



HAL
open science

Contrôle de l'expression de Bcl-2 dans les lymphomes anaplasiques à grandes cellules par la protéine HuR en réponse au crizotinib : impact sur l'apoptose et l'autophagie

Avédis Torossian

► **To cite this version:**

Avédis Torossian. Contrôle de l'expression de Bcl-2 dans les lymphomes anaplasiques à grandes cellules par la protéine HuR en réponse au crizotinib : impact sur l'apoptose et l'autophagie. Médecine humaine et pathologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2017. Français. NNT : 2017TOU30190 . tel-01992115

HAL Id: tel-01992115

<https://theses.hal.science/tel-01992115v1>

Submitted on 24 Jan 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par:

Avédis TOROSSIAN

Le 19 Septembre 2017

Titre:

**Contrôle de l'expression de Bcl-2 dans les Lymphomes Anaplasiques à
Grandes Cellules par la protéine HuR en réponse au crizotinib :
impact sur l'apoptose et l'autophagie.**

Ecole doctorale et discipline ou spécialité:

ED BSB: Cancérologie

Unité de recherche:

Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse – INSERM UMR 1037

Directrice de Thèse:

Pr Estelle Espinos

Jury:

Pr Laurence Lamant

Pr Karen Leroy

Dr Stéphane Manenti

Dr Sophie Patingre

Dr Michele Trabucchi

« Le succès consiste à aller d'échecs en échecs sans perdre son enthousiasme. »

Winston Churchill

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier très profondément le **Pr. Pierre Brousset** pour m'avoir fait l'honneur de m'accueillir au sein de son équipe de recherche, ainsi que pour son soutien constant et bienveillant à mon égard, sans lequel je n'aurais pu mener à bien mes projets.

Je souhaite également remercier chaleureusement tous les membres de mon jury de thèse, le **Pr. Karen Leroy**, le **Dr. Sophie Pattingres** et le **Dr. Michele Trabucchi**, ainsi que le **Pr. Laurence Lamant** et le **Dr. Stephane Manenti**, pour avoir consacré du temps à juger ce travail. Un grand merci pour l'intérêt dont vous avez témoigné à l'égard de ces travaux, ainsi que pour l'éclairage que vous avez apporté sur eux lors de la discussion scientifique ayant suivi ma présentation : sur bien des aspects vous m'avez permis de percevoir ces résultats avec un regard différent, et un recul que je n'aurais pu acquérir seul. Je tiens également à ajouter que j'ai pris beaucoup de plaisir à discuter avec vous, et j'espère que cela est réciproque !

Estelle, merci infiniment de m'avoir offert l'opportunité de travailler avec toi, en Master puis en thèse. Merci d'avoir eu confiance en moi et en mes capacités pour mener à bien ce travail, et de m'avoir soutenu coute-que-coute tout au long de ces années de parcours commun. Merci également de m'avoir supporté malgré mes nombreux défauts, mes capacités d'organisation parfois relatives, et mon insupportable tendance à me perdre dans des phrases déraisonnablement longues (comme celle-ci par exemple), lors de nos très nombreuses et très riches conversations. J'espère que les projets très prometteurs qui t'accaparent en ce moment porteront rapidement leurs fruits, et je me réjouis pour les futurs étudiants qui auront la chance de t'avoir comme professeur à la faculté, comme je l'ai eue moi-même auparavant. Enfin, j'espère que nous pourrions de nouveau travailler ensemble dans le futur !

Je souhaite également remercier les nombreuses personnes qui m'ont permis d'avancer dans mon projet de thèse, et tout particulièrement **Julie Frentzel** et **Sylvie Giuriato**, pour leur aide inestimable dans le domaine de l'autophagie, les outils et le savoir-faire qu'elles m'ont transmis : la réalisation de ce travail n'aurait pas été possible sans elles. Nos nombreuses discussions scientifiques auront été pour moi un vrai plaisir. Merci également à **Géraldine Mitou**, qui a su éveiller chez nous tous la passion de l'autophagosome ! Un immense merci également au pauvre **Nicolas Broin** pour l'aide considérable qu'il m'a apporté, et pour les nombreuses souffrances et western blots que l'avenir lui réserve afin que notre travail commun puisse être publié : c'est à toi de jouer à présent ! Un grand merci aussi à **Yassine El Bakkouri**, qui aura été d'une aide importante lors de son passage en Master : j'espère que la chance te sourira et je ne doute pas de devoir t'appeler Dr. El Bakkouri d'ici peu, car tu es réellement quelqu'un de passionné. Enfin, je remercie également **Cécile Vindis** et **Hripsimé Nahapetyan** pour notre collaboration qui, bien qu'elle n'ait pas abouti aux résultats que nous espérions, s'est montrée particulièrement enrichissante pour moi.

Je remercie d'ailleurs doublement Cécile qui, avec **Patrice Vitali**, a accepté de subir mes interminables présentations lors de mes comités de thèse : merci à vous deux pour vos précieux conseils, scientifiques mais aussi personnels.

De même, merci à **Stefania Millevoi** et **Anne Cammas** d'avoir toujours été disponibles lorsque j'avais besoin d'être guidé dans le monde mystérieux des protéines de liaison aux ARN. Merci également à **David Müller** de m'avoir consacré des journées entières pour me former à la légendaire technique secrète du polysome-profiling transmise, dit-on, de bouche à oreille dans l'équipe 6.

Enfin, je tiens à remercier sans exception tous les membres de l'équipe 7 (présents, passés ou futurs) que j'ai eu la chance de pouvoir côtoyer au long de mon parcours. Vous allez réellement me manquer !

A commencer par...

Céli... pardon, **Phicel**, cela aura vraiment été une joie et une chance de travailler dans le même bureau que toi pendant ces trois ans. Je le pense sincèrement : il est très rare de rencontrer des gens aussi profondément gentils. Heureusement que tu étais là, car ça aurait été beaucoup plus pénible sans ton

humour permanent, et parfois involontaire en raison des difficultés que tu éprouves à refouler tes origines belges, origines qui ressurgissent régulièrement de manière étonnante et/ou inadéquate. Il faut que tu apprennes à t'accepter ! Sache que je ne t'en veux pas d'avoir tenu un fichier documentant toutes les fois où je me suis illustré par mon sens de l'humour « approximatif ». Mais Dieu te jugera. Toutes nos conversations (surtout les plus incohérentes) resteront pour moi les meilleurs souvenirs de ma thèse ! Cela et le fantastique mug personnalisé que tu m'as offert pour Noël, où je figure à l'effigie d'un dictateur asiatique. Merci, vraiment, mais il ne fallait pas. Quelques derniers petits conseils, en vrac : soit sûre d'avoir toujours assez de balles de tennis à disposition, et prends gare aux écureuils qui, sous leurs airs de pe... mais je m'égare. J'espère que tu obtiendras ce que tu souhaites, mais je n'ai aucun doute sur ton succès futur car tu es brillante. Tout ce que tu souhaites, je te le souhaite ! Y compris de ne jamais te faire piquer LA place de parking.

p.s : J'en profite également pour remercier également le célèbre **Martialou_22**, dont tu gères la succursale à l'oncopôle : chef, le buffet était délicieux !

Frau Frentzel, je sais bien qu'intérieurement tu m'as maudit bien souvent quand tu étais encore dans notre bureau de l'oncop... hum, du futur CFCC (Centre Frentzel Contre le Cancer), mais nos petits fou-rires semi-dépressifs du vendredi soir m'auront, personnellement, énormément manqué pendant cette dernière année. Vraiment. J'espère que tu as trouvé la paix intérieure dans ton sanctuaire de la douce ville de Gland en Suisse, et tu sais que j'attends toujours avec impatience tes prochains snaps sur Yu-Gi-Oh. Oui, il fallait que ça devienne public, je te demande pardon, mais je ne pouvais plus garder ça pour moi.

Nina, je n'ai plus honte à présent et je peux te l'avouer : j'ai pendant un temps porté un gilet pare-balle sous mon pull car tu me terrorisais. Au final, on aura tout de même bien rigolé ensemble (en tout cas au moins moi !) et je te remercie encore pour m'avoir permis de participer à ce qui fut probablement la partie de poker la plus... bizarre ?! de l'histoire de l'humanité. Les cartes sentent encore le vin, pour information. Permet moi également de te féliciter pour ta victoire éclatante à Koh-Lanta, tu auras vaincu un adversaire qui n'était visiblement pas à la hauteur ! Garde fermement le cap et continue d'avancer.

Morgane, mon alliée. A moult reprises, tu m'as trahis, mais que devais-je espérer d'autre d'une loyauté de mercenaire, achetée à coup de pot de Nutella ? Malgré cette vicieuse tendance à la félonie, je t'ai déjà dit toutes les qualités que je te trouve scientifiquement. J'ajouterais donc seulement que, humainement, j'ai beaucoup apprécié te côtoyer pendant ces 2 ans qui, sans ta bonne humeur, ton humour et ta camaraderie, n'auraient vraiment pas été les mêmes. J'attends maintenant avec impatience de lire les futurs articles du Docteur Gourvest ! Et je ne doute pas qu'il y en aura beaucoup.

Nico. Nikola Burosaki-san. Le Concepteur. Le Déformeur, l'Imbriqueur. Bruce Wayne. Spike. Merci d'avoir intégré l'équipe !! Sans toi, le taux de testostérone dans le bureau commençait à avoisiner des seuils dangereusement bas et, si tu avais tardé d'avantage à nous rejoindre, je n'ai aucune certitude quant à ce qu'il serait advenu de moi ! Je regrette seulement que l'on ne se soit connu que vers la fin de ma thèse, et tu auras été un vrai compagnon d'arme dans une période où tous les voyants commençaient à s'affoler de mon côté. Même si tu triches (soit disant « à ton insu »). Je te souhaite beaucoup de bonheur avec le jeune héritier du clan Burosaki, le petit bonhomme a probablement le meilleur des papas. N'oublie pas de l'initier aux fantastiques acrobaties que j'ai pu te voir réaliser dans le meilleur court-métrage de 2017.

Manon, tu t'es engagée dans une voie longue et périlleuse lorsque tu as signé pour ces 3 ans de thèse. Mais ce n'était pas une raison pour me piquer mon bureau !! Blague à part, je te souhaite du courage et de la chance, car ces trois années sont longues et difficiles, mais passent aussi, paradoxalement, très vite. Godspeed !

Christian, je suis heureux que tu aies rejoins l'équipe, car sans toi ces trois années de thèse seraient passées beaucoup plus lentement ! Tu es à l'origine de certains des plus grands fou-rires de ma thèse.

Seul effet secondaire : j'ai développé un véritable trouble obsessionnel compulsif qui me pousse à vérifier si tu n'as pas scotché le capteur de ma souris ou changé le langage de mon clavier, toutes les 5 minutes en moyenne. Merci pour le « serrage de coudes » entre mâles : tu as été d'un soutien total et permanent envers moi et ça, je ne l'oublierais pas. J'essaierais d'honorer notre petite tradition du café de l'après-midi à l'oncopole aussi longtemps que je le pourrais et je te souhaite tous les succès possibles pour tes projets en cours et futurs.

