Pritchard, J., Berthold, F., Carlsen, N.L., Castel, V., Castelberry, R.P., De Bernardi, B., Evans, A.E., Favrot, M., Hedborg, F., et al. (1993). Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol* 11, 1466–1477.
- De Brouwer, S., De Preter, K., Kumps, C., Zabrocki, P., Porcu, M., Westerhout, E.M., Lakeman, A., Vandesompele, J., Hoebeeck, J., Van Maerken, T., et al. (2010). Meta-analysis of neuroblastomas reveals a skewed ALK mutation spectrum in tumors with MYCN amplification. *Clin Cancer Res* 16, 4353–4362.
- Burau, K., Stenull, I., Huber, K., Misawa, H., Berse, B., Unsicker, K., and Ernsberger, U. (2004). c-ret regulates cholinergic properties in mouse sympathetic neurons: evidence from mutant mice. *Eur. J. Neurosci.* 20, 353–362.
- Butrynski, J.E., D'Adamo, D.R., Hornick, J.L., Dal Cin, P., Antonescu, C.R., Jhanwar, S.C., Ladanyi, M., Capelletti, M., Rodig, S.J., Ramaiya, N., et al. (2010). Crizotinib in ALK-rearranged inflammatory myofibroblastic tumor. *N. Engl. J. Med.* 363, 1727–1733.
- Capasso, M., Devoto, M., Hou, C., Asgharzadeh, S., Glessner, J.T., Attiyeh, E.F., Mosse, Y.P., Kim, C., Diskin, S.J., Cole, K.A., et al. (2009). Common variations in BARD1 influence susceptibility to high-risk neuroblastoma. *Nature Genetics* 41, 718–723.
- Caren, H., Abel, F., Kogner, P., and Martinsson, T. (2008). High incidence of DNA mutations and gene amplifications of the ALK gene in advanced sporadic neuroblastoma tumours. *The Biochemical Journal* 416, 153–159.
- Caron, H., Van Sluis, P., De Kraker, J., Bokkerink, J., Egeler, M., Laureys, G., Slater, R., Westerveld, A., Voute, P.A., and Versteeg, R. (1996). Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med* 334, 225–230.
- Carpenter, E.L., Haglund, E.A., Mace, E.M., Deng, D., Martinez, D., Wood, A.C., Chow, A.K., Weiser, D.A., Belcastro, L.T., Winter, C., et al. (2012). Antibody targeting of anaplastic lymphoma kinase induces cytotoxicity of human neuroblastoma. *Oncogene*.

- Chan, J.K.C., Lamant, L., Algar, E., Delsol, G., Tsang, W.Y.W., Lee, K.C., Tiedemann, K., and Chow, C.W. (2008). ALK+ histiocytosis: a novel type of systemic histiocytic proliferative disorder of early infancy. *Blood* 112, 2965–2968.
- Charron, J., Malynn, B.A., Fisher, P., Stewart, V., Jeannotte, L., Goff, S.P., Robertson, E.J., and Alt, F.W. (1992). Embryonic lethality in mice homozygous for a targeted disruption of the N-myc gene. *Genes Dev* 6, 2248–2257.
- Chen, Y., Takita, J., Choi, Y.L., Kato, M., Ohira, M., Sanada, M., Wang, L., Soda, M., Kikuchi, A., Igarashi, T., et al. (2008). Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature* 455, 971–974.
- Cheng, L.Y., Bailey, A.P., Leever, S.J., Ragan, T.J., Driscoll, P.C., and Gould, A.P. (2011). Anaplastic lymphoma kinase spares organ growth during nutrient restriction in *Drosophila*. *Cell* 146, 435–447.
- Chesler, L., Goldenberg, D.D., Seales, I.T., Satchi-Fainaro, R., Grimmer, M., Collins, R., Struett, C., Nguyen, K.N., Kim, G., Tihan, T., et al. (2007). Malignant progression and blockade of angiogenesis in a murine transgenic model of neuroblastoma. *Cancer Research* 67, 9435–9442.
- Chiarle, R., Gong, J.Z., Guasparri, I., Pesci, A., Cai, J., Liu, J., Simmons, W.J., Dhall, G., Howes, J., Piva, R., et al. (2003). NPM-ALK transgenic mice spontaneously develop T-cell lymphomas and plasma cell tumors. *Blood* 101, 1919–1927.
- Chiarle, R., Voena, C., Ambrogio, C., Piva, R., and Inghirami, G. (2008). The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nature Reviews* 8, 11–23.
- Choi, Y.L., Soda, M., Yamashita, Y., Ueno, T., Takashima, J., Nakajima, T., Yatabe, Y., Takeuchi, K., Hamada, T., Haruta, H., et al. (2010). EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. *N Engl J Med* 363, 1734–1739.
- Choudhary, C., Olsen, J.V., Brandts, C., Cox, J., Reddy, P.N.G., Böhmer, F.D., Gerke, V., Schmidt-Arras, D.-E., Berdel, W.E., Müller-Tidow, C., et al. (2009). Mislocalized activation of oncogenic RTKs switches downstream signaling outcomes. *Mol. Cell* 36, 326–339.
- Cohn, S.L., Pearson, A.D., London, W.B., Monclair, T., Ambros, P.F., Brodeur, G.M., Faldum, A., Hero, B., Iehara, T., Machin, D., et al. (2009). The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol* 27, 289–297.
- Colleoni, G.W., Bridge, J.A., Garicochea, B., Liu, J., Filippa, D.A., and Ladanyi, M. (2000). ATIC-ALK: A novel variant ALK gene fusion in anaplastic large cell lymphoma resulting from the recurrent cryptic chromosomal inversion, inv(2)(p23q35). *Am. J. Pathol.* 156, 781–789.
- Davies, G.C., Ryan, P.E., Rahman, L., Zajac-Kaye, M., and Lipkowitz, S. (2006). EGFRvIII undergoes activation-dependent downregulation mediated by the Cbl proteins. *Oncogene* 25, 6497–6509.
- Debelenko, L.V., Raimondi, S.C., Daw, N., Shivakumar, B.R., Huang, D., Nelson, M., and Bridge, J.A. (2011). Renal cell carcinoma with novel VCL-ALK fusion: new representative of ALK-associated tumor spectrum. *Mod. Pathol.* 24, 430–442.
- Degoutin, J., Brunet-de Carvalho, N., Cifuentes-Diaz, C., and Vigny, M. (2009). ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase) expression in DRG neurons and its involvement in neuron-Schwann cells interaction. *Eur. J. Neurosci.* 29, 275–286.



- Dias, P., Kumar, P., Marsden, H.B., Gattamaneni, H.R., Heighway, J., and Kumar, S. (1990). N-myc gene is amplified in alveolar rhabdomyosarcomas (RMS) but not in embryonal RMS. *Int. J. Cancer* *45*, 593–596.
- Dildrop, R., Ma, A., Zimmerman, K., Hsu, E., Tesfaye, A., DePinho, R., and Alt, F.W. (1989). IgH enhancer-mediated deregulation of N-myc gene expression in transgenic mice: generation of lymphoid neoplasias that lack c-myc expression. *EMBO J.* *8*, 1121–1128.
- Dirks, W.G., Fähnrich, S., Lis, Y., Becker, E., MacLeod, R.A.F., and Drexler, H.G. (2002). Expression and functional analysis of the anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene in tumor cell lines. *Int. J. Cancer* *100*, 49–56.
- Diskin, S.J., Hou, C., Glessner, J.T., Attiyeh, E.F., Laudenslager, M., Bosse, K., Cole, K., Mosse, Y.P., Wood, A., Lynch, J.E., et al. (2009). Copy number variation at 1q21.1 associated with neuroblastoma. *Nature* *459*, 987–991.
- Diskin, S.J., Capasso, M., Schnepf, R.W., Cole, K.A., Attiyeh, E.F., Hou, C., Diamond, M., Carpenter, E.L., Winter, C., Lee, H., et al. (2012). Common variation at 6q16 within HACE1 and LIN28B influences susceptibility to neuroblastoma. *Nat. Genet.* *44*, 1126–1130.
- Donella-Deana, A., Marin, O., Cesaro, L., Gunby, R.H., Ferrarese, A., Coluccia, A.M.L., Tartari, C.J., Mologni, L., Scapozza, L., Gambacorti-Passerini, C., et al. (2005). Unique substrate specificity of anaplastic lymphoma kinase (ALK): development of phosphoacceptor peptides for the assay of ALK activity. *Biochemistry* *44*, 8533–8542.
- Le Douarin, N.M. (1999). *The Neural Crest* 2nd edn.
- Englund, C., Lorén, C.E., Grabbe, C., Varshney, G.K., Deleuil, F., Hallberg, B., and Palmer, R.H. (2003). Jeb signals through the Alk receptor tyrosine kinase to drive visceral muscle fusion. *Nature* *425*, 512–516.
- Enomoto, H., Araki, T., Jackman, A., Heuckeroth, R.O., Snider, W.D., Johnson, E.M., Jr, and Milbrandt, J. (1998). GFR alpha1-deficient mice have deficits in the enteric nervous system and kidneys. *Neuron* *21*, 317–324.
- Enomoto, H., Crawford, P.A., Gorodinsky, A., Heuckeroth, R.O., Johnson, E.M., and Milbrandt, J. (2001). RET signaling is essential for migration, axonal growth and axon guidance of developing sympathetic neurons. *Development* *128*, 3963–3974.
- Fass, D., Blacklow, S., Kim, P.S., and Berger, J.M. (1997). Molecular basis of familial hypercholesterolaemia from structure of LDL receptor module. *Nature* *388*, 691–693.
- Fujimoto, A., Totoki, Y., Abe, T., Boroevich, K.A., Hosoda, F., Nguyen, H.H., Aoki, M., Hosono, N., Kubo, M., Miya, F., et al. (2012). Whole-genome sequencing of liver cancers identifies etiological influences on mutation patterns and recurrent mutations in chromatin regulators. *Nat. Genet.* *44*, 760–764.
- Fujimoto, J., Shiota, M., Iwahara, T., Seki, N., Satoh, H., Mori, S., and Yamamoto, T. (1996). Characterization of the transforming activity of p80, a hyperphosphorylated protein in a Ki-1 lymphoma cell line with chromosomal translocation t(2;5). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *93*, 4181–4186.
- Furlan, A., Lübke, M., Adameyko, I., Lallemand, F., and Ernfors, P. (2013). The transcription factor Hmx1 and growth factor receptor activities control sympathetic neurons diversification. *EMBO J.* *32*, 1613–1625.

- Van Gaal, J.C., Flucke, U.E., Roeffen, M.H.S., De Bont, E.S.J.M., Sleijfer, S., Mavinkurve-Groothuis, A.M.C., Suurmeijer, A.J.H., Van der Graaf, W.T.A., and Versleijen-Jonkers, Y.M.H. (2012). Anaplastic lymphoma kinase aberrations in rhabdomyosarcoma: clinical and prognostic implications. *J. Clin. Oncol.* *30*, 308–315.
- George, R.E., Sanda, T., Hanna, M., Frohling, S., Luther, W., Zhang, J., Ahn, Y., Zhou, W., London, W.B., McGrady, P., et al. (2008). Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature* *455*, 975–978.
- Gillett, C., Fantl, V., Smith, R., Fisher, C., Bartek, J., Dickson, C., Barnes, D., and Peters, G. (1994). Amplification and overexpression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining. *Cancer Res.* *54*, 1812–1817.
- Giuriato, S., Foisseau, M., Dejean, E., Felsher, D.W., Al Saati, T., Demur, C., Ragab, A., Kruczynski, A., Schiff, C., Delsol, G., et al. (2010). Conditional TPM3-ALK and NPM-ALK transgenic mice develop reversible ALK-positive early B-cell lymphoma/leukemia. *Blood* *115*, 4061–4070.
- Gouzi, J.Y., Moressis, A., Walker, J.A., Apostolopoulou, A.A., Palmer, R.H., Bernards, A., and Skoulakis, E.M.C. (2011). The receptor tyrosine kinase Alk controls neurofibromin functions in *Drosophila* growth and learning. *PLoS Genet.* *7*, e1002281.
- Grau, E., Martinez, F., Orellana, C., Canete, A., Yañez, Y., Oltra, S., Noguera, R., Hernandez, M., Bermúdez, J.D., and Castel, V. (2011). Hypermethylation of apoptotic genes as independent prognostic factor in neuroblastoma disease. *Mol. Carcinog.* *50*, 153–162.
- Griffin, C.A., Hawkins, A.L., Dvorak, C., Henkle, C., Ellingham, T., and Perlman, E.J. (1999). Recurrent involvement of 2p23 in inflammatory myofibroblastic tumors. *Cancer Research* *59*, 2776–2780.
- Guillemot, F., Lo, L.C., Johnson, J.E., Auerbach, A., Anderson, D.J., and Joyner, A.L. (1993). Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell* *75*, 463–476.
- Hatch, N.E., Hudson, M., Seto, M.L., Cunningham, M.L., and Bothwell, M. (2006). Intracellular retention, degradation, and signaling of glycosylation-deficient FGFR2 and craniosynostosis syndrome-associated FGFR2C278F. *J. Biol. Chem.* *281*, 27292–27305.
- Hendershot, T.J., Liu, H., Clouthier, D.E., Shepherd, I.T., Coppola, E., Studer, M., Firulli, A.B., Pittman, D.L., and Howard, M.J. (2008). Conditional deletion of Hand2 reveals critical functions in neurogenesis and cell type-specific gene expression for development of neural crest-derived noradrenergic sympathetic ganglion neurons. *Dev. Biol.* *319*, 179–191.
- Hernández, L., Pinyol, M., Hernández, S., Beà, S., Pulford, K., Rosenwald, A., Lamant, L., Falini, B., Ott, G., Mason, D.Y., et al. (1999). TRK-fused gene (TFG) is a new partner of ALK in anaplastic large cell lymphoma producing two structurally different TFG-ALK translocations. *Blood* *94*, 3265–3268.
- Heukamp, L.C., Thor, T., Schramm, A., De Preter, K., Kumps, C., De Wilde, B., Odersky, A., Peifer, M., Lindner, S., Spruessel, A., et al. (2012). Targeted Expression of Mutated ALK Induces Neuroblastoma in Transgenic Mice. *Sci Transl Med* *4*, 141ra91.
- Hölzel, M., Huang, S., Koster, J., Ora, I., Lakeman, A., Caron, H., Nijkamp, W., Xie, J., Callens, T., Asgharzadeh, S., et al. (2010). NF1 is a tumor suppressor in neuroblastoma that determines retinoic acid response and disease outcome. *Cell* *142*, 218–229.