Tata Cathy, oh toi ma tata bretonne, qui m'a souri et nourri quand j'étais dans le besoin. Je t'en ai donné la parole, un jour je l'écrirais, cette chanson ! Je t'attendrais sans doute au détour d'une rue, nonchalamment adossé à un muret, guitare en main et cuissardes chaussées, pour te chanter « La Ballade de Cathy ». J'espère juste ne pas te faire sursauter cette fois-ci, ça serait vraiment trop bête.

Annabelle, je tiens réellement à te féliciter pour ton incroyable performance dans ce qui sera sans doute le « Citizen Kane » des années 2010s, je parle évidemment du fabuleux court-métrage intitulé « Cérémonie des Avédis awards ». Ta capacité à analyser sans perdre une seule seconde ton sang-froid ce poil « noir et tout tortillé » m'a tout simplement scotché. Mais les poils de ma barbe ne sont pas tortillés, j'insiste.

Coralie, tout d'abord je tiens à déclarer que tu n'as décidément rien compris aux mathématiques ! Blague à part, je dois dire que te rencontrer (et parfois même te confronter) aura réellement été particulièrement enrichissant pour moi, et tu m'as permis de me développer, scientifiquement mais pas seulement ! J'espère que tous tes efforts finiront par enfin te mener à la place que tu mérites vraiment d'occuper.

Marina, j'ai beaucoup apprécié te côtoyer car tu es une personne à la fois très gentille et extrêmement drôle et, j'ai eu la chance de pouvoir bénéficier de tes conseils scientifiques, qui étaient toujours très pertinents. J'espère que toi et Morgane irez loin ensemble et que vous publierez rapidement cette jolie histoire sur LONA. En attendant, je te dis « Peace n'flex » !

Margherita, merci d'avoir commencé à m'initier au sicilien, une langue qui, paraît-il, serait plus en adéquation avec mon facies que notre belle langue de Molière (bien que pour l'instant l'intégralité de mon vocabulaire ne se limite encore qu'à « la famigghia »). Je regrette de ne pas avoir eu la chance de pouvoir te connaître d'avantage, mais j'ai passé suffisamment de temps avec toi pour t'apprécier réellement. Courage pour ton projet, et pour la suite de ton parcours ! Je sais d'avance que tu iras loin.

Sylvie, ta présence a été une chance. Merci pour tes nombreux conseils ainsi que tout le temps que tu m'as consacré (sans jamais compter, même à distance), et ce depuis 4 ans déjà. Ton aide m'aura été très précieuse, que ce soit pour le Master, le concours, et encore récemment notre article : en somme, en permanence ! Merci également pour ton extrême gentillesse, et ta bonne humeur constante : je n'ai pas souvenir de t'avoir jamais vu de mauvaise humeur. Je te souhaite tous les succès dans tes projets scientifiques avec Domenico, et je ne doute pas qu'ils portent bientôt leurs fruits !

Laurence, je te remercie profondément car, même si tu l'ignores, tu m'as souvent redonné du courage par tes mots gentils et élogieux à mon égard... j'espère m'en montrer digne. J'espère comme toi parvenir un jour à réaliser la synthèse de la science, de l'art médical, et de l'enseignement. En attendant, je te dis à très bientôt dans les amphithéâtres de la faculté de médecine des allées Jules Guesde !

Fabienne, tu as toujours été bienveillante et de bon conseil pour moi. J'ai pu bien souvent profiter de ton recul et de ton expérience, qu'il s'agisse de science pure, ou de l'article, et je t'en suis sincèrement reconnaissant. J'ai appris à prendre ton pragmatisme en modèle, et j'espère un jour posséder la même efficacité redoutable que toi pour mes projets futurs ; je te souhaite un avenir plein de beaux succès !

Ouafa, Tata Ouafinette, merci de t'être autant préoccupée de mon bien-être et ma santé depuis 4 ans déjà (eh oui, nous deux, ça remonte !). Promis, j'essaie de ne plus sauter le repas de midi, et de boire moins de café. Tout ce que je peux dire, c'est que tu vas vraiment me manquer car tu es l'une des personnes les plus chaleureuses que je connaisse. J'espère que tu obtiendras ce que tu souhaites, car tu le mérites !

Laure, tu auras réussi l'exploit de me faire danser déguisé en soubrette japonaise. Et le pire, c'est qu'il existe une vidéo qui en atteste. Je ne vois pas quoi dire de plus, si ce n'est ajouter que tu mérites également le respect -de tous- pour être parvenue à établir un lieu de culte religieux dans notre établissement pourtant si fermement scientifique : un temple dédié à une religion (l'Estellisme) qui a vu son panthéon s'élargir au fil des années (Krishnou, dieu hindou du reticulum endoplasmique et Sainte Rita, sauveuse des causes désespérées). Sache qu'il constitue aujourd'hui un lieu de pèlerinage obligatoire pour de nombreux fidèles.

Camille, je te remercie pour ton inestimable héritage qui m'aura bien simplifié la vie : je parle évidemment de ton miraculeux protocole de design des amorces. Et oui, promis j'ai retenu, on rince d'abord à l'eau PUIS à l'éthanol, qui fixe.

Etienne, tu m'as offert ma plus belle opportunité artistique. Le rôle de ma vie. Zeus sur l'Olympe. Ces quelques instants auront été pour moi l'occasion éphémère de goûter à la vie dans les hautes sphères, mais je garde conscience (amère) que jamais nous ne serons du même monde, surtout depuis que tu fréquente Hug Jackman et le couple Clinton.

Domenico, j'ai beaucoup apprécié les quelques mois que tu as passé avec nous dans le bureau C3.25, l'épicentre de toutes les tempêtes et le lieu de tous les excès. Mais tu incarnes aussi cet épicentre à ta façon, car le test de personnalité s'est montré formel : « you are the heart of the party ».

Pour finir j'aimerais remercier toutes les personnes qui m'ont soutenu durant ma thèse, et contribué directement ou indirectement à ce travail.

Manon Farcé, qui a su supporter avec un professionnalisme et une patience exemplaires mes incompétences diverses et régulières au plateau de cytométrie. Manon, je te demande pardon.

Pauline Deshors et **Justine Noujarède**, pour m'avoir offert leur bonne humeur quotidienne à l'heure du repas. Voire même directement offert le repas (Pauline, tu es trop aisément manipulable).

Nos voisins, l'équipe 9 de **J-J Fournié** : votre présence à l'étage fait de celui-ci le meilleur où travailler dans ce bâtiment ! **Don-Marc**, **Guillaume** et Monsieur l'inénarrable **Cédric « lymphomane » Rossi**, vous allez me manquer. Don-Marc, je ne te souhaite que des succès dans tes projets de recherche, Guillaume j'ai du respect et de l'admiration pour ton courage, Cédric, je sais avec certitude que bientôt, dans les facultés de médecine, on étudiera le lymphome de Rossi (que tu ne vas pas tarder à découvrir).

Mes camarades thésards, **Michael**, **Damien**, **Camille**, **Geoffrey**, **Augustin** et **Valérie**. Michael, j'en profite pour te signaler que la violence inouïe avec laquelle tu lances les fléchettes est certes très spectaculaire, mais aussi un petit peu inquiétante. Ce n'est peut-être qu'une simple coïncidence mais saches qu'aux mêmes jours et heures que ceux des impacts, on a ressenti des secousses au Japon et des bâtiments se sont fissurés en Inde. Mais merci tout de même pour ces moments. Damien, tu nous as fait découvrir à tous un fantastique établissement cette année (Ben's). Personnellement, je ne suis pas encore tout à fait convaincu qu'il ne serve pas à couvrir d'obscures opérations de la pègre locale, mais il faudra quand même remettre ça. Et de toute manière, on risque d'être amenés à travailler ensemble

très vite, car il reste encore pas mal de toitures à vérifier du côté de la résidence « Les Flots-bleus ». Plus sérieusement, courage à toi pour ta dernière ligne droite. Camille, tu restes mon indispensable binôme, et ta tolérance extrême à l'égard de mes jeux de mots douteux fait de toi ma plus grande alliée lors de nos conversations (scientifiques bien sûr) à trois avec l'ami Michael. Geoffrey, je te remercie profondément pour la fascinante littérature scientifique que tu m'as fait découvrir encore très récemment, notamment cet article révolutionnaire paru dans Legal Medicine plus tôt cette année. Courage à toi aussi. Augustin, déjà deux doctorats... où comptes-tu t'arrêter ? J'espère que tu profites tranquillement à Clermont avec le petit Evan et que tu n'oublieras pas de me faire signe si tu repasses dans le coin. Valérie, je me dois de te remercier dignement car tu auras été une source d'information incroyable : un véritable réseau à toi seule. D'une certaine manière, tu es un peu l'agent double, mais de tout le monde ! Blague à part, je te souhaite beaucoup de succès pour la suite de ta thèse. Tiens-moi au courant !

Tous mes amis sans exception, en particulier **Guilhem** (sans Guilhem, plus d'Avédis !), **William** le désormais britannique (à dans un an !), **Jean** d'Ibelin (promis je te rappelle), **Ilias** le révolutionnaire (le Che du Maroc), **Antoine**, ANTOINE !, **Philip** le cow-boy du Wild Wild East qui tire plus vite que son ombre, **Max** la clé (de bras) de tous les mystères, mon inséparable el Brujo **Stephane**, **Gabriel** le sage (merci pour tous tes précieux conseils !), **Hermine** la dessinatrice, qui a supporté et soigné mes diverses névroses, et **Zaven**, sans qui tous mes projets tombaient à l'eau. Merci à tous d'être, tout simplement.

Mes nouveaux compagnons d'armes, **Cristina Popescu**, **Coralie Wartraux**, **Adrien Deblois**, **Axel Philippart**, **Amir El Masri** et **J-B Portron** pour leur contribution très significative à ce travail, bien que de manière quelque peu rétro-active. Sans vous, il m'aurait été totalement impossible de naviguer entre 2 mondes totalement différents en ce début d'année.

Ma **Famille**. Ma **sœur**.

Sans vous rien n'est possible, sans vous je ne suis ;

Par vous je puis, et les miracles sont inutiles.