- Howard, M.J., Stanke, M., Schneider, C., Wu, X., and Rohrer, H. (2000). The transcription factor dHAND is a downstream effector of BMPs in sympathetic neuron specification. *Development* 127, 4073–4081.
- Hui, A.B., Lo, K.W., Yin, X.L., Poon, W.S., and Ng, H.K. (2001). Detection of multiple gene amplifications in glioblastoma multiforme using array-based comparative genomic hybridization. *Lab. Invest.* 81, 717–723.
- Hurley, S.P., Clary, D.O., Copie, V., and Lefcort, F. (2006). Anaplastic lymphoma kinase is dynamically expressed on subsets of motor neurons and in the peripheral nervous system. *J. Comp. Neurol.* 495, 202–212.
- International Schizophrenia Consortium (2008). Rare chromosomal deletions and duplications increase risk of schizophrenia. *Nature* 455, 237–241.
- Ishihara, T., Iino, Y., Mohri, A., Mori, I., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., and Katsura, I. (2002). HEN-1, a secretory protein with an LDL receptor motif, regulates sensory integration and learning in *Caenorhabditis elegans*. *Cell* 109, 639–649.
- Janoueix-Lerosey, I., Lequin, D., Brugieres, L., Ribeiro, A., De Pontual, L., Combaret, V., Raynal, V., Puisieux, A., Schleiermacher, G., Pierron, G., et al. (2008). Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature* 455, 967–970.
- Janoueix-Lerosey, I., Schleiermacher, G., Michels, E., Mosseri, V., Ribeiro, A., Lequin, D., Vermeulen, J., Couturier, J., Peuchmaur, M., Valent, A., et al. (2009). Overall genomic pattern is a predictor of outcome in neuroblastoma. *J Clin Oncol* 27, 1026–1033.
- Janoueix-Lerosey, I., Schleiermacher, G., and Delattre, O. (2010). Molecular pathogenesis of peripheral neuroblastic tumors. *Oncogene* 29, 1566–1579.
- Jazii, F.-R., Najafi, Z., Malekzadeh, R., Conrads, T.-P., Ziaee, A.-A., Abnet, C., Yazdznbod, M., Karkhane, A.-A., and Salekdeh, G.-H. (2006). Identification of squamous cell carcinoma associated proteins by proteomics and loss of beta tropomyosin expression in esophageal cancer. *World J. Gastroenterol.* 12, 7104–7112.
- Jiang, M., Stanke, J., and Lahti, J.M. (2011). The connections between neural crest development and neuroblastoma. *Curr. Top. Dev. Biol.* 94, 77–127.
- Jones, D.T.W., Jäger, N., Kool, M., Zichner, T., Hutter, B., Sultan, M., Cho, Y.-J., Pugh, T.J., Hovestadt, V., Stütz, A.M., et al. (2012). Dissecting the genomic complexity underlying medulloblastoma. *Nature* 488, 100–105.
- Jones, S., Wang, T.-L., Shih, I.-M., Mao, T.-L., Nakayama, K., Roden, R., Glas, R., Slamon, D., Diaz, L.A., Jr, Vogelstein, B., et al. (2010). Frequent mutations of chromatin remodeling gene ARID1A in ovarian clear cell carcinoma. *Science* 330, 228–231.
- Ju, Y.S., Lee, W.-C., Shin, J.-Y., Lee, S., Bleazard, T., Won, J.-K., Kim, Y.T., Kim, J.-I., Kang, J.-H., and Seo, J.-S. (2012). A transforming KIF5B and RET gene fusion in lung adenocarcinoma revealed from whole-genome and transcriptome sequencing. *Genome Res.* 22, 436–445.
- Kasemeier-Kulesa, J.C., McLennan, R., Romine, M.H., Kulesa, P.M., and Lefcort, F. (2010). CXCR4 controls ventral migration of sympathetic precursor cells. *J. Neurosci.* 30, 13078–13088.
- Kjaer, S., and Ibáñez, C.F. (2003). Intrinsic susceptibility to misfolding of a hot-spot for Hirschsprung disease mutations in the ectodomain of RET. *Hum. Mol. Genet.* 12, 2133–2144.

- Knudson, A.G. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68, 820–823.
- Knudson, A.G., Jr, and Strong, L.C. (1972). Mutation and cancer: neuroblastoma and pheochromocytoma. *Am. J. Hum. Genet.* 24, 514–532.
- Kohl, N.E., Kanda, N., Schreck, R.R., Bruns, G., Latt, S.A., Gilbert, F., and Alt, F.W. (1983). Transposition and amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastomas. *Cell* 35, 359–367.
- Kohno, T., Ichikawa, H., Totoki, Y., Yasuda, K., Hiramoto, M., Nammo, T., Sakamoto, H., Tsuta, K., Furuta, K., Shimada, Y., et al. (2012). KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nat. Med.* 18, 375–377.
- Kwak, E.L., Bang, Y.J., Camidge, D.R., Shaw, A.T., Solomon, B., Maki, R.G., Ou, S.H., Dezube, B.J., Janne, P.A., Costa, D.B., et al. (2010). Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 363, 1693–1703.
- Ladenstein, R.L. (2011). Busulphan-melphalan is the superior myeloablative therapy (MAT) for high risk neuroblastoma: results from the HR-NBL1/SIOPEN trial. ASCO, Chicago, USA.
- Lamant, L., Pulford, K., Bischof, D., Morris, S.W., Mason, D.Y., Delsol, G., and Mariame, B. (2000). Expression of the ALK tyrosine kinase gene in neuroblastoma. *The American Journal of Pathology* 156, 1711–1721.
- Lee, C.C., Jia, Y., Li, N., Sun, X., Ng, K., Ambing, E., Gao, M.-Y., Hua, S., Chen, C., Kim, S., et al. (2010). Crystal structure of the ALK (anaplastic lymphoma kinase) catalytic domain. *Biochem. J.* 430, 425–437.
- Lee, H.-H., Norris, A., Weiss, J.B., and Frasch, M. (2003). Jelly belly protein activates the receptor tyrosine kinase Alk to specify visceral muscle pioneers. *Nature* 425, 507–512.
- Lee, P., Lee, D.-J., Chan, C., Chen, S.-W., Ch'en, I., and Jamora, C. (2009). Dynamic expression of epidermal caspase 8 simulates a wound healing response. *Nature* 458, 519–523.
- Lee, W.H., Murphree, A.L., and Benedict, W.F. (1984). Expression and amplification of the N-myc gene in primary retinoblastoma. *Nature* 309, 458–460.
- Lemmon, M.A., and Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 141, 1117–1134.
- Liao, E.H., Hung, W., Abrams, B., and Zhen, M. (2004). An SCF-like ubiquitin ligase complex that controls presynaptic differentiation. *Nature* 430, 345–350.
- Lievens, P.M.-J., Mutinelli, C., Baynes, D., and Liboi, E. (2004). The kinase activity of fibroblast growth factor receptor 3 with activation loop mutations affects receptor trafficking and signaling. *J. Biol. Chem.* 279, 43254–43260.
- Lin, E., Li, L., Guan, Y., Soriano, R., Rivers, C.S., Mohan, S., Pandita, A., Tang, J., and Modrusan, Z. (2009). Exon array profiling detects EML4-ALK fusion in breast, colorectal, and non-small cell lung cancers. *Mol. Cancer Res.* 7, 1466–1476.
- Longo, L., Panza, E., Schena, F., Seri, M., Devoto, M., Romeo, G., Bini, C., Pappalardo, G., Tonini, G.P., and Perri, P. (2007). Genetic predisposition to familial neuroblastoma: identification of two novel genomic regions at 2p and 12p. *Human Heredity* 63, 205–211.

- Lopes, S.S., Yang, X., Müller, J., Carney, T.J., McAdow, A.R., Rauch, G.-J., Jacoby, A.S., Hurst, L.D., Delfino-Machín, M., Haffter, P., et al. (2008). Leukocyte tyrosine kinase functions in pigment cell development. *PLoS Genet.* *4*, e1000026.
- Lorén, C.E., Englund, C., Grabbe, C., Hallberg, B., Hunter, T., and Palmer, R.H. (2003). A crucial role for the Anaplastic lymphoma kinase receptor tyrosine kinase in gut development in *Drosophila melanogaster*. *EMBO Rep.* *4*, 781–786.
- Marcelis, C.L., Hol, F.A., Graham, G.E., Rieu, P.N., Kellermayer, R., Meijer, R.P., Lugtenberg, D., Scheffer, H., Van Bokhoven, H., Brunner, H.G., et al. (2008). Genotype-phenotype correlations in MYCN-related Feingold syndrome. *Human Mutation* *29*, 1125–1132.
- Marín-Valencia, I., Serrano, M., Ormazabal, A., Pérez-Dueñas, B., García-Cazorla, A., Campistol, J., and Artuch, R. (2008). Biochemical diagnosis of dopaminergic disturbances in paediatric patients: analysis of cerebrospinal fluid homovanillic acid and other biogenic amines. *Clin. Biochem.* *41*, 1306–1315.
- Maris, J.M. (2010). Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med* *362*, 2202–2211.
- Maris, J.M., Kyemba, S.M., Rebbeck, T.R., White, P.S., Sulman, E.P., Jensen, S.J., Allen, C., Biegel, J.A., and Brodeur, G.M. (1997). Molecular genetic analysis of familial neuroblastoma. *Eur J Cancer* *33*, 1923–1928.
- Maris, J.M., Weiss, M.J., Mosse, Y., Hii, G., Guo, C., White, P.S., Hogarty, M.D., Mirensky, T., Brodeur, G.M., Rebbeck, T.R., et al. (2002). Evidence for a hereditary neuroblastoma predisposition locus at chromosome 16p12-13. *Cancer Research* *62*, 6651–6658.
- Maris, J.M., Hogarty, M.D., Bagatell, R., and Cohn, S.L. (2007). Neuroblastoma. *Lancet* *369*, 2106–2120.
- Martinsson, T., Eriksson, T., Abrahamsson, J., Caren, H., Hansson, M., Kogner, P., Kamaraj, S., Schönherr, C., Weinmar, J., Ruuth, K., et al. (2011). Appearance of the novel activating F1174S ALK mutation in neuroblastoma correlates with aggressive tumor progression and unresponsiveness to therapy. *Cancer Res.* *71*, 98–105.
- Mathivet, T., Mazot, P., and Vigny, M. (2007). In contrast to agonist monoclonal antibodies, both C-terminal truncated form and full length form of Pleiotrophin failed to activate vertebrate ALK (anaplastic lymphoma kinase)? *Cell. Signal.* *19*, 2434–2443.
- McDermott, U., Iafrate, A.J., Gray, N.S., Shioda, T., Classon, M., Maheswaran, S., Zhou, W., Choi, H.G., Smith, S.L., Dowell, L., et al. (2008). Genomic alterations of anaplastic lymphoma kinase may sensitize tumors to anaplastic lymphoma kinase inhibitors. *Cancer Research* *68*, 3389–3395.
- Meza-Zepeda, L.A., Forus, A., Lygren, B., Dahlberg, A.B., Godager, L.H., South, A.P., Marenholz, I., Lioumi, M., Flørenes, V.A., Maelandsmo, G.M., et al. (2002). Positional cloning identifies a novel cyclophilin as a candidate amplified oncogene in 1q21. *Oncogene* *21*, 2261–2269.
- Molenaar, J.J., Koster, J., Zwijnenburg, D.A., Van Sluis, P., Valentijn, L.J., Van der Ploeg, I., Hamdi, M., Van Nes, J., Westerman, B.A., Van Arkel, J., et al. (2012a). Sequencing of neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neuritogenesis genes. *Nature*.
- Molenaar, J.J., Domingo-Fernández, R., Ebus, M.E., Lindner, S., Koster, J., Drabek, K., Mestdagh, P., Van Sluis, P., Valentijn, L.J., Van Nes, J., et al. (2012b). LIN28B induces neuroblastoma and enhances MYCN levels via let-7 suppression. *Nat. Genet.* *44*, 1199–1206.

- Moog-Lutz, C., Degoutin, J., Gouzi, J.Y., Frobert, Y., Brunet-de Carvalho, N., Bureau, J., Creminon, C., and Vigny, M. (2005). Activation and inhibition of anaplastic lymphoma kinase receptor tyrosine kinase by monoclonal antibodies and absence of agonist activity of pleiotrophin. *The Journal of Biological Chemistry* 280, 26039–26048.
- Morris, S.W., Kirstein, M.N., Valentine, M.B., Dittmer, K.G., Shapiro, D.N., Saltman, D.L., and Look, A.T. (1994). Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science (New York, N.Y)* 263, 1281–1284.
- Morris, S.W., Naeve, C., Mathew, P., James, P.L., Kirstein, M.N., Cui, X., and Witte, D.P. (1997). ALK, the chromosome 2 gene locus altered by the t(2;5) in non-Hodgkin's lymphoma, encodes a novel neural receptor tyrosine kinase that is highly related to leukocyte tyrosine kinase (LTK). *Oncogene* 14, 2175–2188.
- Mosse, Y.P., Laudenslager, M., Longo, L., Cole, K.A., Wood, A., Attiyeh, E.F., Laquaglia, M.J., Sennett, R., Lynch, J.E., Perri, P., et al. (2008). Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature* 455, 930–935.
- Mossé, Y.P., Lim, M.S., Voss, S.D., Wilner, K., Ruffner, K., Laliberte, J., Rolland, D., Balis, F.M., Maris, J.M., Weigel, B.J., et al. (2013). Safety and activity of crizotinib for paediatric patients with refractory solid tumours or anaplastic large-cell lymphoma: a Children's Oncology Group phase 1 consortium study. *Lancet Oncol.* 14, 472–480.
- Motegi, A., Fujimoto, J., Kotani, M., Sakuraba, H., and Yamamoto, T. (2004). ALK receptor tyrosine kinase promotes cell growth and neurite outgrowth. *J. Cell. Sci.* 117, 3319–3329.
- Mourali, J., Benard, A., Lourenco, F.C., Monnet, C., Greenland, C., Moog-Lutz, C., Racaud-Sultan, C., Gonzalez-Dunia, D., Vigny, M., Mehlen, P., et al. (2006). Anaplastic lymphoma kinase is a dependence receptor whose proapoptotic functions are activated by caspase cleavage. *Molecular and Cellular Biology* 26, 6209–6222.
- Murugan, A.K., and Xing, M. (2011). Anaplastic thyroid cancers harbor novel oncogenic mutations of the ALK gene. *Cancer Res.* 71, 4403–4411.
- Musgrove, E.A., Caldon, C.E., Barraclough, J., Stone, A., and Sutherland, R.L. (2011). Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 11, 558–572.
- Nakamura, T., Iwamura, Y., Kaneko, M., Nakagawa, K., Kawai, K., Mitamura, K., Futagawa, T., and Hayashi, H. (1991). Deletions and rearrangements of the retinoblastoma gene in hepatocellular carcinoma, insulinoma and some neurogenic tumors as found in a study of 121 tumors. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 21, 325–329.
- Nau, M.M., Brooks, B.J., Jr, Carney, D.N., Gazdar, A.F., Battey, J.F., Sausville, E.A., and Minna, J.D. (1986). Human small-cell lung cancers show amplification and expression of the N-myc gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 1092–1096.
- Nguyen le, B., Diskin, S.J., Capasso, M., Wang, K., Diamond, M.A., Glessner, J., Kim, C., Attiyeh, E.F., Mosse, Y.P., Cole, K., et al. Phenotype restricted genome-wide association study using a gene-centric approach identifies three low-risk neuroblastoma susceptibility Loci. *PLoS Genet* 7, e1002026.
- Nikiforov, Y.E., and Nikiforova, M.N. (2011). Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol* 7, 569–580.
- Nisen, P.D., Zimmerman, K.A., Cotter, S.V., Gilbert, F., and Alt, F.W. (1986). Enhanced expression of the N-myc gene in Wilms' tumors. *Cancer Research* 46, 6217–6222.

- Nishino, J., Mochida, K., Ohfuji, Y., Shimazaki, T., Meno, C., Ohishi, S., Matsuda, Y., Fujii, H., Saijoh, Y., and Hamada, H. (1999). GFR alpha3, a component of the artemin receptor, is required for migration and survival of the superior cervical ganglion. *Neuron* 23, 725–736.
- Okubo, J., Takita, J., Chen, Y., Oki, K., Nishimura, R., Kato, M., Sanada, M., Hiwatari, M., Hayashi, Y., Igarashi, T., et al. (2012). Aberrant activation of ALK kinase by a novel truncated form ALK protein in neuroblastoma. *Oncogene*.
- Onciu, M., Behm, F.G., Downing, J.R., Shurtleff, S.A., Raimondi, S.C., Ma, Z., Morris, S.W., Kennedy, W., Jones, S.C., and Sandlund, J.T. (2003). ALK-positive plasmablastic B-cell lymphoma with expression of the NPM-ALK fusion transcript: report of 2 cases. *Blood* 102, 2642–2644.
- Passoni, L., Longo, L., Collini, P., Coluccia, A.M., Bozzi, F., Podda, M., Gregorio, A., Gambini, C., Garaventa, A., Pistoia, V., et al. (2009). Mutation-independent anaplastic lymphoma kinase overexpression in poor prognosis neuroblastoma patients. *Cancer Research* 69, 7338–7346.
- Pattyn, A., Morin, X., Cremer, H., Goridis, C., and Brunet, J.F. (1999). The homeobox gene *Phox2b* is essential for the development of autonomic neural crest derivatives. *Nature* 399, 366–370.
- Pattyn, A., Guillemot, F., and Brunet, J.-F. (2006). Delays in neuronal differentiation in *Mash1/Ascl1* mutants. *Dev. Biol.* 295, 67–75.
- Perez-Pinera, P., Zhang, W., Chang, Y., Vega, J.A., and Deuel, T.F. (2007). Anaplastic lymphoma kinase is activated through the pleiotrophin/receptor protein-tyrosine phosphatase beta/zeta signaling pathway: an alternative mechanism of receptor tyrosine kinase activation. *J. Biol. Chem.* 282, 28683–28690.
- Perri, P., Longo, L., Cusano, R., McConville, C.M., Rees, S.A., Devoto, M., Conte, M., Ferrara, G.B., Seri, M., Romeo, G., et al. (2002). Weak linkage at 4p16 to predisposition for human neuroblastoma. *Oncogene* 21, 8356–8360.
- Petroziello, J., Yamane, A., Westendorf, L., Thompson, M., McDonagh, C., Cerveny, C., Law, C.-L., Wahl, A., and Carter, P. (2004). Suppression subtractive hybridization and expression profiling identifies a unique set of genes overexpressed in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 23, 7734–7745.
- Phay, J.E., and Shah, M.H. (2010). Targeting RET receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Clin. Cancer Res.* 16, 5936–5941.
- Piccinini, G., Bacchiocchi, R., Serresi, M., Vivani, C., Rossetti, S., Gennaretti, C., Carbonari, D., and Fazioli, F. (2002). A ligand-inducible epidermal growth factor receptor/anaplastic lymphoma kinase chimera promotes mitogenesis and transforming properties in 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 277, 22231–22239.
- De Pontual, L., Kettaneh, D., Gordon, C.T., Oufadem, M., Boddaert, N., Lees, M., Balu, L., Lachassinne, E., Petros, A., Mollet, J., et al. (2011). Germline gain-of-function mutations of ALK disrupt central nervous system development. *Hum Mutat* 32, 272–276.
- Puffenberger, E.G., Hosoda, K., Washington, S.S., Nakao, K., deWit, D., Yanagisawa, M., and Chakravart, A. (1994). A missense mutation of the endothelin-B receptor gene in multigenic Hirschsprung's disease. *Cell* 79, 1257–1266.
- Pugh, T.J., Morozova, O., Attiyeh, E.F., Asgharzadeh, S., Wei, J.S., Auclair, D., Carter, S.L., Cibulskis, K., Hanna, M., Kiezun, A., et al. (2013). The genetic landscape of high-risk neuroblastoma. *Nat. Genet.* 45, 279–284.

- Pulford, K., Lamant, L., Morris, S.W., Butler, L.H., Wood, K.M., Stroud, D., Delsol, G., and Mason, D.Y. (1997). Detection of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and nucleolar protein nucleophosmin (NPM)-ALK proteins in normal and neoplastic cells with the monoclonal antibody ALK1. *Blood* 89, 1394–1404.
- Reichert, J.M., and Valge-Archer, V.E. (2007). Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 6, 349–356.
- Reiff, T., Tsarovina, K., Majdazari, A., Schmidt, M., Pino, I. del, and Rohrer, H. (2010). Neuroblastoma Phox2b Variants Stimulate Proliferation and Dedifferentiation of Immature Sympathetic Neurons. *J. Neurosci.* 30, 905–915.
- Reiff, T., Huber, L., Kramer, M., Delattre, O., Janoueix-Lerosey, I., and Rohrer, H. (2011). Midkine and Alk signaling in sympathetic neuron proliferation and neuroblastoma predisposition. *Development* 138, 4699–4708.
- Reiner, D.J., Ailion, M., Thomas, J.H., and Meyer, B.J. (2008). *C. elegans* anaplastic lymphoma kinase ortholog SCD-2 controls dauer formation by modulating TGF-beta signaling. *Curr. Biol.* 18, 1101–1109.
- Robertson, Tynan, and Donoghue (2000). RTK mutations and human syndromes: when good receptors turn bad. *Trends Genet.* 16, 368.
- Robinson, D.R., Wu, Y.M., and Lin, S.F. (2000). The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* 19, 5548–5557.
- Rohrer, H. (2011). Transcriptional control of differentiation and neurogenesis in autonomic ganglia. *Eur. J. Neurosci.* 34, 1563–1573.
- Romeo, G., Ronchetto, P., Luo, Y., Barone, V., Seri, M., Ceccherini, I., Pasini, B., Bocciardi, R., Lerone, M., and Kääriäinen, H. (1994). Point mutations affecting the tyrosine kinase domain of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease. *Nature* 367, 377–378.
- Rosenbaum, H., Webb, E., Adams, J.M., Cory, S., and Harris, A.W. (1989). N-myc transgene promotes B lymphoid proliferation, elicits lymphomas and reveals cross-regulation with c-myc. *EMBO J.* 8, 749–755.
- Rouah, E., Wilson, D.R., Armstrong, D.L., and Darlington, G.J. (1989). N-myc amplification and neuronal differentiation in human primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Cancer Res.* 49, 1797–1801.
- Rubie, H., Delattre, O., Hartmann, O., Combaret, V., Michon, J., Benard, J., Peyroulet, M.C., Plantaz, D., Coze, C., Chastagner, P., et al. (1997). Loss of chromosome 1p may have a prognostic value in localised neuroblastoma: results of the French NBL 90 Study. Neuroblastoma Study Group of the Societe Francaise d'Oncologie Pediatrique (SFOP). *Eur J Cancer* 33, 1917–1922.
- Salido, M., Pijuan, L., Martínez-Avilés, L., Galván, A.B., Cañadas, I., Rovira, A., Zanui, M., Martínez, A., Longarón, R., Sole, F., et al. (2011). Increased ALK gene copy number and amplification are frequent in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 6, 21–27.
- Sánchez, M.P., Silos-Santiago, I., Frisén, J., He, B., Lira, S.A., and Barbacid, M. (1996). Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature* 382, 70–73.
- Sasaki, T., Okuda, K., Zheng, W., Butrynski, J., Capelletti, M., Wang, L., Gray, N.S., Wilner, K., Christensen, J.G., Demetri, G., et al. (2010). The neuroblastoma-associated F1174L ALK mutation



causes resistance to an ALK kinase inhibitor in ALK-translocated cancers. *Cancer Res.* *70*, 10038–10043.

Sausen, M., Leary, R.J., Jones, S., Wu, J., Reynolds, C.P., Liu, X., Blackford, A., Parmigiani, G., Diaz, L.A., Jr, Papadopoulos, N., et al. (2013). Integrated genomic analyses identify ARID1A and ARID1B alterations in the childhood cancer neuroblastoma. *Nat. Genet.* *45*, 12–17.

Schleiermacher, G., Delattre, O., Peter, M., Mosseri, V., Delonlay, P., Vielh, P., Thomas, G., Zucker, J.M., Magdelenat, H., and Michon, J. (1996). Clinical relevance of loss heterozygosity of the short arm of chromosome 1 in neuroblastoma: a single-institution study. *Int J Cancer* *69*, 73–78.

Schleiermacher, G., Janoueix-Lerosey, I., Combaret, V., Derré, J., Couturier, J., Aurias, A., and Delattre, O. (2003). Combined 24-color karyotyping and comparative genomic hybridization analysis indicates predominant rearrangements of early replicating chromosome regions in neuroblastoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* *141*, 32–42.

Schmidt-Arras, D.E., Bohmer, A., Markova, B., Choudhary, C., Serve, H., and Bohmer, F.D. (2005). Tyrosine phosphorylation regulates maturation of receptor tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* *25*, 3690–3703.

Schneider, C., Wicht, H., Enderich, J., Wegner, M., and Rohrer, H. (1999). Bone morphogenetic proteins are required in vivo for the generation of sympathetic neurons. *Neuron* *24*, 861–870.

Schuchardt, A., D'Agati, V., Larsson-Blomberg, L., Costantini, F., and Pachnis, V. (1994). Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature* *367*, 380–383.

Schulte, J.H., Bachmann, H.S., Brockmeyer, B., Depreter, K., Oberthur, A., Ackermann, S., Kahlert, Y., Pajtler, K., Theissen, J., Westermann, F., et al. (2011). High ALK receptor tyrosine kinase expression supersedes ALK mutation as a determining factor of an unfavorable phenotype in primary neuroblastoma. *Clin Cancer Res* *17*, 5082–5092.

Schwab, M., Alitalo, K., Klempnauer, K.H., Varmus, H.E., Bishop, J.M., Gilbert, F., Brodeur, G., Goldstein, M., and Trent, J. (1983). Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature* *305*, 245–248.

Schwab, M., Ellison, J., Busch, M., Rosenau, W., Varmus, H.E., and Bishop, J.M. (1984). Enhanced expression of the human gene N-myc consequent to amplification of DNA may contribute to malignant progression of neuroblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *81*, 4940–4944.

Schwab, M., Varmus, H.E., and Bishop, J.M. (1985). Human N-myc gene contributes to neoplastic transformation of mammalian cells in culture. *Nature* *316*, 160–162.

Shawver, L.K., Slamon, D., and Ullrich, A. (2002). Smart drugs: tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Cell* *1*, 117–123.

Shimada, H., Ambros, I.M., Dehner, L.P., Hata, J., Joshi, V.V., Roald, B., Stram, D.O., Gerbing, R.B., Lukens, J.N., Matthay, K.K., et al. (1999). The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer* *86*, 364–372.

Siebert, R., Gesk, S., Harder, L., Steinemann, D., Grote, W., Schlegelberger, B., Tiemann, M., Wlodarska, I., and Schemmel, V. (1999). Complex variant translocation t(1;2) with TPM3-ALK fusion due to cryptic ALK gene rearrangement in anaplastic large-cell lymphoma. *Blood* *94*, 3614–3617.

- Soda, M., Choi, Y.L., Enomoto, M., Takada, S., Yamashita, Y., Ishikawa, S., Fujiwara, S., Watanabe, H., Kurashina, K., Hatanaka, H., et al. (2007). Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 448, 561–566.
- Souttou, B., Carvalho, N.B., Raulais, D., and Vigny, M. (2001). Activation of anaplastic lymphoma kinase receptor tyrosine kinase induces neuronal differentiation through the mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 9526–9531.
- Stanton, B.R., Perkins, A.S., Tessarollo, L., Sassoon, D.A., and Parada, L.F. (1992). Loss of N-myc function results in embryonic lethality and failure of the epithelial component of the embryo to develop. *Genes Dev.* 6, 2235–2247.
- Stephens, P.J., Greenman, C.D., Fu, B., Yang, F., Bignell, G.R., Mudie, L.J., Pleasance, E.D., Lau, K.W., Beare, D., Stebbings, L.A., et al. (2011). Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell* 144, 27–40.
- Stephens, P.J., Tarpey, P.S., Davies, H., Van Loo, P., Greenman, C., Wedge, D.C., Nik-Zainal, S., Martin, S., Varela, I., Bignell, G.R., et al. (2012). The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature* 486, 400–404.
- Stoica, G.E., Kuo, A., Aigner, A., Sunitha, I., Souttou, B., Malerczyk, C., Caughey, D.J., Wen, D., Karavanov, A., Riegel, A.T., et al. (2001). Identification of anaplastic lymphoma kinase as a receptor for the growth factor pleiotrophin. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 16772–16779.
- Stoica, G.E., Kuo, A., Powers, C., Bowden, E.T., Sale, E.B., Riegel, A.T., and Wellstein, A. (2002). Midkine binds to anaplastic lymphoma kinase (ALK) and acts as a growth factor for different cell types. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 35990–35998.
- Supino-Rosin, L., Yoshimura, A., Yarden, Y., Elazar, Z., and Neumann, D. (2000). Intracellular retention and degradation of the epidermal growth factor receptor, two distinct processes mediated by benzoquinone ansamycins. *J. Biol. Chem.* 275, 21850–21855.
- Sweetser, D.A., Kapur, R.P., Froelick, G.J., Kafer, K.E., and Palmiter, R.D. (1997). Oncogenesis and altered differentiation induced by activated Ras in neuroblasts of transgenic mice. *Oncogene* 15, 2783–2794.
- Takeuchi, K., Soda, M., Togashi, Y., Suzuki, R., Sakata, S., Hatano, S., Asaka, R., Hamanaka, W., Ninomiya, H., Uehara, H., et al. (2012). RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat. Med.* 18, 378–381.
- Tartari, C.J., Gunby, R.H., Coluccia, A.M.L., Sottocornola, R., Cimbri, B., Scapozza, L., Donella-Deana, A., Pinna, L.A., and Gambacorti-Passerini, C. (2008). Characterization of some molecular mechanisms governing autoactivation of the catalytic domain of the anaplastic lymphoma kinase. *J. Biol. Chem.* 283, 3743–3750.
- Teitz, T., Stanke, J.J., Federico, S., Bradley, C.L., Brennan, R., Zhang, J., Johnson, M.D., Sedlacik, J., Inoue, M., Zhang, Z.M., et al. (2011). Preclinical models for neuroblastoma: establishing a baseline for treatment. *PLoS ONE* 6, e19133.
- Teitz, T., Inoue, M., Valentine, M.B., Zhu, K., Rehg, J.E., Zhao, W., Finkelstein, D., Wang, Y.-D., Johnson, M.D., Calabrese, C., et al. (2013). Th-MYCN mice with caspase-8 deficiency develop advanced neuroblastoma with bone marrow metastasis. *Cancer Res.*
- Thiele, C.J., Reynolds, C.P., and Israel, M.A. (1985). Decreased expression of N-myc precedes retinoic acid-induced morphological differentiation of human neuroblastoma. *Nature* 313, 404–406.