« Fais le bien et ne crains personne »

Avec une pensée particulière pour ceux qui nous ont quittés.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	19
I. LES LYMPHOMES ANAPLASIQUES A GRANDES CELLULES (LAGC)	21
I.A PRESENTATION GENERALE	21
I.B ASPECTS CLINIQUES	23
I. B.1 Epidémiologie	23
I.B.2 Signes cliniques	23
I.B.3 Diagnostic	23
I.C MORPHOLOGIE ET PHENOTYPE	25
I.C.1 Généralités	25
I.C.2 Sous-types morphologiques	25
I.C.3 Marqueurs immunophénotypiques	25
I.D ASPECTS MOLECULAIRES	27
I.D.1 La kinase ALK	29
I.D.2 Les partenaires de fusion de ALK	31
I.D.2.a La nucléophosmine (NPM)	31
I.D.2.b Autres partenaires de fusion de ALK	31
I.E VOIES DE SIGNALISATION	33
I.E.1 La voie JAK/STAT	33
I.E.2 La voie des MAP kinases	35
I.E.3 La voie de la phospholipase C γ	37
I.E.4 La voie de la tyrosine kinase SRC	37
I.E.5 La voie PI3K/Akt	37
I.E.6 Signalisation en aval de CD30	37
I.F. LES MEMBRES DE LA FAMILLE BCL-2 DANS LES LAGC ALK+	39
I.F.1 Généralités	39
I.F.2 Expression dans les LAGC ALK+ et cas particulier de Bcl-2	41
II. CONTRÔLE DE L'EXPRESSION GENIQUE AU NIVEAU POST-TRANSCRIPTIONNEL PAR NPM-ALK DANS LES LAGC ALK+	41
II.A L'INTERFERENCE A L'ARN ET LES MICROARN (miARN)	43
II.A.1 Biogenèse des miARN	43
II.A.2 Mécanisme de l'interférence à l'ARN	45

II.A.3 Rôle des miARN dans les LAGC ALK+	47
II.B REGULATION POST-TRANSCRIPTIONNELLE MEDIEE PAR LES PROTEINES DE LIAISON AUX MOTIFS ARE (ARE-BP)	49
II.B.1 AU-rich Elements (ARE) et ARE-mediated decay (AMD)	49
II.B.2 Les principales ARE-BP et leur rôle dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique	51
II.B.3 Cas de l'ARE-BP HuR dans les LAGC ALK+	53
II.B.3.a Structure	53
II.B.3.b Fonctions	53
II.B.3.c Modulation par NPM-ALK de l'activité et de l'affinité de HuR pour ses cibles dans les LAGC	55
III. TRAITEMENT DES LYMPHOMES ANAPLASIQUES A GRANDES CELLULES	57
III.A. LES CHIMIOETHERAPIES	57
III.B. CHIMIOETHERAPIES INTENSIVES ACCOMPAGNEES DE GREFFES DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏËTIQUES	59
III.C LE CRIZOTINIB : UNE THERAPIE CIBLANT ALK	61
III.C.1 Les thérapies ciblées dans les LAGC ALK+ : généralités	61
III.C.2 Le crizotinib : découverte, structure et mécanisme d'action	63
III.C.3 Utilisations actuelles et futures du crizotinib dans la prise en charge des LAGC ALK+	63
III.D MECANISMES DE RESISTANCE AU CRIZOTINIB	67
III.D.1 Mutations du domaine kinase de ALK	67
III.D.2 Amplification génique de ALK	67
III.D.3 Activation de voies de signalisation compensatrices	67
IV. L'AUTOPHAGIE : UN NOUVEL ENJEU THERAPEUTIQUE POUR LES LAGC ALK+	69
IV.A GENERALITES SUR L'AUTOPHAGIE	69
IV.A.1 La macro-autophagie	71
IV.A.2 Les principales étapes de l'autophagie et leur régulation	73
IV.A.2.a L'initiation.....	73
IV.A.2.b La nucléation	75
IV.A.2.c L'élongation	77
IV.A.2.d Maturation et étape de fusion/dégradation	79
IV.B REGULATION DE L'AUTOPHAGIE	79
IV.B.1 Régulation de l'activité du complexe mTORC1	81

IV.B.2 Régulation du processus autophagique par mTORC1	83
IV.B.3 Régulation post-transcriptionnelle du processus autophagique par les ARE-BP et les miARN	83
IV.C ROLE DE L'AUTOPHAGIE DANS LES CANCERS	85
IV.C.1 L'autophagie dans les cancers : une arme à double tranchant	85
IV.C.1.a Fonction suppresseur de tumeur	85
IV.C.1.b Fonction pro-tumorale	87
IV.C.2 Régulations croisées entre autophagie et mort(s) cellulaire(s)	89
IV.C.2.a Régulation de l'apoptose par l'autophagie	91
IV.C.2.b Régulation de l'autophagie par l'apoptose	91
IV.C.2.c La membrane autophagosomale : une plateforme de signalisation requise pour la mort cellulaire	93
IV.C.2.d Régulation de la nécroptose par l'autophagie	93
IV.C.2.e Mort cellulaire par autophagie	93
IV.D MODULATION DE L'AUTOPHAGIE A VISEE THERAPEUTIQUE	95
IV.D.1 Différentes autophagies pour différents traitements anticancéreux	95
IV.D.1.a Rôle cytoprotecteur	95
IV.D.1.b Rôle cytotoxique	97
IV.D.1.c Rôle cytotatique	97
IV.D.1.d Rôle non protecteur	99
IV.D.2 Transition entre les différents rôles de l'autophagie	99
IV.D.3 Des outils pour moduler l'autophagie dans les cancers	101
IV.D.3.a Les agents inhibiteurs de l'autophagie	101
IV.D.3.b Les agents activateurs de l'autophagie	103
OBJECTIFS DE LA THESE	107
RESULTATS	111
I. ARTICLE	113
II. ROLE DE HUR DANS LA REGULATION POST-TRANSCRIPTIONNELLE DE L'EXPRESSION DE BCL-2 ET DE L'AUTOPHAGIE DANS LES LAGC ALK+	165
DISCUSSION GENERALE	183
MATERIEL & METHODES	199
BIBLIOGRAPHIE	205

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Profil histologique d'un LAGC de type commun	24
Figure 2 : Profils histologiques des variants morphologiques des LAGC	24
Figure 3 : Marqueurs immunohistologiques des LAGC ALK+	26
Figure 4 : Structure de ALK humain	28
Figure 5 : Structure de la protéine de fusion NPM-ALK issue de la translocation t(2;5)(p23;q35).....	30
Figure 6 : Présentation de la voie de signalisation JAK/STAT	34
Figure 7 : La voie des MAP Kinases et de la PLC-Gamma	34
Figure 8 : La voie PIK3-AKT	36
Figure 9 : La signalisation médiée par CD30	36
Figure 10 : Régulation de la signalisation apoptotique par les membres de la famille Bcl-2	38
Figure 11 : Profil de détection en immunohistochimie de Bcl-xL dans des LAGC ALK+ et ALK-	40
Figure 12 : Profil de détection en immunohistochimie de Bcl-2 dans des LAGC ALK+ et ALK-	40
Figure 13 : Schéma simplifié de la régulation post-transcriptionnelle d'un gène	42
Figure 14 : Biogenèse des miARN	44
Figure 15 : Illustration simplifiée du mécanisme de l'interférence à l'ARN	46
Figure 16 : Représentation simplifiée du mécanisme de l'ARE-mediated decay (AMD)	48
Figure 17 : Structure de l'ARE-BP HuR.....	52
Figure 18 : Schéma simplifié d'un dialogue de type coopératif ou de type compétitif entre HuR et les miARN.....	54
Figure 19 : Représentation des rôles de HuR décrits dans les LAGC ALK+.....	54
Figure 20 : Structure cristallographique du crizotinib complexé à ALK	62
Figure 21 : Mécanismes de résistance au crizotinib retrouvés dans les Cancers du Poumon Non à Petites Cellules ALK+ (NSCLC EML4-ALK)	66
Figure 22 : Les différents types d'autophagie	68
Figure 23 : Principales étapes du processus autophagique.....	74
Figure 24 : Régulation de l'activité du complexe mTORC1	80
Figure 25 : Contrôle par mTOR de l'activation du complexe d'initiation ULK1.....	82
Figure 26 : Principaux miARN impliqués dans la régulation de l'expression d'acteurs clés du processus autophagique.....	82

Figure 27 : L'autophagie, une arme à double tranchant dans les cancers	86
Figure 28 : Principaux points de convergence entre protéines de l'autophagie et de l'apoptose	90
Figure 29 : Présence de motifs ARE sur l'ARNm Bcl-2.....	168
Figure 30 : Effet d'une extinction de l'expression de NPM-ALK ou de HuR sur le taux de protéines Bcl-2 dans les LAGC.....	168
Figure 31 : Quantité d'ARNm Bcl-2 dans deux lignées humaines de LAGC (ALK+ et ALK-) et effet d'une extinction de l'expression de NPM-ALK et de HuR sur ces niveaux de transcrits	168
Figure 32 : Effet d'une extinction de l'expression d'Ago2 sur le taux de protéines Bcl-2 dans la lignée Karpas-299 (LAGC ALK+ de type commun)	170
Figure 33 : Quantification des ARNm Bcl-2 liés à HuR.....	170
Figure 34 : Co-IP de HuR et Ago2 dans la lignée Karpas-299.....	172
Figure 35 : Dépendance à l'ARN de l'interaction HuR/Ago2	172
Figure 36 : Effet d'une surexpression du miR-34a sur l'expression de Bcl-2, en présence ou en absence de HuR	174
Figure 37 : Modèle proposé pour la régulation post-transcriptionnelle de l'expression de Bcl-2 dans les LAGC ALK+	176
Figure 38 : La déplétion moléculaire de HuR inhibe l'induction de flux autophagique généré par le crizotinib.....	178
Figure 39 : La déplétion moléculaire de HuR inhibe l'induction de flux autophagique généré par la carence en nutriments.....	178
Figure 40 : Données transcriptomiques (puce autophagie).....	180
Figure 41 : Interaction de HuR et P62 dans la lignée Karpas-299.....	180

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification de Ann Arbor.....	22
Tableau 2 : Classification de St-Jude Jude Children’s Research Hospital	22
Tableau 3 : Caractéristiques immunophénotypiques des LAGC ALK+ et ALK-	26
Tableau 4 : Protéines de fusion impliquant ALK dans différents cancers	32
Tableau 5 : Mutations de ALK décrites dans les Cancers du Poumon Non à Petites Cellules ALK+ (NSCLC EML4-ALK) et dans les Lymphomes Anaplasiques à Grandes Cellules ALK positifs (LAGC ALK+) conférant une résistance au Crizotinib	66
Tableau 6 : Identification in silico, de "miARN candidats" ciblant l’ARNm Bcl-2	174

INTRODUCTION

I. LES LYMPHOMES ANAPLASIQUES A GRANDES CELLULES

I.A PRESENTATION GENERALE

Les lymphomes sont des hémopathies malignes, issues de la transformation de cellules lymphoïdes en cellules cancéreuses, et caractérisées par un envahissement des ganglions du système lymphatique. On parle ainsi de pathologie « systémique », en référence à cet envahissement du système lymphatique.

Les lymphomes constituent près de 5% des cancers et représentent une part importante des hémopathies malignes. Parmi les lymphomes, on distingue généralement deux grandes familles : les Lymphomes Hodgkiniens (LH) qui représentent environ 20% des cas et, par opposition, les lymphomes dits Non Hodgkiniens (LNH) qui représentent donc les 80% restants.

Dans le travail de thèse exposé ci-dessous, nous nous sommes intéressés à un type particulier de LNH, les lymphomes anaplasiques à grandes cellules (LAGC). Ces derniers ont été identifiés en 1985 par Harald Stein et Karl Lennert en raison de plusieurs critères, notamment leur cytologie inhabituelle qualifiée « d'anaplasique », leur modèle de croissance sinusoïdal, lui aussi peu commun, ainsi que leur forte immuno-réactivité vis-à-vis de l'anticorps anti-Ki-1 (ou anti-CD30)¹.

Sur la base de ces (différents) critères, les premières classifications de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) rangeaient initialement ces lymphomes dans la catégorie des lymphomes à morphologie anaplasique, exprimant l'antigène CD30, et de phénotype dit T ou nul (c'est-à-dire non-B ou non-T)^{2,3}. Depuis 2008 cependant, l'OMS les classe désormais dans la catégorie des lymphomes développés à partir de cellules T périphériques^{3,4}.

On distingue finalement deux types de LAGC : les LAGC cutanés primitifs, qui se forment dans le tissu cutané, et les LAGC systémiques qui proviennent, eux, des ganglions du système lymphatique. Ces derniers peuvent disséminer vers les poumons, les os, la peau, le foie, le médiastin et les tissus mous.

Les LAGC systémiques sont encore subdivisés en deux sous-catégories⁵:

- Les LAGC dits ALK-négatifs (ALK-), dépourvus de l'expression de la tyrosine kinase oncogénique nommée Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK)
- Les LAGC dits ALK-positifs (ALK+) qui, à l'inverse, expriment une protéine de fusion de type X-ALK suite à un évènement de translocation chromosomique impliquant le gène ALK.

C'est sur ces LAGC ALK-positifs que mon travail de thèse est centré.

Stade I	Atteinte d'une seule aire ganglionnaire sus ou sous diaphragmatique.
Stade II	Atteinte de deux ou plusieurs aires ganglionnaires du même côté du diaphragme.
Stade III	Atteinte ganglionnaire de part et d'autre du diaphragme.
Stade IV	Atteinte viscérale à distance d'un groupe ganglionnaire (médullaire, hépatique, pulmonaire...)

Tableau 1 : Classification de Ann Arbor. D'après Carbone et al. 1971¹³

Stade I	Atteinte unique extra-ganglionnaires ou atteinte d'une aire ganglionnaire. Absence d'atteinte médiastinale et abdominale.
Stade II	On observe l'une des formes suivantes : - Atteinte unique disséminée aux ganglions lymphatiques régionaux. - Deux aires ganglionnaires atteintes - Deux tumeurs extra-ganglionnaires, du même côté du diaphragme, avec ou sans atteinte ganglionnaire loco-régionale, - Atteinte viscérale (estomac ou intestin) disséminée ou non aux ganglions lymphatiques voisins mais résécable par chirurgie.
Stade III	On observe l'une des formes suivantes : - Deux tumeurs extraganglionnaires de part et d'autre du diaphragme - Atteinte de deux (ou plus) aires ganglionnaires sus et sous diaphragmiques - Atteinte au thorax. - Atteinte disséminée au niveau de l'ensemble de l'abdomen, non résécable par chirurgie - Atteinte dans la région entourant la colonne vertébrale
Stade IV	Une des formes précédentes avec atteinte de la moelle osseuse et/ou du système nerveux central (cerveau ou moëlle épinière), ou dans d'autres parties du corps.

Tableau 2 : Classification de St-Jude Jude Children's Research Hospital. D'après Murphy et al., 1980 ; Cairo et al. 2003^{14,324}

I.B. ASPECTS CLINIQUES

I. B.1 Epidémiologie

Les LAGC ALK+ sont des lymphomes qualifiés d'agressifs qui représentent près de 7% des LNH. Bien qu'ils ne constituent que 3% des LNH chez l'adulte, ils représenteraient jusqu'à 15% des lymphomes pédiatriques, ce qui en fait l'un des lymphomes les plus fréquents chez l'enfant⁶⁻⁸.

En termes d'âge et au diagnostic, les cas de LAGC ALK+ se répartissent principalement autour de deux pics. La première population touchée est ainsi constituée d'enfants et de jeunes adultes : on retrouve une prévalence plus élevée autour de 10 ans (âge médian)⁹. Le second pic d'âge concerne les personnes de plus 60 ans.

Cette pathologie touche préférentiellement les hommes, avec un ratio M/F allant de 3 à 6,5 selon la tranche d'âge considérée¹⁰.

I.B.2 Signes cliniques

Comme indiqué précédemment, les LAGC ALK+ se caractérisent par un envahissement des ganglions lymphatiques : en conséquence, l'un des signes cliniques classique dans cette pathologie est une augmentation du volume des ganglions superficiels (polyadénopathie). Des atteintes extra-ganglionnaires sont cependant détectées dès le diagnostic dans 40% à 68 des cas. Ces dernières sont le plus souvent localisées au niveau de la peau, des viscères, des intestins et du médiastin et, dans 10 à 30% des cas, dans la moëlle osseuse^{6,11,12}.

I.B.3 Diagnostic

Le diagnostic des LAGC repose sur plusieurs examens cliniques, incluant des biopsies de la tumeur, un bilan hématologique et biochimique, mais aussi des biopsies de la moëlle osseuse, l'utilisation de la tomographie corps-entier (CT-scan) voire de la tomographie par émission de positon (PET-scan).

Afin de déterminer le stade de la maladie, on utilise à l'heure actuelle deux classifications servant de grille de lecture : la classification d'Ann Arbor (Tableau 1)¹³ qui est utilisée chez les adultes, et celle du St Jude Children's Research Hospital (Tableau 2) qui est utilisée chez les enfants^{6,14}. Dans les deux classifications, l'évolution de la maladie est échelonnée en quatre stades qui reflètent à la fois le nombre et la localisation des sites ganglionnaires atteints, mais aussi la présence éventuelle d'atteintes extra-ganglionnaires. C'est surtout sur ce dernier critère que les deux classifications diffèrent : en effet, la classification du St Jude Children's Research Hospital prend en compte les atteintes extra-ganglionnaires (plus fréquentes chez les enfants) dès le stade I de la maladie. Notons que lors du diagnostic, près de 65% des patients présentent déjà une maladie de stade III ou IV^{6,9,15}.

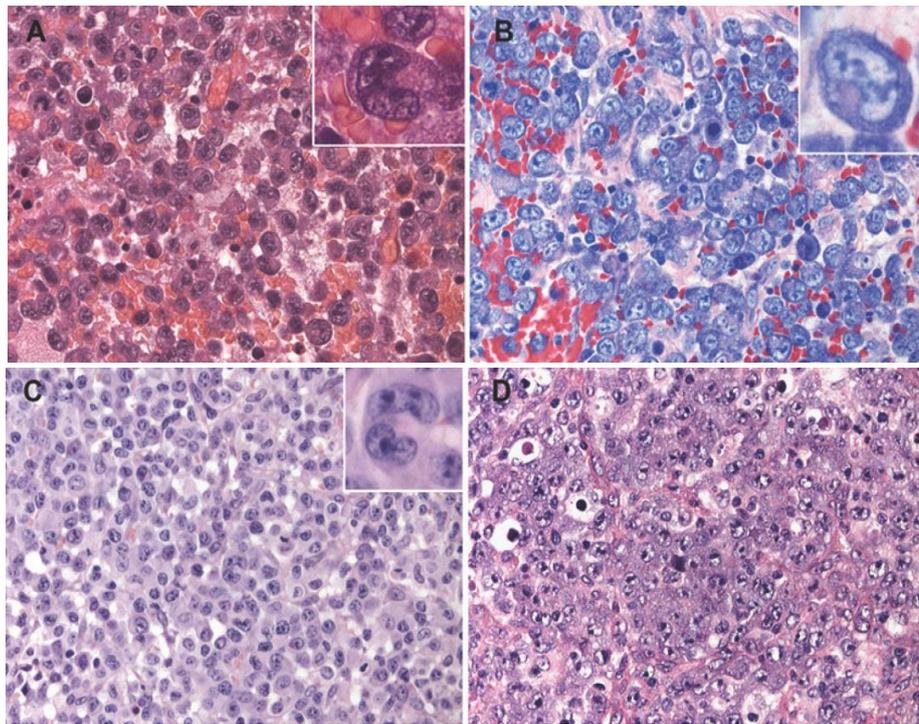


Figure 1. Profil histologique d'un LAGC de type commun. **A.** Les cellules sont grandes, avec un cytoplasme abondant éosinophile et pléomorphe, souvent avec un noyau en fer à cheval avec des zones de Golgi proéminents (coloration H & E). **B.** La coloration Giemsa met en évidence les caractéristiques morphologiques des cellules tumorales ainsi que la proéminence de la zone de Golgi. **C.** Les cellules sont grandes avec un cytoplasme abondant et des frontières cytoplasmiques distinctes. Un modèle de croissance cohésive est présent. Les cellules sont relativement monomorphes, bien que des cellules caractéristiques éparses puissent être retrouvées (insert) (coloration H & E). **D.** Cellules «centroblastique-like" à cytoplasme basophiles abondant et ayant un profil de croissance cohésive. *Bonzheim et al., 2015*¹²

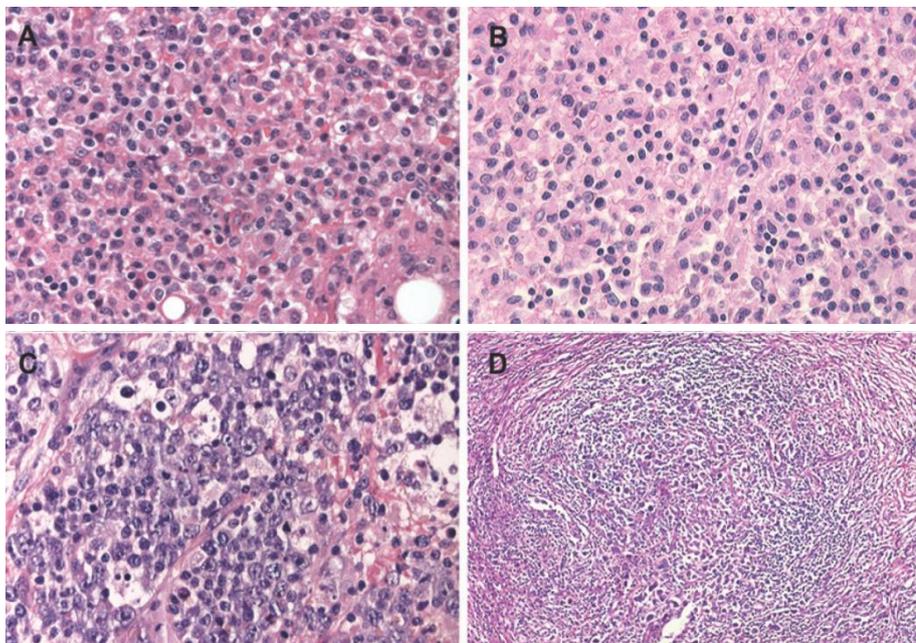


Figure 2. Profils histologiques des variants morphologiques des LAGC

A. Variant à petites cellules : petits noyaux irréguliers et un cytoplasme pâle. La présence de rosettes périvasculaires formées de cellules tumorales est une caractéristique commune. **B.** Dans la variante lymphohistiocytaire les cellules néoplasiques sont éclipsées par histiocytes avec cytoplasme éosinophile abondant. **C.** Parfois, il y a un mélange de différents modèles : on parle de variant mixte. On note ici une variante principalement à petites cellules avec de grandes cellules éparpillées du " type commun ". **D.** Le variant "Hodgkin-like" imite un sous-type de lymphome Hodgkinien: le variant avec sclérose nodulaire. *Bonzheim et al., 2015*¹²

I.C MORPHOLOGIE ET PHENOTYPE

I.C.1 Généralités

Les LAGC ALK+ se caractérisent par une infiltration des ganglions lymphatiques au niveau paracortical par des nids de cellules cohésives. Si l'infiltration respecte initialement les follicules lymphoïdes, elle devient ensuite intrasinusoïdale, avec une distribution périvasculaire des cellules tumorales.