- Trochet, D., Bourdeaut, F., Janoueix-Lerosey, I., Deville, A., De Pontual, L., Schleiermacher, G., Coze, C., Philip, N., Frébourg, T., Munnich, A., et al. (2004). Germline mutations of the paired-like homeobox 2B (PHOX2B) gene in neuroblastoma. *Am. J. Hum. Genet.* *74*, 761–764.
- Tsarovina, K., Pattyn, A., Stubbusch, J., Müller, F., Van der Wees, J., Schneider, C., Brunet, J.-F., and Rohrer, H. (2004). Essential role of Gata transcription factors in sympathetic neuron development. *Development* *131*, 4775–4786.
- Vandepoele, K., Andries, V., Van Roy, N., Staes, K., Vandesompele, J., Laureys, G., De Smet, E., Berx, G., Speleman, F., and Van Roy, F. (2008). A constitutional translocation t(1;17)(p36.2;q11.2) in a neuroblastoma patient disrupts the human NBPF1 and ACCN1 genes. *PLoS One* *3*, e2207.
- Vernersson, E., Khoo, N.K., Henriksson, M.L., Roos, G., Palmer, R.H., and Hallberg, B. (2006). Characterization of the expression of the ALK receptor tyrosine kinase in mice. *Gene Expr Patterns* *6*, 448–461.
- Viswanathan, S.R., Daley, G.Q., and Gregory, R.I. (2008). Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science* *320*, 97–100.
- Viswanathan, S.R., Powers, J.T., Einhorn, W., Hoshida, Y., Ng, T.L., Toffanin, S., O’Sullivan, M., Lu, J., Phillips, L.A., Lockhart, V.L., et al. (2009). Lin28 promotes transformation and is associated with advanced human malignancies. *Nat. Genet.* *41*, 843–848.
- Wang, K., Diskin, S.J., Zhang, H., Attiyeh, E.F., Winter, C., Hou, C., Schnepf, R.W., Diamond, M., Bosse, K., Mayes, P.A., et al. (2011a). Integrative genomics identifies LMO1 as a neuroblastoma oncogene. *Nature* *469*, 216–220.
- Wang, R., Hu, H., Pan, Y., Li, Y., Ye, T., Li, C., Luo, X., Wang, L., Li, H., Zhang, Y., et al. (2012). RET fusions define a unique molecular and clinicopathologic subtype of non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* *30*, 4352–4359.
- Wang, W., Gu, L., Liu, W., Li, G., Liu, H., and Ma, Z. (2011b). ALK-positive extramedullary plasmacytoma with expression of the CLTC-ALK fusion transcript. *Pathol. Res. Pract.* *207*, 587–591.
- Weiss, J.B., Xue, C., Benice, T., Xue, L., Morris, S.W., and Raber, J. (2012). Anaplastic lymphoma kinase and leukocyte tyrosine kinase: functions and genetic interactions in learning, memory and adult neurogenesis. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *100*, 566–574.
- Weiss, W.A., Aldape, K., Mohapatra, G., Feuerstein, B.G., and Bishop, J.M. (1997). Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice. *Embo J* *16*, 2985–2995.
- Westermarck, U.K., Wilhelm, M., Frenzel, A., and Henriksson, M.A. (2011). The MYCN oncogene and differentiation in neuroblastoma. *Semin. Cancer Biol.* *21*, 256–266.
- Xiang, Z., Kreisel, F., Cain, J., Colson, A., and Tomasson, M.H. (2007). Neoplasia driven by mutant c-KIT is mediated by intracellular, not plasma membrane, receptor signaling. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 267–282.
- Yu, A.L., Gilman, A.L., Ozkaynak, M.F., London, W.B., Kreissman, S.G., Chen, H.X., Smith, M., Anderson, B., Villablanca, J.G., Matthay, K.K., et al. Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *N Engl J Med* *363*, 1324–1334.
- Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* *318*, 1917–1920.

Zamo, A., Chiarle, R., Piva, R., Howes, J., Fan, Y., Chilosi, M., Levy, D.E., and Inghirami, G. (2002). Anaplastic lymphoma kinase (ALK) activates Stat3 and protects hematopoietic cells from cell death. *Oncogene* 21, 1038–1047.

Zhu, S., Lee, J.S., Guo, F., Shin, J., Perez-Atayde, A.R., Kutok, J.L., Rodig, S.J., Neuberg, D.S., Helman, D., Feng, H., et al. (2012). Activated ALK collaborates with MYCN in neuroblastoma pathogenesis. *Cancer Cell* 21, 362–373.

# **ANNEXES**

# Internalization and Down-Regulation of the ALK Receptor in Neuroblastoma Cell Lines upon Monoclonal Antibodies Treatment

Pierre Mazot<sup>1,2,3</sup>, Alex Cazes<sup>4,5</sup>, Florent Dingli<sup>6</sup>, Joffrey Degoutin<sup>1,2,3\*</sup>, Théano Irinopoulou<sup>1,2,3</sup>, Marie-Claude Bouutterin<sup>1,2,3</sup>, Béangère Lombard<sup>6</sup>, Damarys Loew<sup>6</sup>, Bengt Hallberg<sup>7</sup>, Ruth Helen Palmer<sup>7</sup>, Olivier Delattre<sup>4,5</sup>, Isabelle Janoueix-Lerosey<sup>4,5\*</sup>, Marc Vigny<sup>1,2,3\*</sup>

**1** Université Pierre et Marie Curie, Paris, France, **2** Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMRS, Paris, France, **3** Institut du Fer à Moulin, Paris, France, **4** Institut Curie, Centre de Recherche, Paris, France, **5** Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Institut Curie, Paris, France, **6** Institut Curie, Centre de Recherche, Laboratoire de Spectrométrie de Masse Protéomique, Paris, France, **7** Department of Molecular Biology, Umea University, Umea, Sweden

## Abstract

Recently, activating mutations of the full length ALK receptor, with two hot spots at positions F1174 and R1275, have been characterized in sporadic cases of neuroblastoma. Here, we report similar basal patterns of ALK phosphorylation between the neuroblastoma IMR-32 cell line, which expresses only the wild-type receptor (ALK<sup>WT</sup>), and the SH-SY5Y cell line, which exhibits a heterozygous ALK F1174L mutation and expresses both ALK<sup>WT</sup> and ALK<sup>F1174L</sup> receptors. We demonstrate that this lack of detectable increased phosphorylation in SH-SY5Y cells is a result of intracellular retention and proteasomal degradation of the mutated receptor. As a consequence, in SH-SY5Y cells, plasma membrane appears strongly enriched for ALK<sup>WT</sup> whereas both ALK<sup>WT</sup> and ALK<sup>F1174L</sup> were present in intracellular compartments. We further explored ALK receptor trafficking by investigating the effect of agonist and antagonist mAb (monoclonal antibodies) on ALK internalization and down-regulation, either in SH-SY5Y cells or in cells expressing only ALK<sup>WT</sup>. We observe that treatment with agonist mAbs resulted in ALK internalization and lysosomal targeting for receptor degradation. In contrast, antagonist mAb induced ALK internalization and recycling to the plasma membrane. Importantly, we correlate this differential trafficking of ALK in response to mAb with the recruitment of the ubiquitin ligase Cbl and ALK ubiquitylation only after agonist stimulation. This study provides novel insights into the mechanisms regulating ALK trafficking and degradation, showing that various ALK receptor pools are regulated by proteasome or lysosome pathways according to their intracellular localization.

**Citation:** Mazot P, Cazes A, Dingli F, Degoutin J, Irinopoulou T, et al. (2012) Internalization and Down-Regulation of the ALK Receptor in Neuroblastoma Cell Lines upon Monoclonal Antibodies Treatment. PLoS ONE 7(3): e33581. doi:10.1371/journal.pone.0033581

**Editor:** Janet Shipley, The Institute of Cancer Research, United Kingdom

**Received:** September 22, 2011; **Accepted:** February 16, 2012; **Published:** March 30, 2012

**Copyright:** © 2012 Mazot et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** Work at the Institut du Fer à Moulin UMR-S839 was supported by Inserm and Université Pierre et Marie Curie. The U830 Inserm laboratory was supported by grants from the Institut National du Cancer, the Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe labellisée), the Association Hubert Guoin, Les Bagouz à Manon, les amis de Claire and Enfance et Santé. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: isabelle.janoueix@curie.fr (IJ-L); marc.vigny@inserm.fr (MV)

‡ These authors contributed equally to this work.

‡ Current address: Cell Growth and Proliferation Laboratory, Peter MacCallum Cancer Centre, St Andrews Place, East Melbourne, Victoria, Australia

## Introduction

Full-length anaplastic lymphoma kinase (ALK) is a tyrosine kinase receptor (RTK) originally identified in human and mouse [1,2]. Orthologues of this receptor have also been identified in *Drosophila* and *Caenorabditis elegans* [3,4]. In vertebrates, the ALK receptor is expressed transiently during development of central and peripheral nervous systems strongly suggesting implication in development and function in this system. However ALK functions in vertebrates remain poorly understood and in those organisms the nature of the cognate ligand is still highly controversial [see [5] for a review].

Deregulation of ALK signaling has been associated with development of various cancers [see [6] for a review]. The intracellular portion (containing the kinase domain) of ALK was firstly identified as part of the nucleophosmin (NPM)-ALK

oncogenic fusion protein resulting from chromosomal translocation frequently associated with anaplastic large cell lymphoma (ALCL). Other chromosomal translocations implicating intracellular portion of ALK fused with different partners have been associated with various cancers, such as EML4-ALK involved in 5% of non-small-cell lung cancer (NSCLC) [see [6] for a review]. The ALK receptor has emerged as an attractive target for the development of anticancer therapeutic strategy [see [7] for a review] and recently crizotinib (also known as PF-2341066) has given hopeful results in clinical trials for the treatment of NSCLC [8].

The full length receptor ALK has been shown to be implicated in somatic and germinal cases of neuroblastoma through gene amplification and/or activating point mutations [9,10,11,12,13]. Two hot spots of mutations at positions F1174 and R1275 have been identified in sporadic cases. Using stably transfected NIH3T3

cells expressing mutated ALK at position F1174 or R1275, we recently established that the constitutive kinase of the mutated receptors impaired their trafficking, with retention in intracellular compartment [14]. Strikingly intracellular mislocalized receptors were significantly less phosphorylated when compared with the cell surface pool, and normal receptor trafficking could be restored by abolition of its activity using the specific ALK kinase inhibitor NVP-TAE 684 (TAE) [14]. While small molecule inhibitors are one of the most promising strategies for the treatment of cancers linked to RTKs, the development of monoclonal antibodies (mAb) may also be highly valuable [15]. Moreover, combinations of tyrosine kinase inhibitors and antibodies are already used in therapeutic treatments [16]. We previously generated a range of mAbs against the extracellular part of the ALK receptor and isolated mAbs with either agonist or antagonist mAb characteristics [17]. The full characterization of the effects of such antibodies on the properties of the ALK receptor, including stability and trafficking is an important prerequisite to their potential use in clinical practice.

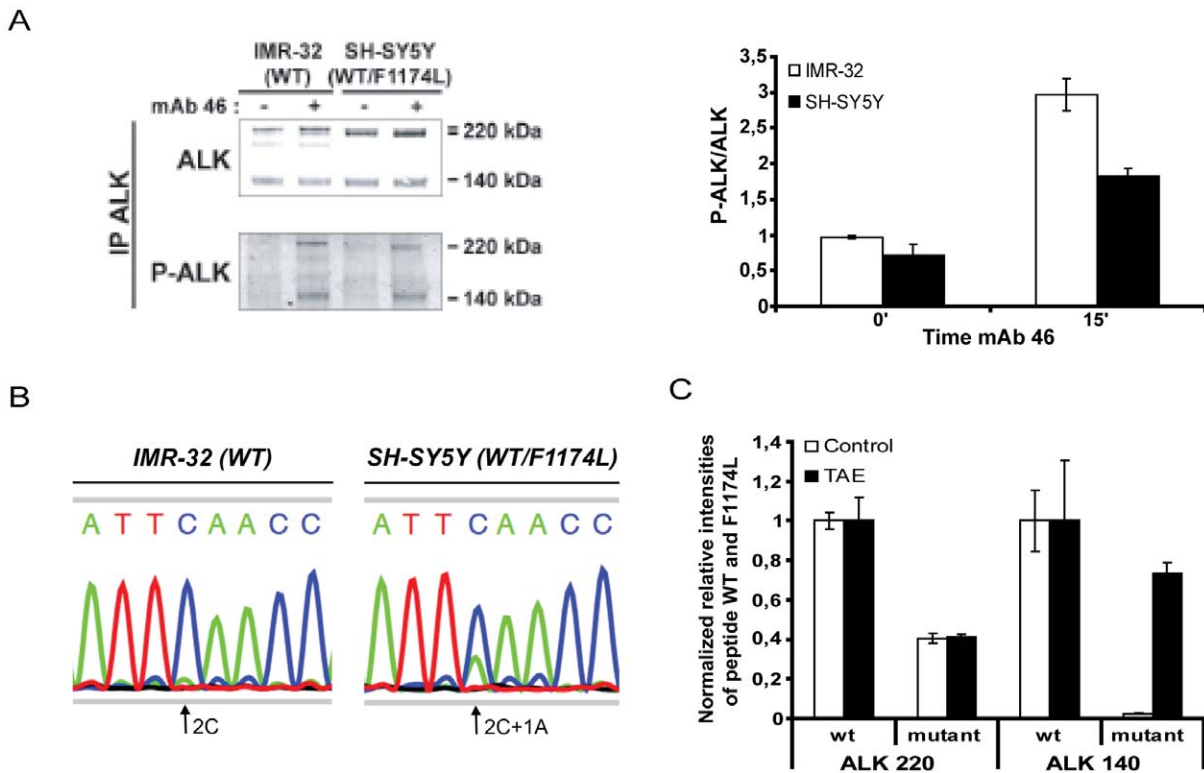
In this study we demonstrate that the ALK<sup>F1174L</sup> receptor endogenously expressed in SH-SY5Y cells is largely retained in an intracellular compartment in a poorly phosphorylated state where it is rapidly degraded by the proteasome. We subsequently show that addition of agonist antibody induces ALK activation, internalization, ubiquitylation, and lysosomal degradation of cell surface receptor. In contrast, antagonist antibody, which dimerizes ALK without activation, leads to internalization and plasma membrane recycling.

**Results**

**ALK receptor phosphorylation, localization and degradation in neuroblastoma SH-SY5Y cells**

**ALK phosphorylation in SH-SY5Y and IMR-32 neuroblastoma cell lines.** We first investigated the impact of ALK mutation on receptor phosphorylation by comparing two neuroblastoma cell lines, IMR-32 cells expressing only wild-type receptor and SH-SY5Y cells exhibiting a heterozygous ALK F1174L activating mutation [11,12]. As expected, in both cell lines, a doublet at 220 kD corresponding to the full length receptor, together with a band representing the cleaved form at 140 kD [17] were detected. The level of ALK expression in the two cell lines was roughly similar and ALK phosphorylation was barely discernible in either cell lines under basal conditions, even given, the presence of an activated mutation in the SH-SY5Y cell line (Fig. 1A). Agonist mAb stimulation performed with the mAb 46 induced an increase of ALK phosphorylation in both IMR-32 and SH-SY5Y cells (Fig. 1A, right panel: representative Western Blot, left panel: quantification). In agreement with our previous data [18] we observed an induction of ALK phosphorylation for the upper band of the 220 kD doublet and the 140 kD form.