Au niveau cytologique, les LAGC ALK+ se caractérisent, comme leur nom l'indique, par la présence de cellules de grande taille, au cytoplasme abondant, dont le noyau excentré et réniforme est dit en forme de « fer à cheval », et qui présentent un nucléole proéminent¹⁶. Au sein d'une tumeur, les cellules qui présentent l'ensemble de ces caractéristiques sont qualifiées de « hallmark cells » (Figure 1)¹².

Selon la classification de l'OMS de 2008, on peut classer, en fonction de la proportion de « hallmark cells » dans les tumeurs, les LAGC ALK+ selon cinq sous-types : une forme commune et quatre variants morphologiques¹⁷.

I.C.2 Sous-types morphologiques

La **forme commune** correspond en réalité au sous type initialement identifié par Stein et Lennert. Ce sous-type est composé quasi-exclusivement de « hallmark cells » et elle représente la forme la plus fréquemment retrouvée (60% des cas) (Figure 1)^{12,18}.

Le **variant lymphohistiocytaire** présente, comme son nom le sous-entend, une proportion importante d'histiocytes en plus des « hallmark cells ». Ce variant est retrouvé dans près de 10% des cas (Figure 2B)¹⁹.

Le **variant à petites cellules** se caractérise, outre la présence de « hallmark cells », par la présence de cellules cancéreuses de plus petites tailles. Ce variant, moins fréquent que les précédents, est retrouvé dans 5 à 10% des cas (Figure 2A).

Le **variant mixte** présente les caractéristiques des trois sous-types mentionnés précédemment, et est retrouvé dans 15% des cas (Figure 2C).

Enfin, le **variant « Hodgkin-like »** présente des zones de sclérose nodulaires, qui sont généralement associées à la maladie de Hodgkin, d'où l'origine de son nom (variant 2D).

I.C.3 Marqueurs immunophénotypiques

En raison de l'existence de ces différents variants morphologiques, la mise en évidence de marqueurs phénotypiques spécifiques des LAGC ALK+ s'est avérée capitale pour permettre leur diagnostic. Les principaux marqueurs phénotypiques sont listés de façon non exhaustive ci-dessous (Tableau 3).

Immunophenotype	ALCL ALK ⁺ (%)	ALCL ALK ⁻ (%)
CD30	100	100
ALK	100	0
CD2	22	58
CD3	11,5	45
CD4	46	68
CD8	8	16
CD5	36	19
TIA1	54	27
Granzyme B, Peforine	>75	>75
CD45	48	59
CD56	4-7	3,2
EMA	60-70	50-75
PAX5	0	3,2

Tableau 3. Caractéristiques immunophénotypiques des LAGC ALK⁺ et ALK⁻. D'après Tabbo et al., 2012 ; Castellar et al, 2014^{325,326}

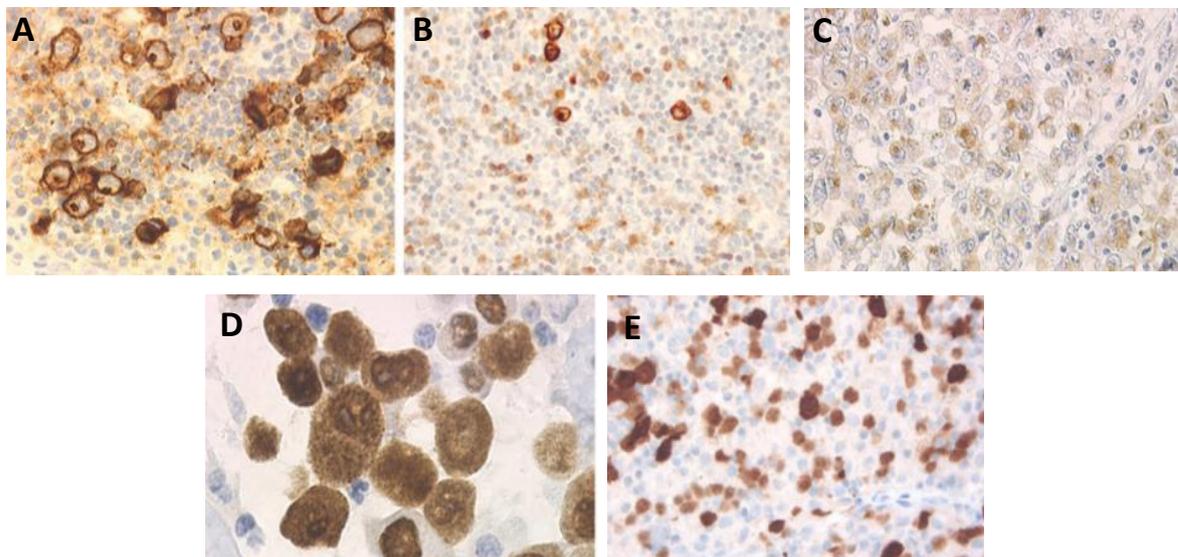


Figure 3. Marqueurs immunohistologiques des LAGC ALK⁺. A. Marquage CD30 dans le « type commun »: grandes cellules caractéristiques fortement positives pour le CD30, marquage au niveau de la membrane et de l'appareil de Golgi. B. Marquage CD30 dans le variant à petites cellules: les grandes cellules expriment fortement le CD30, tandis que les petites cellules sont hétérogènes avec un marquage faiblement positif. C. Les LAGC ont normalement un phénotype cytotoxique, comme le montre le marquage de la perforine. D. Marquage avec l'anticorps ALK1 sur une biopsie de LAGC NPM-ALK positif: les cellules néoplasiques présentent une coloration cytoplasmique, nucléaire et nucléolaire. E. Marquage avec l'anticorps ALK1 sur une biopsie de LAGC TFG-ALK positif (variant à petite cellules): le marquage est limité noyau dans les petites cellules et est plus diffus et fortement positif pour les grandes cellules. Adaptée de Bonzheim et al., 2015¹²

L'expression du marqueur ALK est, sans surprise, l'un des éléments majeurs du diagnostic des LAGC ALK+ et repose, pour sa détection, sur l'utilisation de l'anticorps ALK 1 en immunohistochimie (IHC). Les caractéristiques du marqueur ALK seront développées dans la suite de cette introduction (Figure 3D).

La forte immunoréactivité de ces lymphomes vis-à-vis de l'antigène CD30 a joué un rôle historique dans la caractérisation des LAGC. Ce marqueur est en effet fortement exprimé au niveau de l'appareil de Golgi¹⁵. Néanmoins, cet antigène est loin d'être spécifique des LAGC, car il s'agit en fait de l'un des marqueurs généraux de l'activation des lymphocytes T ; ce marqueur est en outre également retrouvé dans les lymphocytes de type « Natural Killer » (NK) ainsi que dans les cellules de Reed-Sternberg (caractéristiques des LH). Néanmoins, l'utilisation de ce marqueur reste pertinente car elle permet de distinguer le variant morphologique à petite cellules, dont le marquage CD30 apparaît plus faible, des autres formes (Figure 3A et 3B)^{18,20}.

De plus, et c'est l'une des raisons pour laquelle ces lymphomes sont classés parmi les lymphomes T périphériques, les LAGC ALK+ peuvent exprimer plusieurs marqueurs spécifiques du lignage T, en particulier les marqueurs CD3, CD4 ou CD8, CD2, CD5, CD7 et le T-Cell Receptor (TCR). Plus précisément, on dit de ces lymphomes qu'ils sont de phénotypes « T ou nul », selon les antigènes de surface T qu'ils expriment : on parle ainsi de phénotype T, mature ou incomplet, lorsque la totalité ou au moins 5 de ces 6 antigènes sont exprimés. A l'inverse, on évoque un phénotype nul lorsque moins de 5 de ces antigènes sont présents^{21,22}.

Enfin, d'autres marqueurs immunophénoyiques sont fréquemment retrouvés exprimés dans les LAGC ALK+, tels que l'antigène épithélial membranaire (EMA), ainsi que des molécules évoquant le caractère cytotoxique de la cellule d'origine comme le granzyme B, la granulysine, la perforine ou encore le T-Cell restricted antigen-1 (TIA-1) (Figure 3C)^{3,23}.

I.D. ASPECTS MOLECULAIRES

Le moteur de la tumorigenèse dans les LAGC ALK+ est l'expression anormale et l'activation constitutive de protéines chimères de type X-ALK, qui présentent un fort pouvoir oncogénique. L'expression de protéines de fusion de ce type résulte d'événements de translocation chromosomiques réciproques induisant la fusion entre la portion 3' du gène codant la tyrosine kinase ALK, sur le chromosome 2, à la portion 5' d'un gène partenaire. De manière intéressante, c'est la mise en évidence de la toute première de ces translocations dans les LAGC qui a permis l'identification et la caractérisation du gène ALK « sauvage »²⁴: il s'agit de la translocation t(2;5)(p23;q35) qui est aussi la plus fréquemment retrouvée (75% des cas) dans les LAGC, et qui engendre l'expression de la protéine chimère

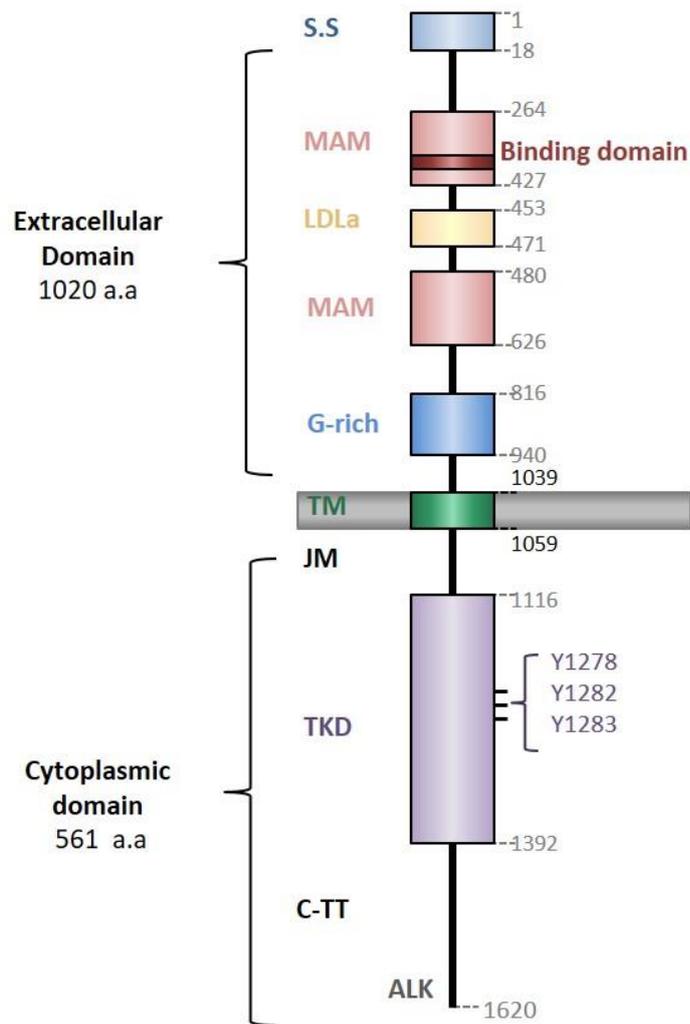


Figure 4. Structure de ALK humain. La région N-terminale de ALK humain comprend deux domaines MAM (Meprin, A5 protein, and receptor tyrosine phosphatase μ , acides aminés 264-427 et 480-626), un domaine de LDLa (Low Density Lipoprotein class A, acides aminés 453-471) et une région riche en glycines (G-rich, acides aminés 816-940). Un domaine transmembranaire (TM, acides aminés 1039-1059) relie la région extracellulaire à la région juxtamembranaire (JM, 1060-1115) du domaine intracellulaire (1060-1620). Le domaine tyrosine kinase (TKD) s'étend des acides aminés 1116 à 1392 et est suivi d'une queue C-terminale (C-TT, C-Terminal Tail). D'après Roskoski et al., 2013 et Hallberg et al., 2013^{27,28}

oncogénique NPM (Nucléophosmine)-ALK. Le gène *ALK* tire ainsi son nom de la pathologie en question, l'acronyme signifiant Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK).