**Analysis of the RNA and protein levels of ALK WT and F1174L mutant in the SH-SY5Y neuroblastoma cell line.** Since no increase in the basal phosphorylation of the ALK receptor could be detected in SH-SY5Y cells, we sought to measure the relative ratio of the WT and mutant ALK receptors in this sample. Sequencing of cDNA generated from total RNAs



**Figure 1. ALK<sup>WT</sup> and ALK<sup>F1174L</sup> expression and phosphorylation in the SH-SY5Y neuroblastoma cell line.** A. IMR-32 (WT) and SH-SY5Y (WT/F1174L) cells were untreated or stimulated with 6 nM agonist mAb 46 for 15 min. ALK immunoprecipitates were immunoblotted with polyclonal anti-ALK (REAB) and antiphosphotyrosine (4G10 platinumium). Right panel: Quantification of the ratio P-ALK/ALK in IMR-32 and SH-SY5Y cells, results are expressed in mean and s.e.m. B. Total RNA of IMR-32 (WT) and SH-SY5Y (WT/F1174L) were extracted and cDNA were obtained by reverse transcription. Sequencing chromatograms of the cDNAs obtained after RT-PCR are shown. C. SH-SY5Y cells (WT/F1174L) were treated or not with the ALK specific tyrosine kinase inhibitor NVP-TAE684 at 50 nM for two days. After ALK immunoprecipitation proteomics analysis and quantifications of interested peptides (carrying or not the mutation spot) were done by ESI-MS, after normalization. doi:10.1371/journal.pone.0033581.g001

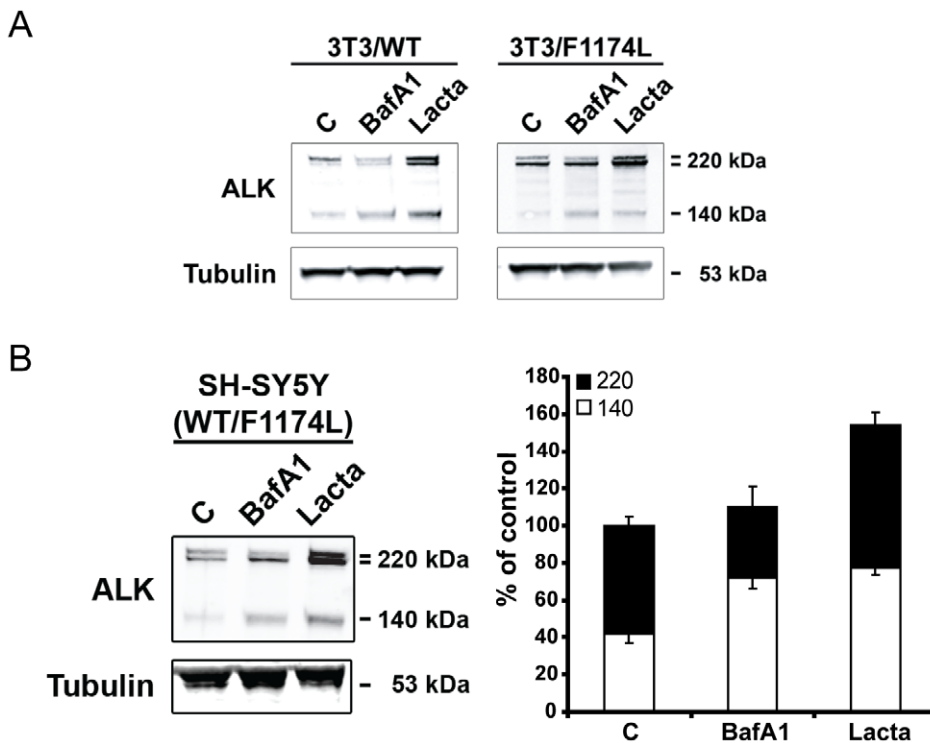
confirmed that IMR-32 cells express only ALK<sup>WT</sup> (Fig. 1B); whereas in SH-SY5Y, we observed the presence of both ALK<sup>WT</sup> and ALK<sup>F1174L</sup> with a ratio of 2:1 (Fig. 1B). In the parental SK-N-SH cell line from which the SH-SY5Y cell line has been derived, a trisomy of chromosome 2p including the *ALK* locus has been observed, with two wild-type alleles for one mutated one (I. Janoueix-Lerosey, unpublished observations). It is likely that the SH-SY5Y cell line bears a similar 2p gain that would be consistent with the proportion of ALK<sup>WT</sup> and ALK<sup>F1174L</sup> mRNAs observed here. We next investigated the ratio of ALK<sup>WT</sup> and ALK<sup>F1174L</sup> receptors for the 220 kD and 140 kD forms by mass spectrometry in SH-SY5Y cells. After tryptic digestion and normalization using synthetic peptides we could detect the peptide containing or not the mutation site for both the 220 kD and the 140 kD forms (Figures S1A and S1B). We first analyzed the 220 kD form and observed a ratio of more than two ALK<sup>WT</sup> for one mutated receptor. In contrast, the 140 kD form contained only ALK<sup>WT</sup> (Fig. 1C).

**Kinase inhibition restored cell surface localization of the mutated receptors in SH-SY5Y cells.** We previously demonstrated intracellular retention of activated ALK in NIH3T3 cells stably transfected with ALK<sup>F1174L</sup> and showed that kinase inhibition restored maturation and cell surface localization of the mutated receptors [14]. The lack of ALK<sup>F1174L</sup> in the 140 kD form in SH-SY5Y could therefore be explained by the same intracellular trafficking defect in this cell line, i.e. retention of ALK<sup>F1174L</sup> in the ER/Golgi compartments. We therefore treated SH-SY5Y cells with TAE, a small-molecule ALK inhibitor and then performed a *label-free* quantitative

proteomics study of WT and F1174L mutated ALK as described above, both for the 220 kD and 140 kD forms. TAE treatment led to a strong increase of the amount of ALK<sup>F1174L</sup> present in the 140 kD form, demonstrating the rescue of the normal intracellular trafficking of the mutated receptor (Fig. 1C).

**Proteasomal degradation of the intracellular pools of ALK<sup>WT</sup> and ALK<sup>F1174L</sup>.** In order to gain insight into the degradation mechanisms involved in the regulation of ALK stability, we explored the two main protein degradation pathways, i.e. the proteasome and lysosome pathways. We took advantage of NIH3T3 cells stably expressing only either ALK<sup>WT</sup> (3T3/WT) or ALK<sup>F1174L</sup> (3T3/F1174L) and used lactacystin or bafilomycin A1 to specifically inhibit proteasome or lysosome dependent degradation, respectively. In 3T3/WT cells, bafilomycin A1 treatment led to the enrichment of the 140 kD form of ALK correlating with the decrease of the upper band of the 220 kD doublet (Fig. 2A). These two products have been shown previously to be located at the plasma membrane. The effect of bafilomycin A1 treatment on 3T3/F1174L cells was hardly detectable. In contrast, in both cell lines, lactacystin treatment led to an increase of the lower band of the 220 kD doublet that was previously shown to be an intracellular form of the receptor and an increase in the total amount of ALK was also observed (Fig. 2A). These results therefore indicate that the intracellular pools of ALK, either ALK<sup>WT</sup> or ALK<sup>F1174L</sup>, are preferentially degraded by the proteasome whereas the turn-over of the ALK receptor located at the plasma membrane is achieved by lysosomes.

In SH-SY5Y cells, biotinylation experiments confirmed that the upper band of the 220 kD doublet as well as the 140 kD form



**Figure 2. Proteasome dependent degradation of receptor retained in intracellular compartment.** **A.** NIH3T3 cells stably expressing either the WT ALK or F1174L mutated ALK were non-treated or treated with Bafilomycin A1 (0.25 μM) or with Lactacystin (10 μM) for 16 hours. ALK immunoprecipitates from 1 mg of total cell lysate proteins were subjected to western blot analysis. ALK was immunoblotted with polyclonal REAB antibody. **B.** SH-SY5Y were non-treated or treated with Bafilomycin A1 (0.25 μM) or with Lactacystin (10 μM) for 16 hours. ALK immunoprecipitates from 1.5 mg of total cell lysate proteins were subjected to western blot analysis using polyclonal REAB antibody. The experiment was done in triplicates and quantified with LiCor Odyssey system. Results were expressed in percentage of control +/- s.e.m. doi:10.1371/journal.pone.0033581.g002



were located at the cell surface, whereas the lower band of the 220 kD doublet was intracellular (Figure S2). We investigated the effect of lactacystin or bafilomycin A1 drugs on SH-SY5Y cells. Bafilomycin A1 induced a decrease of the upper band of the 220 kD doublet correlated with an increase of the 140 kD form and lactacystin led to a strong increase of ALK level for both the 220 kD and the 140 kD forms (Fig. 2B, left panel: representative blot, right panel: quantification). These observations are consistent with the results obtained in the 3T3 cells and indicate that, in this neuroblastoma cell line, the intracellular pools of ALK, including both ALK<sup>WT</sup> and ALK<sup>F1174L</sup> receptors are degraded by the proteasome.

**ALK trafficking upon agonist or antagonist mAb treatment**

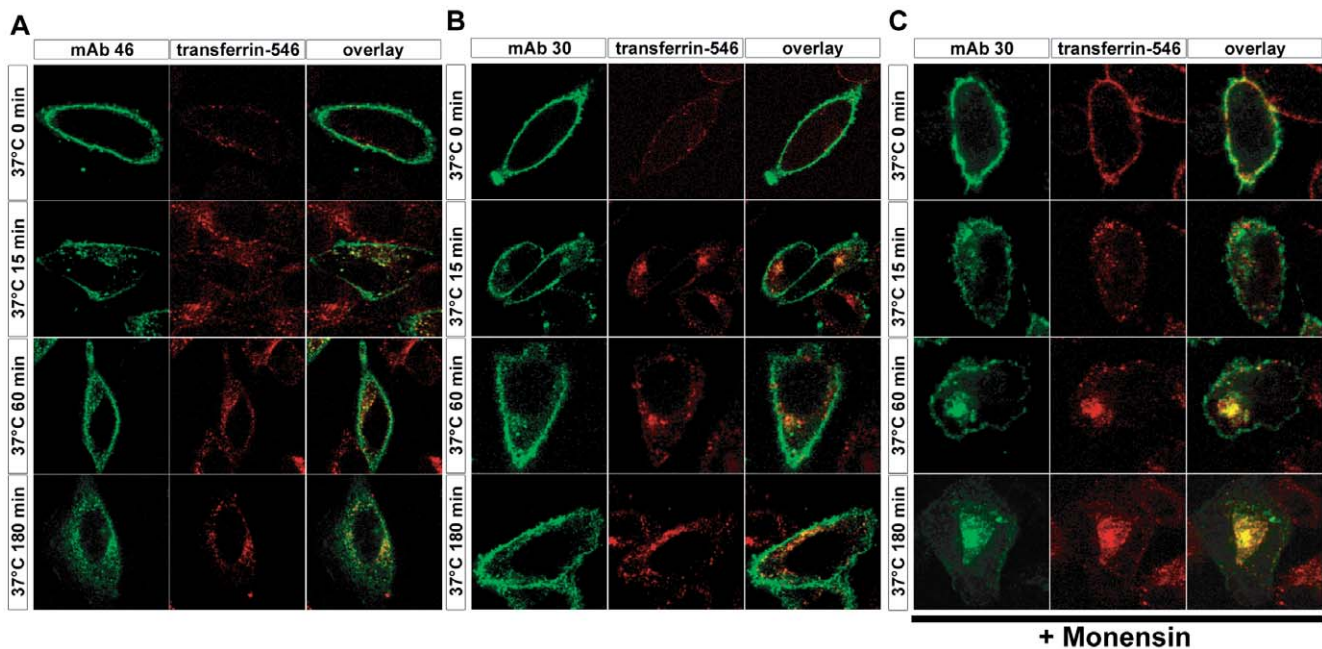
**Agonist and antagonist mAb treatments induced ALK internalization.** We first determined whether agonist mAb could trigger ALK internalization. The low level of ALK expression in neuroblastoma cell lines did not allow us to follow internalization by immunofluorescence. We thus employed transiently transfected ALK<sup>WT</sup> in CHO cells. To investigate the internalization of ALK primarily located at the membrane before treatment, we incubated living cells with agonist mAb 46 for 10 min at 4°C in order to block endocytosis. We then chased cells at 37°C and observed the resultant, in order to allow receptor trafficking. Using confocal microscopy we were able to detect mAb 46 bound to the ALK receptor. As expected, after incubation at 4°C we could only detect the mAb:ALK receptor complex at the cell surface. After 15' of incubation at 37°C ALK appeared

intracellularly, and after 3 h the staining was essentially intracellular (Fig. 3A).

Having demonstrated that agonist mAb was able to trigger ALK internalization, we next investigated the effects of antagonist mAb treatment. The antagonist antibodies dimerize ALK without activation [17]. After 15' of incubation at 37°C with mAb 30, ALK appeared intracellularly (Fig. 3B). Upon longer exposure (3 h), the receptor was detected internally but a significant fraction of ALK was still located at the plasma membrane in contrast with the effect observed when employing the agonist mAb (Fig. 3B compared to Fig. 3A).

**Differential intracellular trafficking of ALK in response to agonist or antagonist mAb.** To characterize differences in ALK trafficking in response to agonist and antagonist mAb we further investigated the receptor intracellular trafficking after internalization. Indeed it is well established that after ligand induced internalization, RTK could be either addressed to lysosome for degradation, or recycled to plasma membrane through trafficking in specific endosomal compartments.

We first performed a co-localization study of internalized ALK after agonist mAb 46 treatments with a marker of recycling endosomes, transferrin. For this purpose CHO cells transiently transfected with ALK<sup>WT</sup> were incubated for 10 min at 4°C with both agonist mAb 46 and transferrin-546, then cells were replaced at 37°C for indicated times. After 15 min, 1 h and 3 h, ALK partially co-localized with transferrin-546 (Fig. 3A). Thus agonist mAb treatment induced only a partial receptor recycling to plasma membrane after internalization.



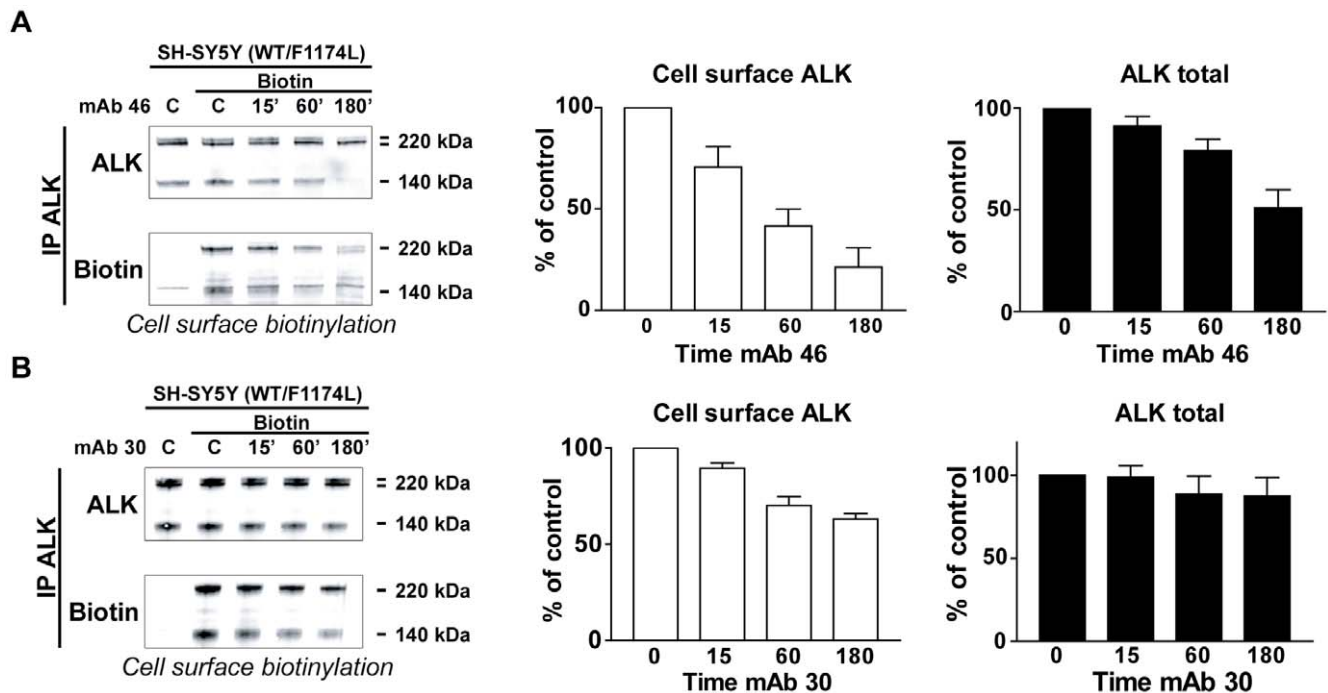
**Figure 3. Agonist mAb treatment induced lysosome targeting and antagonist mAb treatment induced cell surface recycling of ALK receptor.** **A.** CHO cells were transiently transfected with construct encoding for ALK WT. Cells were pulsed 10 minutes on ice at 4°C with 6 nM of agonist mAb 46 and transferrin coupled to AlexaFluor 546, then chased at 37°C in a time course manner. Direct immunodetection of agonist mAb 46 were done with anti-mouse secondary antibody coupled to Alexa Fluor 488. Cellular localization of ALK receptors were shown by immunofluorescence using confocal laser scanning microscopy. Merge images were mounted thanks to Photoshop software. **B.** CHO cells were transiently transfected with construct encoding for ALK wild type. Cells were pulsed 10 minutes on ice at 4°C with 6 nM of antagonist mAb 30 and transferrin coupled to AlexaFluor 546, then chased at 37°C in a time course manner. Direct immunodetection of antagonist mAb 30 were done with anti-mouse secondary antibody coupled to Alexa Fluor 488. Cellular localization of ALK receptors were shown by immunofluorescence using confocal laser scanning microscopy. Merged images were mounted thanks to photophop software. **C.** Experiment identical to B but with a cell pre-treatment with monensin (50 μM) for 30 min. doi:10.1371/journal.pone.0033581.g003

Antagonist mAb 30 treatment led to the internalization of ALK but an important fraction of ALK was still located at the plasma membrane. These results could be explained by plasma membrane recycling after internalization. Indeed internalized ALK in response to antagonist mAb strongly co-localized with transferrin (Fig. 3B). To fully confirm that antagonist mAb treatment induced ALK recycling after internalization, we used monensin a classical inhibitor of this process. Addition of 100 nM of monensin before mAb 30 treatment led to a strong accumulation of internalized ALK starting after 1 h of cell incubation at 37°C and ALK strongly co-localized with transferrin-546 (compared Fig. 3B and 3C). Thus, in response to antagonist mAb treatment, ALK was recycled to plasma membrane after internalization.

**Agonist mAb treatment induced ALK degradation whereas antagonist mAb induced ALK internalization without down-regulation.** Since both agonist and antagonist mAb treatment induced ALK internalization in CHO, we next investigated whether these treatments resulted in down-regulation of the receptor in neuroblastoma cell lines. We performed cell surface protein biotinylation experiments after exposure of the SH-SY5Y neuroblastoma cells to agonist or antagonist mAbs. Treatment with agonist mAb46 clearly induced a progressive decrease of biotinylated ALK with 80% of receptor internalized after 3 h (Fig. 4A, left panel: representative western Blot, middle panel: quantification of cell surface ALK). Interestingly the level of ALK decreased during mAb treatment. This effect was noticeable after 1 h and strikingly after 3 h (Fig. 4A, right panel: quantification of total ALK). On closer inspection the remaining

receptor largely corresponded to the intracellular ALK i.e the pool of receptor not accessible to the mAb. Thus, ALK is internalized and then degraded in response to agonist mAb treatment. We next investigated the effect of antagonist mAb treatment on ALK internalization and degradation in SH-SY5Y cells. Similarly to experiments performed with the agonist mAb we performed cell surface protein biotinylation experiments exposure to mAb 30 (Fig. 4B, left panel: representative Western Blot, middle panel: quantification of cell surface ALK, right panel: quantification of total ALK). Treatment with mAb 30 also induced a progressive decrease of ALK biotinylation but reached a plateau with 40% of internalization between 1 h and 3 h (Fig. 4B) correlated with a weak decrease of total ALK. These results suggest that ALK dimerization without activation leads to receptor internalization followed by recycling to the plasma membrane.

**Tyrosine kinase activity is required for ALK down-regulation in neuroblastoma cell lines.** We further investigated the ALK down-regulation process induced by agonist mAb. For this purpose, we treated IMR-32 and SH-SY5Y with mAb 46 over a 6 h time course. We then followed receptor activation and degradation by western blot after immunoprecipitation. In both cell lines, agonist mAb 46 induced ALK phosphorylation with a peak at 15 min. ALK down-regulation led to a decrease of the receptor phosphorylation with slower kinetics for IMR-32 cells as compared to SH-SY5Y cells (Fig. 5A and Fig. 5B). In both cases receptor degradation started after 1 h of agonist mAb treatment and increased with time. As expected the lower 220 kD form of ALK, which corresponds to



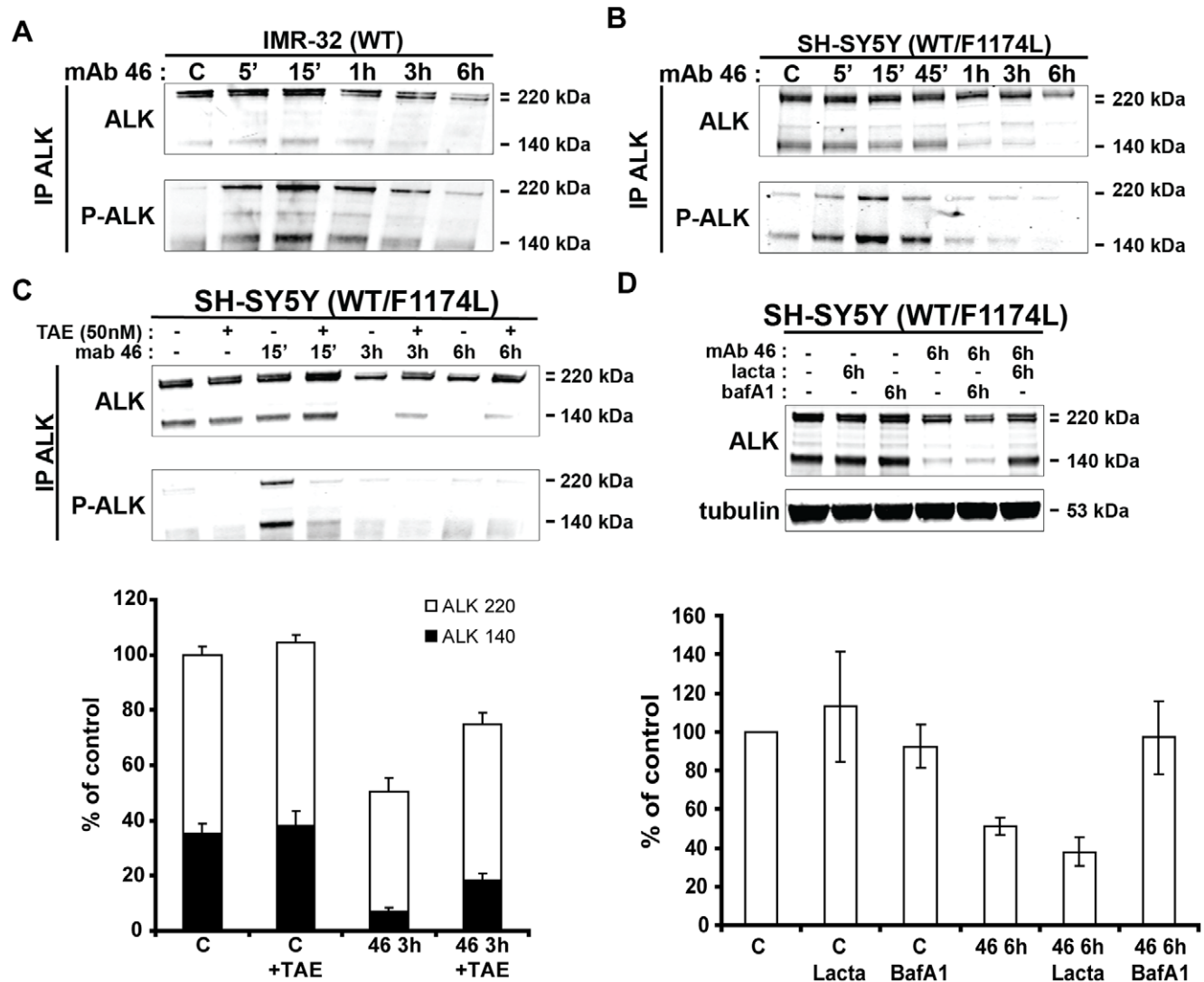
**Figure 4. Agonist mAb treatment induced ALK degradation whereas antagonist mAb induced ALK internalization without down-regulation.** **A.** SH-SY5Y cells were untreated (-) or treated with agonist mAb 46 for 15 min, 60 min or 3 hours. At the end of the agonist treatment, cells were subjected to cell surface protein biotinylation. ALK immunoprecipitates from 1.5 mg of total cells lysate proteins were analyzed by western blot. Biotinylated cell surface ALK were detected with streptavidin coupled to IRdye 800, and total ALK with REAB antibody. Experiments were done in triplicates, total and biotinylated (cell surface) ALK were quantified with LiCor Odyssey software. Results are expressed in percentage of control  $\pm$  s.e.m. **B.** SH-SY5Y cells were untreated or treated with agonist mAb 30 for 15 min, 1 h or 3 h. At the end of mAb treatment, cells were subjected to cell surface protein biotinylation. ALK immunoprecipitates from 1.5 mg of total cells lysate proteins were analyzed by western blot. Biotinylated cell surface ALK were detected with streptavidin coupled to IRdye 800, and total ALK with REAB antibody. Experiments were done in triplicates, total and biotinylated (cell surface) ALK were quantified with LiCor Odyssey software. Results are expressed in percentage of control  $\pm$  s.e.m. doi:10.1371/journal.pone.0033581.g004

the intracellular pool of receptor, was much less sensitive to agonist mAb induced down-regulation.

We then investigated the importance of kinase activity in the degradation of ALK. As expected, pretreatment with the inhibitor TAE led to a strong inhibition of ALK phosphorylation induced by mAb46 treatment (Fig. 5C, upper panel: representative Western Blot, lower panel: quantification). Interestingly, TAE treatment strongly inhibited the agonist induced ALK degradation of both the 220 kD and 140 kD forms (Fig. 5C). Thus, ALK activation is essential to trigger ALK down-regulation.

We then tested which protein degradation pathway was involved in ALK degradation after agonist mAb stimulation.

SH-SY5Y cells were pre-treated with either lactacystin or bafilomycin A1 for 15 min and then treated with agonist mAb 46 for 6 h. We selected this duration of treatment since it triggers an almost complete down regulation of cell surface ALK both in IMR-32 and SH-SY5Y cells (Fig. 5A). This treatment was much shorter than the one used in the experiment described in Fig. 2A. Proteasome inhibition by lactacystin had no effect on agonist induced ALK degradation. On contrary bafilomycin A1 treatment completely abolished ALK down-regulation after agonist treatment (Fig. 5D, upper panel: representative Western Blot, lower panel: quantification). These results demonstrated that after agonist mAb treatment, ALK was mainly addressed to lysosome



**Figure 5. ALK down-regulation after agonist mAb 46 treatment.** **A.** IMR-32 (WT) and **B.** SH-SY5Y (WT/F1174L) were treated with mAb 46 for 15 min to 6 h. ALK immunoprecipitates from 1.5 mg of total cell lysate proteins were submitted to western blot. Total ALK were immunoblotted with polyclonal REAB and phosphorylated ALK were detected with monoclonal phosphotyrosine antibody 4G10 platinumium. Tubulin acted as a loading control. **C.** SH-SY5Y cells were pre-treated or not with 50 nM NVP-TAE684 one hour before cell stimulation by agonist mAb 46 at 6 nM in time course manner (0 min to 6 h). ALK immunoprecipitates from 1.5 mg of total cell lysate proteins were submitted to western-blot analysis and immunoblotted as described. *Lower panel:* Experiments were done in triplicates and the 220 kD forms (the doublet was impossible to separate) and the 140 kD form of ALK were quantified with LiCor Odyssey software. Results are expressed in percentage of control +/- s.e.m. **D.** SH-SY5Y cells were pre-treated with either bafilomycin (0.25 μM) or lactacystin (10 μM) for 15', then non treated or treated with agonist mAb 46 at 6 nM during 6 hours. ALK immunoprecipitates from 1.5 mg of total cell lysate proteins were submitted to Western-blot analysis as described. *Lower panel:* Experiments were done in triplicates total ALK (220 kD forms+140 kD form) was quantified with LiCor Odyssey software. Results are expressed in percentage of control +/- s.e.m.  
doi:10.1371/journal.pone.0033581.g005



for degradation, with a minor pool of receptors recycled to plasma membrane.

**ALK activation is required for Cbl recruitment and receptor ubiquitylation.** Ubiquitylation of RTK has been demonstrated to be a critical event in the regulation of intracellular sorting and lysosome targeting [19] and the ALK receptor has been previously showed to recruit the ubiquitin ligase Cbl after activation [20]. We therefore investigated whether differential ALK intracellular trafficking in response to mAb is related to the recruitment of Cbl and receptor ubiquitylation.

We first performed Cbl immunoprecipitation, examining co-immunoprecipitation of ALK by immunoblotting in SH-SY5Y cells. In control conditions we could not detect ALK co-immunoprecipitation with Cbl. Agonist mAb treatment led to co-immunoprecipitation of Cbl and ALK (Fig. 6A). Furthermore, we also detected the phosphorylation of both proteins strongly suggesting that the phosphorylation of Cbl resulted from ALK activation. We then tested Cbl recruitment after ALK immunoprecipitation. After ALK immunoprecipitation we detected a weak recruitment of Cbl in control conditions; however agonist mAb treatment strongly increased this interaction (Fig. 6B). Once again, agonist mAb activation triggered ALK and Cbl phosphorylation. Finally we tested ALK ubiquitylation in response to mAb treatment in SH-SY5Y cells. For this purpose we performed ALK immunoprecipitation after mAb treatment and investigated ALK ubiquitylation using anti ubiquitin antibody P4D1. We detected a basal ALK ubiquitylation, which was moderately but significantly increased by agonist mAb 46 stimulation. Altogether these results demonstrated that ALK activation by agonist mAb stimulation induced receptor phosphorylation thus allowing Cbl recruitment and receptor ubiquitylation (Fig. 6C), which is required for lysosome targeting.

**Discussion**

**In neuroblastoma cell lines SH-SY5Y ALK<sup>F1174L</sup> is intracellular and hypophosphorylated**

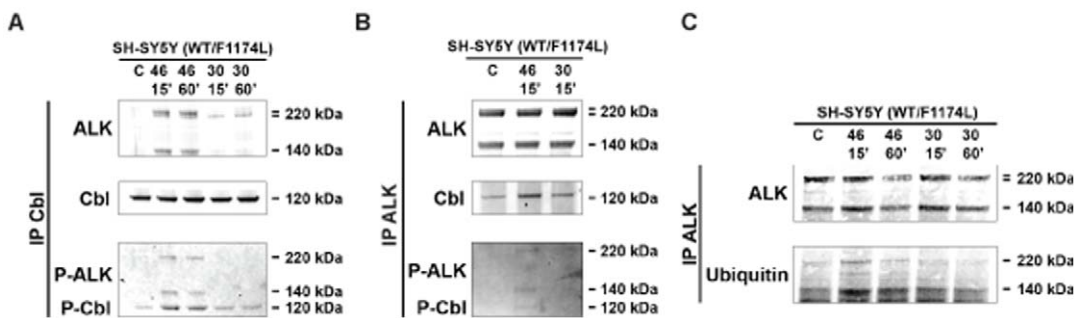
One of the striking results of this study was the lack of discernible difference in the ALK phosphorylation pattern in basal conditions as well as after mAb agonist stimulation in IMR-32 cells (ALK<sup>WT</sup>) and SH-SY5Y cells (ALK<sup>WT</sup>/ALK<sup>F1174L</sup>). This result, however, did not implicate that the mutated receptor does not

exhibit any basal constitutive activity. *In Vitro* kinase assay in SH-SY5Y and IMR-32 cells confirmed higher kinase activity of the ALK<sup>F1174L</sup> compared to the ALK<sup>WT</sup> (Data not shown). We also demonstrated that treatment with TAE684 inhibitor is able to rescue normal trafficking of ALK<sup>F1174L</sup> in SH-SY5Y cells, as previously established in other models [12]. *In Vitro* kinase assay and rescue of normal trafficking of the mutated receptor by kinase inhibitor TAE, strongly suggest that lack of basal ALK phosphorylation in SH-SY5Y cells is not reliable to a defect of kinase activity of the mutated receptor.