I.D.1 La kinase ALK

Le gène *ALK* a été cloné pour la première fois en 1997²⁵. Il s'agit d'un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase appartenant à la superfamille des récepteurs à l'insuline. Il s'agit d'un gène relativement bien conservé dans l'évolution, dans la mesure où des orthologues de ALK sont retrouvés chez les invertébrés ; et sa forte homologie de séquence avec le gène codant le récepteur Leucocyte Tyrosine Kinase (LTK) laisse suggérer une histoire évolutive commune avec ce gène²⁶.

Comme pour la plupart des récepteurs à activité tyrosine kinase, l'architecture de la protéine ALK repose sur une structure tripartite : ALK possède un domaine extracellulaire responsable de l'interaction avec son ligand, un domaine transmembranaire pour son ancrage et un domaine intracellulaire responsable de la transduction du signal par son activité tyrosine kinase. La structure détaillée, ainsi que les différents sites et motifs portés par la protéine sont détaillés en Figure 4 (ci-contre)^{27,28}.

Plusieurs études fonctionnelles de ALK réalisées dans différents organismes modèles ont permis de préciser la fonction de la protéine ALK sauvage. Des études menées chez le nématode, la drosophile et le poisson zèbre ont ainsi permis de mettre respectivement en évidence une implication de ALK dans les processus de formation de la synapse, du système nerveux central et de la crête neurale, et pointent donc de manière globale vers un rôle de ALK dans la régulation du développement du système nerveux. Chez les mammifères, les fonctions exactes de ALK demeurent à ce jour plus mystérieuses, mais il apparaît tout de même que l'expression de ALK se limite en grande partie au développement, et soit restreinte au cerveau (et dans une moindre mesure au tissu nerveux entérique)²⁸⁻³².

L'identification des ligands de ALK chez les mammifères n'est que très récente : il s'agit des facteurs FAM150A et FAM150B, connus jusqu'alors comme ligands de l'homologue LTK de ALK^{33,34}. L'interaction de ces ligands avec ALK sauvage a pu être mise en évidence dans un modèle de neuroblastome, où elle semble causer une sur-activation des cellules malignes.

Notons pour finir que, suite aux travaux parallèles menés par Murray et al. puis discutés par Lemke et al., il est proposé que l'héparine, un protéoglycane, pourrait jouer le rôle de cofacteur pour ces ligands au niveau extracellulaire, permettant la dimérisation du récepteur, nécessaire à son activation^{35,36}.

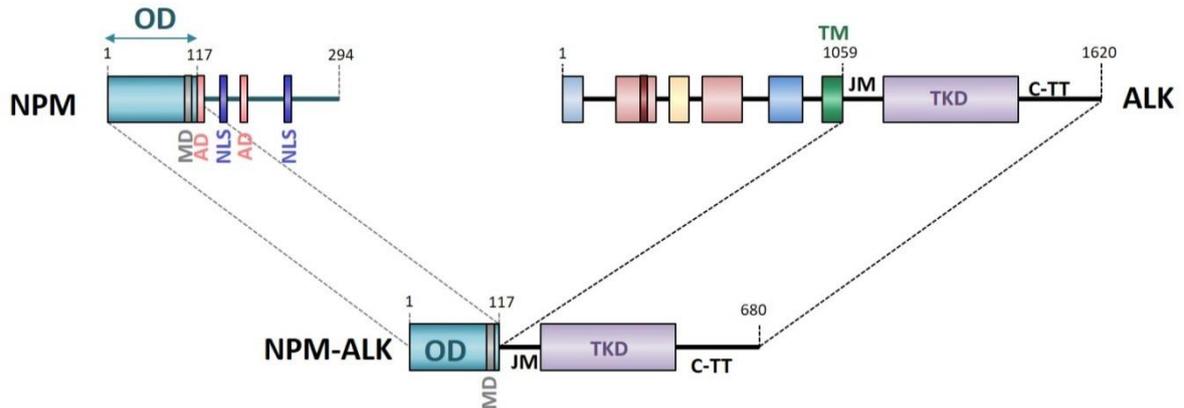


Figure 5. Structure de la protéine de fusion NPM-ALK issue de la translocation $t(2;5)(p23;q35)$. Fusion du chromosome 5, qui porte le gène codant pour nucléophosmine, au chromosome 2 qui porte le gène codant pour ALK. Cette translocation résulte en l'expression d'une tyrosine kinase chimérique constitutivement active. NPM sauvage contient un domaine d'oligomérisation (OD: résidus 1-117), un domaine de liaison aux métaux (MB; résidus 104-115), deux groupes d'acides aminés riches en Asp/Glu (AD : domaine riche en Asp/Glu; résidus 120-132 et 191-188) régions recevant les signaux de localisation nucléolaire, et deux signaux de localisation nucléaire (NLS, résidus 152-157 et 191-197). Adapté de Duyster et al., 2001, Palmer et al., 2009^{40,41}

I.D.2 Les partenaires de fusion de ALK

I.D.2.a La nucléophosmine (NPM)

Comme mentionné plus haut, la translocation chromosomique t(2 ;5)(p23 ;q35) retrouvée dans la majorité des cas de LAGC ALK+ (75%) implique le gène codant la nucléophosmine, situé sur le chromosome 5. Cet évènement de translocation chromosomique réciproque équilibré entraîne ainsi l'expression constitutive de la protéine chimère oncogénique NPM-ALK, d'un poids moléculaire avoisinant 80 kD^{24,37}.

NPM sauvage est une protéine multifonctionnelle et ubiquitaire de 38 kD dont les rôles dans la cellule sont variés, allant du transport nucléo-cytoplasmique des protéines néo-synthétisées à une implication dans la réparation de l'ADN, en passant par la biogenèse des ribosomes, la régulation du cycle cellulaire ou encore la régulation de la transcription³⁸. Lors de la fusion du gène *NPM* avec le gène *ALK*, NPM contribue à l'oncogénicité de deux manières distinctes : 1) il permet l'expression constitutive de la protéine chimérique issue de cette fusion, le gène de fusion se retrouvant ainsi placé sous le contrôle du promoteur ubiquitaire de NPM ; 2) il apporte un domaine d'oligomérisation qui permet à la protéine hybride NPM-ALK de s'oligomériser de manière constitutive et en absence de ligand, ce qui induit *de facto* une activation constitutive de la protéine, par transautophosphorylation du domaine à activité tyrosine kinase de ALK (Figure 5)^{27,39}. L'une des particularités qui distingue NPM-ALK des autres protéines de type X-ALK, est sa localisation sub-cellulaire : dans la mesure où NPM-ALK porte le signal de localisation cellulaire (NLS) de NPM, l'expression de NPM-ALK est retrouvée au niveau du noyau, du nucléole, et du cytoplasme. Cependant, la localisation subcellulaire des protéines de type X-ALK ne semble avoir qu'un impact mineur sur l'oncogénicité de ces dernières^{39,40}. Enfin, relevons que, depuis sa mise en évidence historique dans les LAGC, l'expression anormale de NPM-ALK a également été mise en cause dans les lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL)²⁷.

I.D.2.b Autres partenaires de fusion de ALK

D'autres protéines chimères issues de translocations chromosomiques impliquant ALK ont également été mises en causes dans la cancérogenèse des LAGC ; ces différents partenaires de fusion de ALK sont listés dans le Tableau 4. Concernant ces partenaires de fusion et les protéines chimères qu'ils génèrent, il est intéressant de constater l'existence de plusieurs propriétés communes avec le prototype NPM-ALK. Tous ces partenaires de fusion sont effectivement placés sous le contrôle de promoteurs constitutivement actifs, et portent dans leur portion amino-terminale un domaine d'oligomérisation, conservé après translocation : ceci induit une expression et une activation constitutive de la protéine chimère de type X-ALK, selon un mécanisme similaire à celui précédemment décrit pour NPM-ALK^{40,41},

Pathologie	Partenaire de fusion	Translocation	Fréquence (%)	Localisation cellulaire*	Références
LAGC	NPM1	t(2;5)(p23;q35)	75-80	nucléaire, nucléolaire, cytoplasmique	Morris et al., 1994
LAGC	ALO17	t(2;17)(p23;q23)	<1	cytoplasmique	Cools et al., 2002
LAGC	TFG	t(2;3)(p23;q21)	2	cytoplasmique	Hernandez et al., 1999
LAGC	MSN	t(2;X)(p32;q11-12)	<1	cytoplasmique	Tort et al., 2001
LAGC	TPM3	t(1;2)(q25;p23)	12-18	cytoplasmique	Lamant et al., 1999
LAGC	TMP4	t(2;19)(p23;p13)	<1	cytoplasmique	Meech et al., 2001
LAGC	ATIC	inv(2)(p23;q35)	2	cytoplasmique	Colleoni et al., 2000
LAGC	MYH9	t(2;22)(p23;q11.2)	<1	cytoplasmique	Lamant et al., 2003
LAGC	CLTC1	t(2;17)(p23;q23)	2	cytoplasmique (granulaire)	Touriol et al., 2000
LAGC	TRAF1	?	<1	cytoplasmique	Felman et al., 2010
NSCLC	EML4	inv(2)(p21;p23)	2-5	cytoplasmique	Pikova et al., 2007
NSCLC	TFG	t(2;3)(p23;q21)	2	cytoplasmique	Rikova et al., 2007
NSCLC	KIF5B	t(2;10)(p23;p11)	<1	cytoplasmique	Takeuchi et al., 2009
NSCLC	KLC1	t(2;14)(p23;q32)	<5	cytoplasmique	Tokashi et al., 2012
NSCLC	PTPN3	t(2;9)(p23;q31)	ND	cytoplasmique	Jung et al., 2012
NSCLC	DCTN1	t(2;12)(p23;q11)	ND	ND	Aglaya et al., 2015
IMT	TPM3	t(1;2)(q25;p23)	50	cytoplasmique	Lawrence et al., 2000
IMT	TPM4	t(2;19)(p23;p13)	<5	cytoplasmique	Lawrence et al., 2000
IMT	CTLC1	t(2;17)(p23;q23)	<5	cytoplasmique	Bridge et al., 2001
IMT	ATIC	inv(2)(p23;q35)	<5	cytoplasmique	Debiec-Rychter et al., 2003
IMT	CARS	t(2;11;2)(p23;p15;q31)	<5	cytoplasmique	Cools et al., 2002
IMT	RANBP2	t(2;2)(p23;q13) inv(2)(p23;p15;q31)	<5	Nucléaire/membranaire	Ma et al., 2003
IMT	SEC31A	t(2;4)(p23;q21)	<5	cytoplasmique	Panagopoulos et al., 2006
IMT	DCTN1	t(2;12)(p23;q11)	ND	ND	Wang et al., 2012
DLBCL	NPM	t(2;5)(p23;q35)	ND	nucléaire, nucléolaire, cytoplasmique	Adam et al., 2003
DLBCL	CLTC1	t(2;17)(p23;q23)	ND	cytoplasmique (granulaire)	De Paepe et al., 2003
DLBCL	SQSTM1	t(2;5)(p23.1;q35.3)	ND	cytoplasmique	Takeuchi et al., 2011
DLBCL	SEC31A	ins(4)(2;4)(?;q21) t(2;4)(p24;q21)	ND	cytoplasmique	Bedwell et al., 2011
BC	EML4	inv(2)(p21;p23)	<5	cytoplasmique	Lin et al., 2009
CRC	EML4	inv(2)(p21;p23)	<5	cytoplasmique	Lin et al., 2009
CRC	C2orf44	t(2;2)(p23.3)	ND	cytoplasmique	Lipson et al., 2012
ESCC	TPM4	t(2;19)(p23;p13)	ND	cytoplasmique	Jazii et al., 2006
RCC	VLC	t(2;10)(p23;q22)	ND	cytoplasmique	Debelenko et al., 2011