Ours results on ALK phosphorylation pattern in neuroblastoma cell line required two major comments. First, we used the general phosphorylated tyrosine antibody 4G10 to detected ALK phosphorylation. We could not exclude that ALK F1174L mutation induced receptor phosphorylation on specific tyrosines that are not recognized by the 4G10 antibody. However, detection of ALK increased phosphorylation after agonist mAb treatment confirmed that 4G10 is a valuable antibody to detect ALK phosphorylation. An investigation in depth of ALK activation and autophosphorylation mechanism induced by activating mutation in neuroblastoma cell line appears very important to better understand its role in neuroblastoma proliferation.

Second, our results illustrated that ALK<sup>F1174L</sup> expression are not necessarily link to increased ALK phosphorylation in neuroblastomas. SH-SY5Y neuroblastoma cell lines could not be representative to all the neuroblastoma cells bearing ALK<sup>F1174L</sup> mutation, and further studies of ALK phosphorylation with larger neuroblastoma samples and neuroblastoma cell lines will be required to confirm our results. However, comparison of ALK phosphorylation in SH-SY5Y and IMR-32 cells shed light on requirement to carefully investigate ALK phosphorylation in neuroblastoma, even after activating mutation identification.

It has been suggested that ALK activation and transforming capacity may be variable according to the mutation type. In particular, the ALK<sup>F1174L</sup> receptor has been shown to exhibit a higher oncogenic potential compared to the ALK<sup>R1275Q</sup> receptor [21]. Interestingly, we previously demonstrated that the ALK<sup>R1275Q</sup> receptor was proportionally more localized at the plasma membrane than the ALK<sup>F1174L</sup> mutant [14]. Both the mutation type and the expression level may therefore impact basal phosphorylation of ALK receptor and oncogenic potential of the mutated receptors.



**Figure 6. Kinase activation dependent down-regulation was regulated by Cbl ubiquitin ligase and ALK ubiquitylation.** **A.** SH-SY5Y cells were treated or not with either agonist mAb 46 or antagonist mAb 30 at 6 nM during 15 or 60 min. Cbl immunoprecipitates from 2 mg total cell lysate proteins were submitted to western-blot analysis, and then immunoblotted with polyclonal anti Cbl and ALK recruitment with polyclonal REAB antibody. Phosphorylated ALK and Cbl were revealed with 4G10 antibody. **B.** SH-SY5Y cells were serum starved for 16 hours and non-treated or treated with either agonist mAb 46 or antagonist mAb 30 at 6 nM during 15 or 60 min. ALK immunoprecipitates from 2 mg total cell lysate proteins were submitted to western-blot analysis and then immunoblotted with polyclonal REAB. Cbl recruitment was revealed with polyclonal anti Cbl antibody. Phosphorylated ALK and Cbl were revealed with 4G10 antibody. **C.** SH-SY5Y were serum starved for 16 hours, and then non-treated or treated with either mAb 46 or mAb 30 at 6 nM for 15 minutes or 60 minutes. ALK immunoprecipitates were submitted to Western-blot analysis as described.

doi:10.1371/journal.pone.0033581.g006

Interestingly, in SH-SY5Y cells, we detected at least twice as much ALK<sup>WT</sup> than ALK<sup>F1174L</sup> full length ALK receptor at 220 kD. Furthermore our analysis showed that the form at 140 kD did not contain any ALK<sup>F1174L</sup> indicating that the full length form of the mutated receptor essentially did not reach the membrane. Thus the truncated form at 140 kD appears to be a valuable marker of normal receptor trafficking. The mutated receptor was essentially retained in intracellular compartments with very low level of basal phosphorylation in agreement with previous data obtained in other cell systems [14]. Importantly, ALK inhibition by TAE684 restored normal trafficking of mutated receptor in this cell line as demonstrated by the detection by mass spectroscopy of ALK<sup>F1174L</sup> in the 140 kD form after TAE treatment. The absence of detectable phosphorylation of the mutated ALK receptor may rely on a permanent dephosphorylation by specific tyrosine phosphatases. Finally, we document that intracellular pools of ALK are degraded by the proteasome. Since kinase activation of ALK<sup>F1174L</sup> likely leads to its intracellular retention this phenomenon is particularly relevant for the mutated receptor.

### ALK internalization and intracellular trafficking in response to agonist and antagonist antibodies

In this report, we demonstrate for the first time that the full length ALK receptor can be internalized in response to both agonist and antagonist mAb. Indeed, it has been shown previously that a chimeric EGFR-ALK protein composed by the extracellular and transmembrane parts of the EGFR and the intracellular part of ALK [21] was neither internalized nor down-regulated in response to EGF, on contrary to the EGFR [22]. We demonstrate that the ALK receptor, upon activation by agonist mAb, is internalized followed by down-regulation in a lysosome dependent degradation. In contrast, antagonist mAb treatment induces ALK receptor internalization through addressing to recycling compartments. The EGFR-ALK chimera therefore does not fully mimic the native ALK receptor. ALK has been previously demonstrated to be able to recruit the ubiquitin ligase Cbl after mAb agonist stimulation [20]. We demonstrate that differences in ALK intracellular trafficking induced by agonist or antagonist mAb is due to the recruitment of Cbl by activated ALK, which in turn leads to ALK ubiquitylation. In the case of the EGF receptor endocytosis, the respective requirement of receptor dimerization, ubiquitylation and/or kinase activation is still controversial [23,24,25,26]. Our results on ALK internalization in response to antagonist mAb support the hypothesis that dimerization rather than kinase activity or ubiquitylation, is sufficient to induce receptor internalization.

### ALK degradation mechanism is dependent of receptor subcellular localization

In this work, we establish two different mechanisms of ALK degradation, depending on its cellular localization. The down-regulation of the cell surface ALK receptor resulting from its activation by agonist mAb is achieved by the lysosome. The recruitment of the ubiquitin ligase Cbl and ALK ubiquitylation appears to be essential regulatory events for triggering degradation by the lysosome. In contrast, the degradation of the ALK receptor retained in intracellular compartments relies on the proteasome. This is true in particular for the ALK<sup>F1174L</sup> mutant retained in the ER/Golgi compartments as a consequence of its constitutive activity. Intracellular retention induced by constitutive activation has already been described for others RTK and particularly investigated in case of the Flt3-ITD receptor [27]. A minor pool of cell surface Flt3-ITD receptors are degraded through Cbl

dependent ubiquitylation [28], whereas intracellular Flt3-ITD receptors are degraded by the proteasome by a largely unknown mechanism. Our data point out the importance of deciphering the proteasome targeting mechanism of misslocalized and constitutively activated RTK. Hsp90 inhibitors and HDAC inhibitors treatment, by stimulation of proteasome dependent degradation of misslocalized RTK in intracellular compartment, lead to cell proliferation inhibition [29]. Proteasome dependent degradation of mutated ALK suggests that use of Hsp90 inhibitors or HDAC inhibitors could be an attractive strategy to inhibit ALK dependent neuroblastoma proliferation.

The ALK receptor is an attractive therapeutic target in several human cancers, including neuroblastoma in which the full length ALK molecule may be activated by point mutations. This study provides novel insights into the mechanisms regulating sub-cellular localization and metabolism of full length receptor and deciphers more precisely the properties of mAbs on ALK activity and trafficking. Interestingly, anti-ALK mAb defined as agonist antibodies since they rapidly and transiently induced receptor phosphorylation were shown to trigger ALK degradation when cells were treated for several hours. We documented that ALK activity and localization are regulated by complex mechanisms. Further experiments will allow to determine the effects of antibodies targeting the ALK receptor on cellular proliferation and survival and establish whether they may be useful for a therapeutic issue in patients affected with neuroblastoma.

## Materials and Methods

### Cell lines

NIH 3T3 and SH-SY5Y cells were purchased from ATCC. IMR-32 and CHO cells were a kind gift of Dr. P. Kogner and Dr. C. Faure respectively. The transfected 3T3/WT and 3T3/F1174L cell lines were previously described [14]. CHO, IMR-32 and SH-SY5Y cells were maintained respectively with F12 medium, minimum essential medium (MEM) and F12/MEM (v/v) supplemented with 1× non-essential amino acids and 1 mM sodium pyruvate. Cell media were supplemented with 10% foetal calf serum (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France).

### Antibodies and reagents

We used the following commercial antibodies were: Mouse antiphosphotyrosine antibody 4G10 platinumium (Millipore) mouse anti-ubiquitin antibody P4D1 and rabbit anti-Cbl (Santa Cruz, Heidelberg, Germany)

Rabbit polyclonal anti-ALK (REAB) and monoclonal antibodies anti-ALK (mAb 15, 30, 46, 48) have been previously described [17]. The selective ALK kinase inhibitor NPV-TAE684 was synthesized following the formula described in [30]. Lactacystin, Bafilomycin A1, Monensin were purchased from Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France.

### Western blotting and immunoprecipitation

Cells were serum starved for 16 hours and then treated with 1 µg/ml of mAb 46, or mAb 48 and with 4 µg/ml of mAb 30. Cells were treated with 50 nM of NVP-TAE684 for 48 h or 30 min before the addition of mAbs. Lactacystin and Bafilomycin were used respectively at 10 µM and 0.25 µM for 16 hours in basal conditions or 15 min in pretreatment before mAb treatment.

Cells were washed rapidly with cold phosphate buffer saline (PBS) buffer (containing 5 mM sodium fluoride and 100 mM sodium orthovanadate) and were lysed in a cold RIPA buffer as described in [18]. Lysate were clarified by centrifugation at 21 000 g for 10 min at 4°C. Protein concentration was determined

by the method of Bradford using the micro BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce). Immunoprecipitation and Western-blot analysis were performed as described in [14].

### Biotinylation assay

Biotinylation experiments were performed as described in [14] using sulfo-NHC-LC-Biotin in PBS (Pierce). Biotinylated ALK was detected with IRDye800CW-coupled streptavidin (1/10000, Rockland, ME, USA), and total ALK with anti-ALK REAB and secondary anti-rabbit IgG IRDye700DX-coupled antibodies.

### Immunofluorescence

All immunofluorescence studies were performed at the Institut du Fer à Moulin imaging facilities. CHO cells were transfected with pcDNA3-ALK WT or F1174L and then cultured for two days. Media were replaced with cold media containing 1 µg/ml of mAb (46 or 30) and/or transferrin coupled to Alexa Fluor 546 at 50 µg/ml and placed at 4°C for 10 min. Cells were pre-treated 30 min 100 µM of Monensin prior incubation with mAb at 4°C for 10 minutes. Cold media with ligand were removed and replaced by hot media and cells were replaced at 37°C in a time course manner (15–180 min). Cells were fixed with paraformaldehyde for 15 min at room temperature and then permeabilized in PBS 0.5% Triton X100 5 min. Fixation was quenched with PBS-Glycine 0.1 M for 15 min, and then cells were blocked with PBS-BSA 1.5% during 1 h. ALK bound mAbs were then detected with anti-mouse IgG coupled to Alexa Fluor 488 1/400, molecular probes) during 1 hour. After washing in PBS, cells were mounted in Vectashield (Vector lab). Confocal laser microscopy was performed using a TCS SP2 confocal microscope (Leica). Images were assembled using Adobe Photoshop software.

### RT-PCR and sequencing

Total RNA were extracted from SH-SY5Y or IMR-32 cells with RNeasy extraction kit (Quiagen) according to manufacturer instruction. cDNA was synthesized from RNA by reverse transcriptase and oligodT primer. ALK cDNA sequence comprising c3353 was then amplified by PCR using Taq DNA polymerase and the following primers

Primer F: 5'ATGACTGTGTTACCGCCGGAAGC-3'

Primer R: 5'TTAAGTGGCAAGCATGGCACAGC-3'.

Presence of ALK mutation was determined by PCR products sequencing.

### Mass spectrometry analysis

a) 1D SDS-PAGE separation and Nano-LC-MS/MS Analysis

After immunoprecipitation samples were separated on a 4–12% acrylamide SDS-PAGE gel. Proteins were visualized by coomassie blue staining (Labsafe GEL Blue, G-Biosciences). Gel slices were reduced, alkylated and subjected to digestion with trypsin (Sequence Grade Modified, Roche Diagnostics) as previously described [31].

The peptides mixtures were analyzed by nano-LC-MS/MS using an Ultimate3000 system (Dionex S. A.) coupled to an LTQ-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Data-dependent acquisition was performed on the LTQ-Orbitrap mass spectrometer in the positive ion mode. Survey MS scans were acquired in the orbitrap on the 400–1100 m/z range with the resolution set to a value of 60 000. Each scan was recalibrated in real time by co-injecting an internal standard from ambient air into the C-trap (‘lock mass option’). The 5 most intense ions per survey scan were selected for CID fragmentation and the resulting fragments were analyzed in the

linear trap (LTQ). The parent mass list included the m/z value of the two peptides at 497.28 Da and 514.28 Da. Target ions already selected for MS/MS were dynamically excluded for 60 s. Data were acquired using the Xcalibur software (version 2.0.5).

b) Database Search and Data Analysis

The resulting spectra were then analyzed via the Mascot™ Software created with Proteome Discoverer (version: 1.2.0.92, Thermo Scientific) using the ‘‘homo sapiens’’ (human) non-redundant database of the National Center for Biotechnology Information (National Library of Medicine, Bethesda 28<sup>th</sup> February 2011, 235506 sequences). Carbamidomethylation of cysteines, oxidation of methionine and protein N-terminal acetylation were set as variable modifications for all Mascot searches. Specificity of trypsin digestion was set for cleavage after Lys or Arg except before Pro, and one missed trypsin cleavage site was allowed. The mass tolerances in MS and MS/MS were set to 2 ppm and 0.8 Da respectively, and the instrument setting was specified as ‘‘ESI-Trap.’’ All data were validated by using myProMS (Proteomics, 2007).

c) Label-free Quantification

Quantification of peptide FNHQIVR (wt) and LNHQIVR (mutant) in band 220 kD and 140 kD. To quantify the ALK proteins (WT/F1174L), the extracted ion chromatogram (XIC) signal of the well characterized tryptic peptide ions (wt and mutant) was manually extracted from the MS survey of nano-LC-MS/MS raw files using the Xcalibur software. XIC areas were integrated in Xcalibur under the QualBrowser interface using the ICIS algorithm. Mean values and S.D. were calculated for quadruplicate measurements.

## Supporting Information

**Figure S1** (A) Shown are the MS/MS fragmentation spectra of the tryptic peptides FNHQIVR (wt, aa 1174–1181) and LNHQIVR (mutant) of Alk. (B) Signal abundance plot of the synthetic wt and mutant peptides at different concentrations - synthetic mutant (LNHQIVR) black circle and synthetic wt (FNHQIVR) red triangle were mixed in different ratios (from 0.5 fmol to 50 fmol on column) and analyzed on a QSTAR in MS mode. The coefficient of variation in ionization efficiency of the wt/mutant was used to correct the relative abundance correspond to 0.845.

(TIF)

**Figure S2 Cell surface proteins of SH-SY5Y cells were biotinylated as described in Methods.** ALK immunoprecipitates from 1.5 mg of total cell lysate proteins were immunoblotted with Streptavidine coupled to Dylight 800 for cell surface ALK detection (in green) and total ALK were detected with polyclonal anti-ALK (REAB) and secondary anti-rabbit IgG coupled to IRdye700 (in red).

(TIF)

## Acknowledgments

We are particularly indebted to Dr J.A.Girault for his constant support and helpful discussions.

## Author Contributions

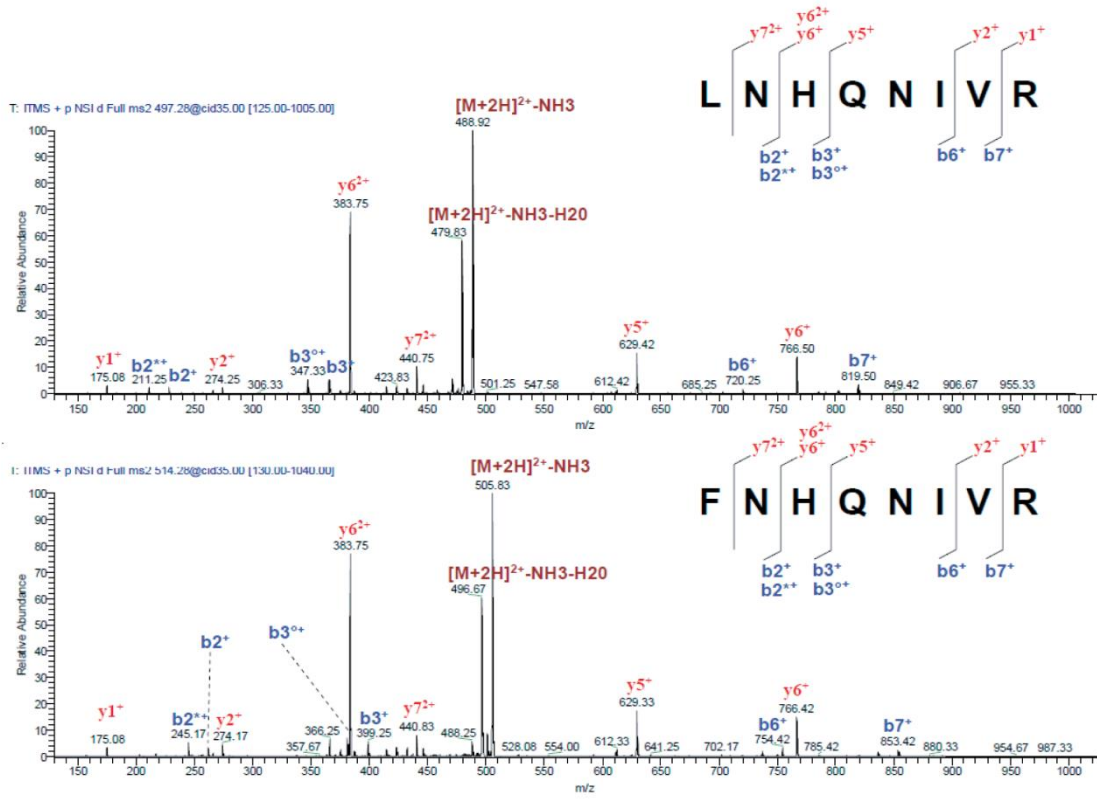
Conceived and designed the experiments: PM DL IJL MV. Performed the experiments: PM AC FD JD TI MCB BL. Analyzed the data: PM AC IJL MV. Contributed reagents/materials/analysis tools: BH RHP OD IJL. Wrote the paper: PM IJL MV.

## References

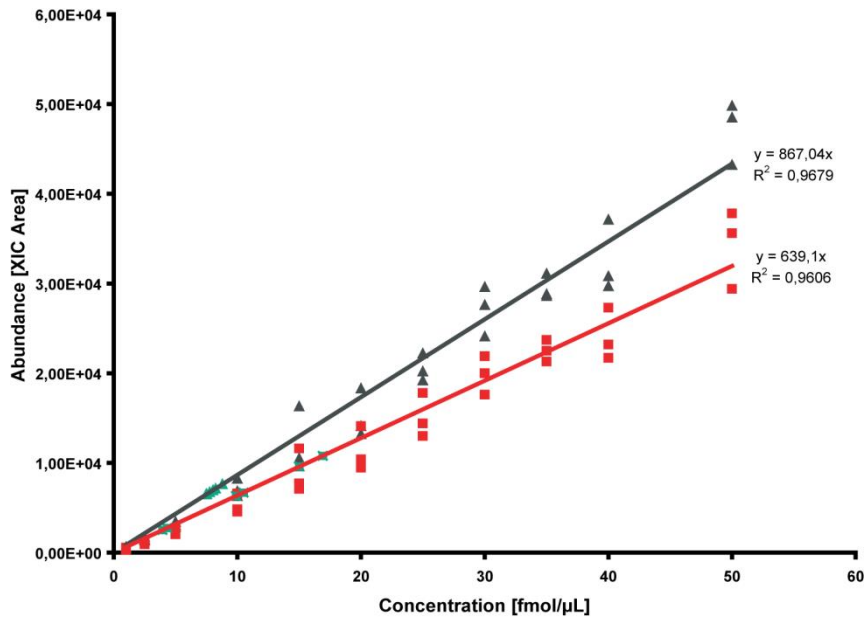
- Iwahara T, Fujimoto J, Wen D, Cupples R, Bucay N, et al. (1997) Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene* 14: 439–449.
- Morris SW, Naevø C, Mathew P, James PL, Kirstein MN, et al. (1997) ALK, the chromosome 2 gene locus altered by the t(2;5) in non-Hodgkin's lymphoma, encodes a novel neural receptor tyrosine kinase that is highly related to leukocyte tyrosine kinase (LTK). *Oncogene* 14: 2175–2188.
- Loren CE, Englund C, Grabbe C, Hallberg B, Hunter T, et al. (2003) A crucial role for the Anaplastic lymphoma kinase receptor tyrosine kinase in gut development in *Drosophila melanogaster*. *EMBO Rep* 4: 781–786.
- Reiner DJ, Ailion M, Thomas JH, Meyer BJ (2008) *C. elegans* anaplastic lymphoma kinase ortholog SCD-2 controls dauer formation by modulating TGF-beta signaling. *Curr Biol* 18: 1101–1109.
- Palmer RH, Vernersson E, Grabbe C, Hallberg B (2009) Anaplastic lymphoma kinase: signalling in development and disease. *Biochem J* 420: 345–361.
- Chiarle R, Voena C, Ambrogio C, Piva R, Inghirami G (2008) The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nat Rev Cancer* 8: 11–23.
- Milkiewicz KL, Ott GR (2010) Inhibitors of anaplastic lymphoma kinase: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*.
- Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, et al. (2011) Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 363: 1693–1703.
- Chen Y, Takita J, Choi YL, Kato M, Ohira M, et al. (2008) Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature* 455: 971–974.
- Caren H, Abel F, Kogner P, Martinsson T (2008) High incidence of DNA mutations and gene amplifications of the ALK gene in advanced sporadic neuroblastoma tumours. *Biochem J* 416: 153–159.
- George RE, Sanda T, Hanna M, Frohling S, Luther W, 2nd, et al. (2008) Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature* 455: 975–978.
- Janoueix-Lerosey I, Lequin D, Brugieres L, Ribeiro A, de Pontual L, et al. (2008) Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature* 455: 967–970.
- Mosse YP, Laudenslager M, Longo L, Cole KA, Wood A, et al. (2008) Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature* 455: 930–935.
- Mazot P, Cazes A, Boutterin MC, Figueiredo A, Raynal V, et al. (2011) The constitutive activity of the ALK mutated at positions F1174 or R1275 impairs receptor trafficking. *Oncogene* 30: 2017–2025.
- Wheeler DL, Huang S, Kruser TJ, Nechrebecki MM, Armstrong EA, et al. (2008) Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: role of HER (ErbB) family members. *Oncogene* 27: 3944–3956.
- Martinelli G, Soverini S, Iacobucci I, Baccarani M (2009) Intermittent targeting as a tool to minimize toxicity of tyrosine kinase inhibitor therapy. *Nat Clin Pract Oncol* 6: 68–69.
- Moog-Lutz C, Degoutin J, Gouzi JY, Frobert Y, Brunet-de Carvalho N, et al. (2005) Activation and inhibition of anaplastic lymphoma kinase receptor tyrosine kinase by monoclonal antibodies and absence of agonist activity of pleiotrophin. *J Biol Chem* 280: 26039–26048.
- Mathivet T, Mazot P, Vigny M (2007) In contrast to agonist monoclonal antibodies, both C-terminal truncated form and full length form of Pleiotrophin failed to activate vertebrate ALK (anaplastic lymphoma kinase)? *Cell Signal* 19: 2434–2443.
- Madhus IH, Stang E (2009) Internalization and intracellular sorting of the EGF receptor: a model for understanding the mechanisms of receptor trafficking. *J Cell Sci* 122: 3433–3439.
- Motegi A, Fujimoto J, Kotani M, Sakuraba H, Yamamoto T (2004) ALK receptor tyrosine kinase promotes cell growth and neurite outgrowth. *J Cell Sci* 117: 3319–3329.
- Piccinini G, Bacchiocchi R, Serresi M, Vivani C, Rossetti S, et al. (2002) A ligand-inducible epidermal growth factor receptor/anaplastic lymphoma kinase chimera promotes mitogenesis and transforming properties in 3T3 cells. *J Biol Chem* 277: 22231–22239.
- Serresi M, Piccinini G, Pierpaoli E, Fazioli F (2004) A ligand-inducible anaplastic lymphoma kinase chimera is endocytosis impaired. *Oncogene* 23: 1098–1108.
- Bertelsen V, Sak MM, Breen K, Rodland MS, Johannessen LE, et al. (2011) A Chimeric Pre-ubiquitinated EGF Receptor is Constitutively Endocytosed in a Clathrin-Dependent, but Kinase-Independent Manner. *Traffic* 12: 507–520.
- Huang F, Goh LK, Sorkin A (2007) EGF receptor ubiquitylation is not necessary for its internalization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 16904–16909.
- Huang F, Kirkpatrick D, Jiang X, Gygi S, Sorkin A (2006) Differential regulation of EGF receptor internalization and degradation by multiubiquitylation within the kinase domain. *Mol Cell* 21: 737–748.
- Wang Q, Villeneuve G, Wang Z (2005) Control of epidermal growth factor receptor endocytosis by receptor dimerization, rather than receptor kinase activation. *EMBO Rep* 6: 942–948.
- Schmidt-Arras DE, Bohmer A, Markova B, Choudhary C, Serve H, et al. (2005) Tyrosine phosphorylation regulates maturation of receptor tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* 25: 3690–3703.
- Buchwald M, Pietschmann K, Muller JP, Bohmer FD, Heinzl T, et al. (2010) Ubiquitin conjugase UBCH8 targets active FMS-like tyrosine kinase 3 for proteasomal degradation. *Leukemia* 24: 1412–1421.
- George P, Bali P, Annavarapu S, Scuto A, Fiskus W, et al. (2005) Combination of the histone deacetylase inhibitor LBH589 and the hsp90 inhibitor 17-AAG is highly active against human CML-BC cells and AML cells with activating mutation of FLT-3. *Blood* 105: 1768–76.
- Galkin AV, Melnick JS, Kim S, Hood TL, Li N, et al. (2007) Identification of NVP-TAE684, a potent, selective, and efficacious inhibitor of NPM-ALK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 270–275.
- Fevrier B, Vilette D, Archer F, Loew D, Faigle W, et al. (2004) Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 9683–9688.

# Supplementary Figure 1

a



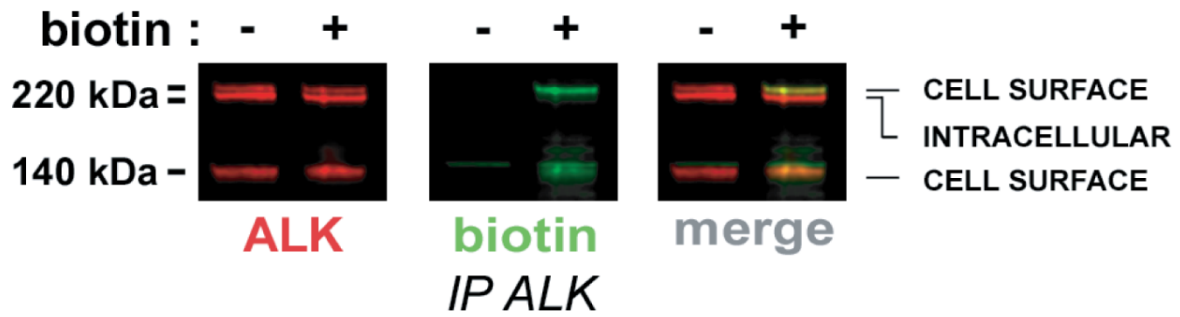
b





# Supplementary Figure 2

## SH-SY5Y (WT/F1174L)



## RESUME

Le gène *ALK* code pour un récepteur à activité tyrosine kinase exprimé principalement dans le système nerveux central et périphérique au cours du développement chez le mammifère. Ces informations font suspecter un rôle développemental du récepteur ALK bien que ses fonctions précises ne sont pas connues. De la même manière, ses ligands et les voies de signalisation qui lui sont associées demeurent mal caractérisés. En 2008, des mutations ponctuelles du gène *ALK* ont été identifiées dans des formes sporadiques et familiales de neuroblastome. Deux hotspots de mutation sont situés dans le domaine tyrosine kinase. Ces travaux de thèse ont permis d'étudier l'implication du gène *ALK* dans l'oncogenèse du neuroblastome sous des aspects cellulaires, génomiques et fonctionnels.

L'étude de la régulation de l'activation et de l'adressage de la protéine ALK a révélé qu'à la différence des récepteurs sauvages, l'activation constitutive conduit à une rétention intracellulaire associée à une maturation incomplète des récepteurs mutés. Par ailleurs, la caractérisation complète du locus *ALK* dans le neuroblastome a mis en évidence une fréquence élevée de réarrangements chromosomiques. Ce travail a notamment identifié un réarrangement chromosomique conduisant à l'expression d'un variant du récepteur ALK tronqué pour une partie du domaine extracellulaire. Ce variant, associé à l'agressivité tumorale, est activé de façon constitutive et présente des propriétés oncogéniques. Enfin, l'analyse de souris knock-in exprimant les mutations  $Alk^{F1178L}$  et  $Alk^{R1279Q}$  a révélé un rôle majeur du gène *Alk* dans le développement du système nerveux sympathique. En effet, ces souris présentent une hyperplasie des ganglions sympathiques mise en place chez l'embryon et associée à une augmentation de la prolifération cellulaire à la naissance. Ce travail a aussi mis en évidence la coopération oncogénique *in vivo* entre les mutations du gène *Alk* et la surexpression du gène *MYCN* dans le neuroblastome. Les tumeurs générées chez les souris partageant ces deux altérations se développent après une courte période de latence et avec une pénétrance complète. L'analyse des tumeurs a mis en évidence des propriétés conférées aux tumeurs par les mutations du gène *Alk*. En effet, ces tumeurs expriment des marqueurs cholinergiques et montrent des signes de différenciation. Ces animaux permettent de mieux comprendre le rôle du gène *ALK* dans l'oncogenèse du neuroblastome et constituent de bons modèles d'étude préclinique des neuroblastomes dépendants de ALK.