Tableau 4. Protéines de fusion impliquant ALK dans différents cancers. ND, non déterminé ; LAGC, Lymphome anaplasique à grandes cellules ; DLBCL, Lymphome B diffus à grandes cellules; IMT, tumeur myélofibroblastique inflammatoire; NSCLC, cancer du poumon non à petites cellules; BC, cancer du sein; CRC, cancer colorectal; ESCC, cancer de l'œsophage ; RCC, cancer du rein. *Adapté de Roskoski et al., 2012 et Halberg et al., 2013*^{27,28}

. Notons également que la nature du partenaire de fusion de ALK ne semble pas avoir d'impact majeur sur le pouvoir oncogénique de la protéine de type X-ALK ; mais il affecte en revanche la localisation subcellulaire de ladite protéine : le variant CLTC1-ALK se caractérise par exemple par son marquage granulaire, en raison de l'implication de la clathrine (CLTC1) dans le trafic vésiculaire. Relevons enfin que toutes les translocations répertoriées à ce jour dans les LAGC semblent impliquer la même portion du gène *ALK* et surviennent au même point de cassure, ce qui suggère l'existence d'un point de fragilité au niveau du locus en question (intron 19-20 du gène *ALK*)⁴².

Certaines de ces translocations sont, comme pour NPM-ALK, aujourd'hui incriminées dans d'autres cancers. C'est notamment le cas de t(1 ;2)(q25 ;p23), la seconde translocation la plus fréquentes dans les LAGC (18% des cas) impliquant le gène de la tropomyosine (*TPM3*) et générant la protéine TPM3-ALK, qui est par exemple retrouvée dans les tumeurs myofibroblastiques inflammatoires (IMT)²⁷.

En outre, des protéines de type X-ALK impliquant des partenaires originaux (non répertoriés dans les LAGC) ont été mises en évidence dans d'autres cancers : l'exemple le plus célèbre est EML4-ALK (Echinoderm Microtubule-associated protein-Like 4-ALK) dont on sait aujourd'hui qu'elle est impliquée dans près de 6% des cancers du poumon non à petites cellules (NSCLC), eux-mêmes responsables du plus grand nombre de morts par an suite à un cancer dans le monde²⁷. Pour finir, notons que des mutations de ALK autres que des translocations chromosomiques (gains de fonction, amplification géniques...) sont aujourd'hui incriminées dans plusieurs autres cancers (neuroblastomes, glioblastomes, mélanomes...) (Tableau 4 ci-contre)^{27,28}.

I.E. VOIES DE SIGNALISATION

Les protéines de types X-ALK sont constitutivement exprimées et peuvent s'oligomériser. La dimérisation provoque un rapprochement des domaines catalytiques de ALK (qui portent l'activité tyrosine kinase) et leur transphosphorylation au niveau de plusieurs résidus tyrosines (Y1278, Y1282 et Y1283 pour ALK). Ces résidus jouent un rôle critique dans la transduction du signal pro-oncogénique^{43,44}. Les principales voies de signalisation ainsi activées par ALK dans les LAGC sont détaillées ci-dessous.

I.E.1 La voie JAK/STAT

Selon plusieurs études, c'est la voie JAK/STAT (Figure 6) qui semble jouer un rôle prépondérant dans la cancérogenèse des LAGC ALK+⁴⁵⁻⁵¹. L'activité tyrosine-kinase de NPM-ALK permet en effet l'activation du facteur de transcription Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) par phosphorylation, soit directement, soit par l'intermédiaire de la Janus Kinase 3 (JAK3). STAT3, phosphorylé et actif, se dimérise et transloque au noyau où il régule la transcription de gènes impliqués

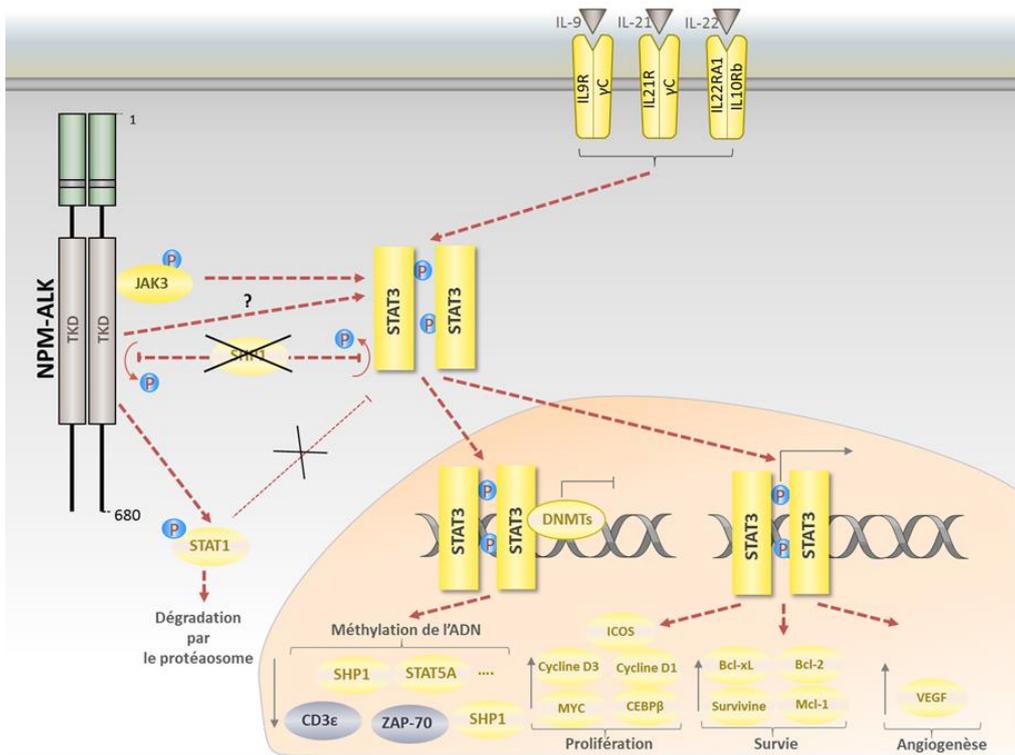


Figure 6. Présentation de la voie de signalisation JAK/STAT. D'après la thèse de Julie Frentzel : adapté de Roskoski et al., 2013, Pearson et al., 2012 et Chiarle et al., 2008^{27,45,53}

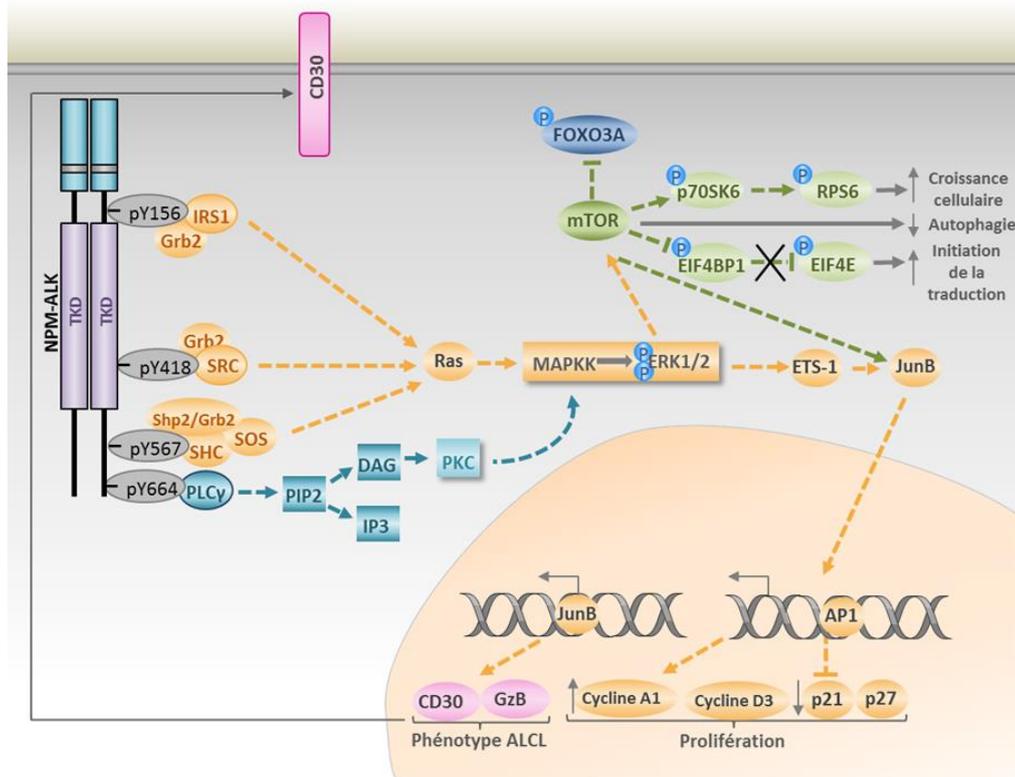


Figure 7. La voie des MAP Kinases et de la PLC-Gamma. D'après la thèse de Julie Frentzel : adapté de Roskoski et al., 2013, Pearson et al., 2012 et Chiarle et al., 2008^{27,45,53}

dans le processus tumoral. STAT3 a ainsi la faculté de réguler positivement l'expression de facteurs anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 tels que B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Myeloid cell leukemia sequence 1 (Mcl-1), Bcl-2 like 1 (Bcl-XL), mais aussi de la survivine⁵². L'activation de STAT3 favorise également la prolifération cellulaire, en activant l'expression des gènes codant les cyclines D3 et D1, le facteur Inducible T-cell costimulator (ICOS) et les facteurs de transcription CEBP/β et Myc^{45,53}. STAT3 pourrait aussi favoriser l'angiogenèse par l'intermédiaire d'une transcription accrue du gène codant le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)⁵⁴. STAT3 participe également à la cancérogenèse en co-régulant négativement l'expression de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs : la mise en silence de ces derniers intervient au niveau épigénétique, et repose notamment sur une méthylation répressive de leur région promotrice par des DNA Methyl Transferases (DNMT). Dans ce mode de contrôle, STAT3 possède donc deux rôles : celui de régulateur transcriptionnel positif des DNMT, et celui de cofacteur répresseur pour les cibles de ces DNMT⁵⁵⁻⁵⁷. L'un des exemples les plus récents de ce mécanisme, et qui a été publié par notre équipe, est la mise en silence du miARN suppresseur de tumeur miR-150 par DNMT3, de façon STAT3-dépendante⁵⁸.

I.E.2 La voie des MAP kinases

Outre l'axe JAK/STAT précédemment mentionné, l'activité tyrosine kinase ALK est également responsable de l'activation de la voie des MAP kinase (MAPK), bien connue pour favoriser de nombreux processus pro-oncogéniques -principalement la croissance et la prolifération- mais également la survie cellulaire (Figure 7)^{59,60}.

Dans les LAGC ALK+, NPM-ALK peut servir de point d'ancrage à la protéine adaptatrice Growth Factor Receptor Bound protein 2 (GRB2)⁴⁵, par interaction avec le domaine Src Homology domain 2 (SH2) de cette dernière. Une fois phosphorylée par ALK au niveau de la tyrosine 160, GRB2 peut recruter le facteur Son Of Sevenless (SOS) qui activera à son tour les MAPK à proprement-parler, c'est-à-dire l'axe constitué par la GTPase Ras et les kinases Erk1/2. L'activation de cet axe induit *in fine* la formation et l'activation du facteur de transcription Activator protein 1 (AP-1), qui favorise la transcription de gènes activateurs du cycle cellulaire (cyclines A1, D3) et réprime celle de gènes qui l'inhibent (p21, p27)^{61,62}. AP-1 est également responsable de l'expression des marqueurs immunophénotypiques CD30⁵⁹ et granzyme B⁶³ évoqués dans la partie I.C.2.

Parallèlement à cela, relevons que l'axe Ras/Erk1/2 est étroitement intriqué avec l'axe PI3K/Akt/mTOR. Cela peut résulter soit en leur co-activation⁶⁴, soit à l'inverse en l'inhibition de mTOR (mammalian Target Of Rapamycin), ce qui conduit alors à l'induction d'un flux autophagique⁶⁵ : cet aspect fera l'objet d'un développement en partie III.

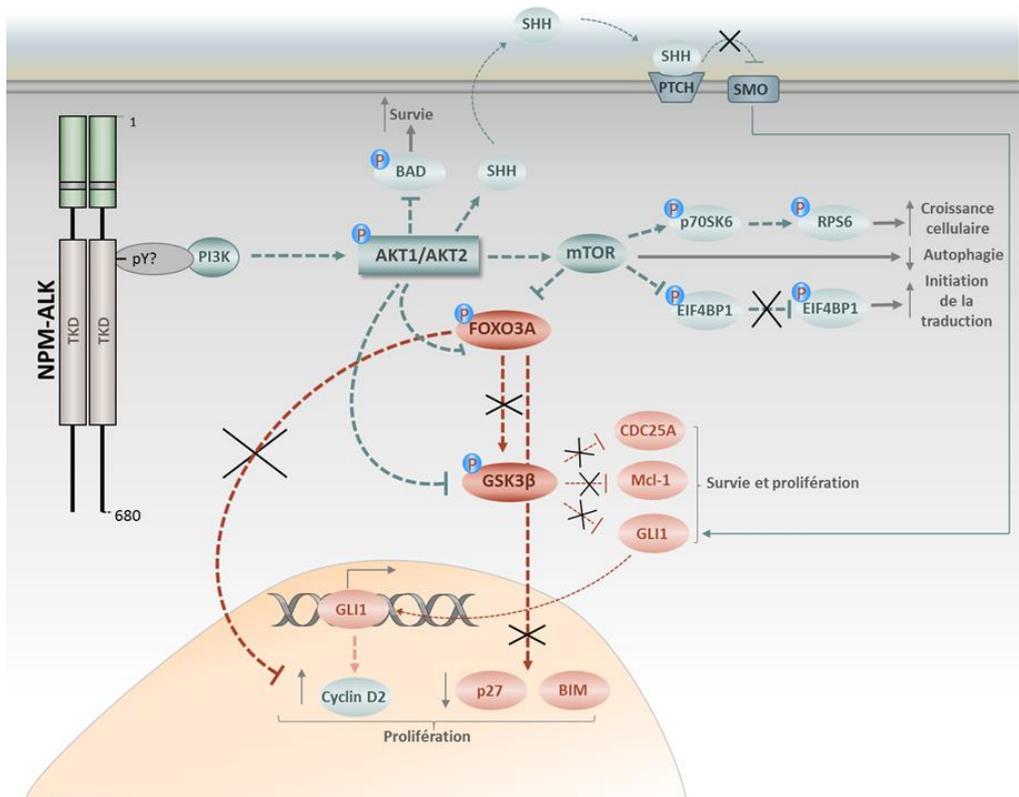


Figure 8. La voie PI3K-AKT. D'après la thèse de Julie Frentzel : adapté de Roskoski et al., 2013, Pearson et al., 2012 et Chiarle et al., 2008^{27,45,53}

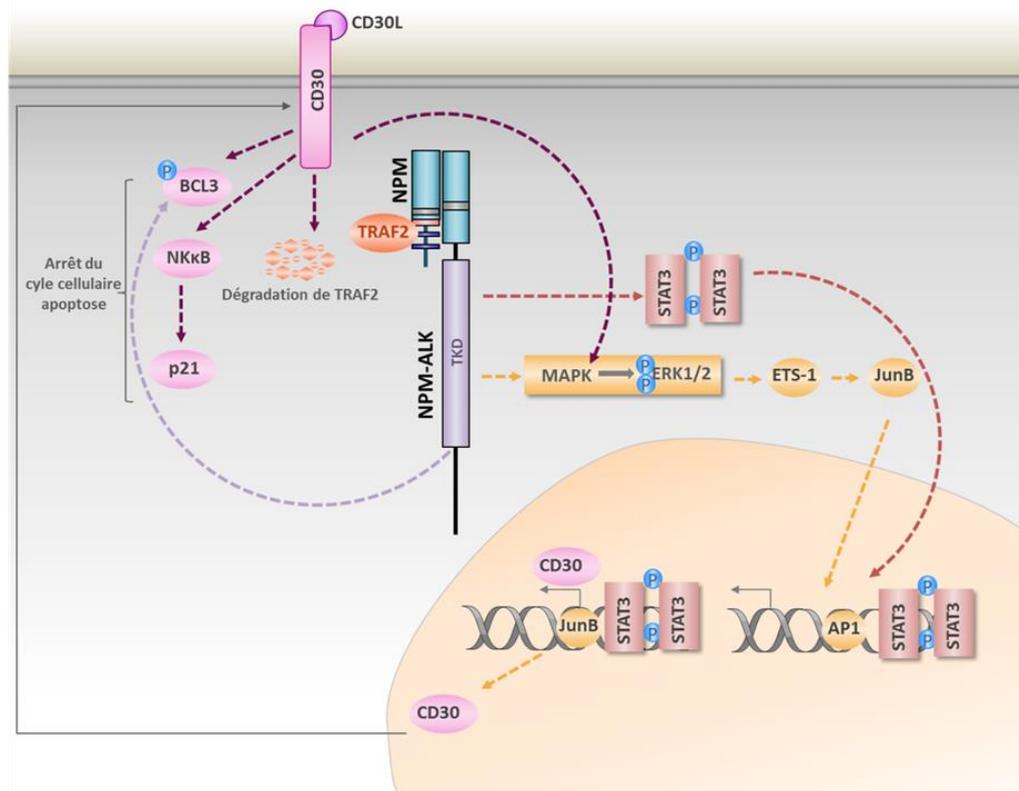


Figure 9. La signalisation médiée par CD30. D'après la thèse de Camille Daugrois : adapté de Roskoski et al., 2013, Pearson et al., 2012 et Chiarle et al., 2008^{27,45,53}

I.E.3 La voie de la phospholipase C γ

NPM-ALK contrôle la prolifération cellulaire en interagissant directement avec la PLC γ . L'amarrage de cette protéine sur NPM-ALK au niveau de la tyrosine Y664 induit l'hydrolyse du phosphatidylinositol en inositol trisphosphate (IP3) et en diacylglycérol (DAG). Ces signaux permettent l'activation de la protéine kinase C (PKC), soit directement par le DAG, soit indirectement suite à une libération du calcium contenu dans les compartiments intracellulaires, médiée par l'IP3. Remarquons que la PKC, peut permettre l'activation des MAPK Erk1 et 2 de manière indépendante de la GTPase Ras^{66,67}.

I.E.4 La voie de la tyrosine kinase SRC

SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase (SRC) est elle aussi une tyrosine kinase régulant les processus de migration, de croissance et de prolifération cellulaire. Dans les LAGC ALK+, SRC peut se lier directement au résidu tyrosine Y418 de NPM-ALK, ce qui permet son activation et la phosphorylation de la GTPase Ras, et donc l'activation Ras-dépendante de la voie des MAPK^{27,67}.

I.E.5 La voie PI3K/Akt

NPM-ALK induit également l'activation de la Phosphatidyl-inositol 3 Kinase (PI3K) ce qui conduit à l'activation par phosphorylation de la sérine/thréonine kinase Akt ; cette dernière favorise à son tour la survie cellulaire (Figure 8). Akt peut en effet inhiber l'apoptose à plusieurs niveaux : en empêchant le clivage de la pro-caspase 9, en bloquant l'action inhibitrice de BAD (BCL-2-associated agonist of cell death) sur le facteur anti-apoptotique BCL-XL, mais aussi en prévenant de concert la dégradation de la protéine antiapoptotique MCL-1 et celle de CDC25a (un régulateur positif du cycle cellulaire) par phosphorylation inhibitrice de la Glycogen Synthase Kinase 3 β (GSK-3 β)^{68,69}.

Akt peut aussi phosphoryler le facteur de transcription Forkhead Box O3a (FOXO3a), ce qui conduit à sa séquestration dans le cytoplasme et l'empêche d'activer la transcription de gènes comme *BIM* (Bcl-2-like protein 11) ou p27, connus pour promouvoir l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire respectivement⁷⁰.

I.E.6 Signalisation en aval de CD30

Comme évoqué plus haut, l'activité tyrosine kinase de NPM-ALK conduit à une surexpression du marqueur CD30 dans les LAGC ALK+. Si les effets de l'engagement du CD30 par son ligand CD30L demeurent cependant controversés⁷¹, des études récentes montrent cependant que l'inactivation du gène CD30 induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S ; de plus, le traitement de lignées de LAGC ALK+ par un anticorps anti-CD30 chimérique (SNG-30) induit la mort de ces cellules par apoptose (Figure 9)^{72,73}. Ces résultats suggèrent que le CD30 pourrait constituer une cible thérapeutique

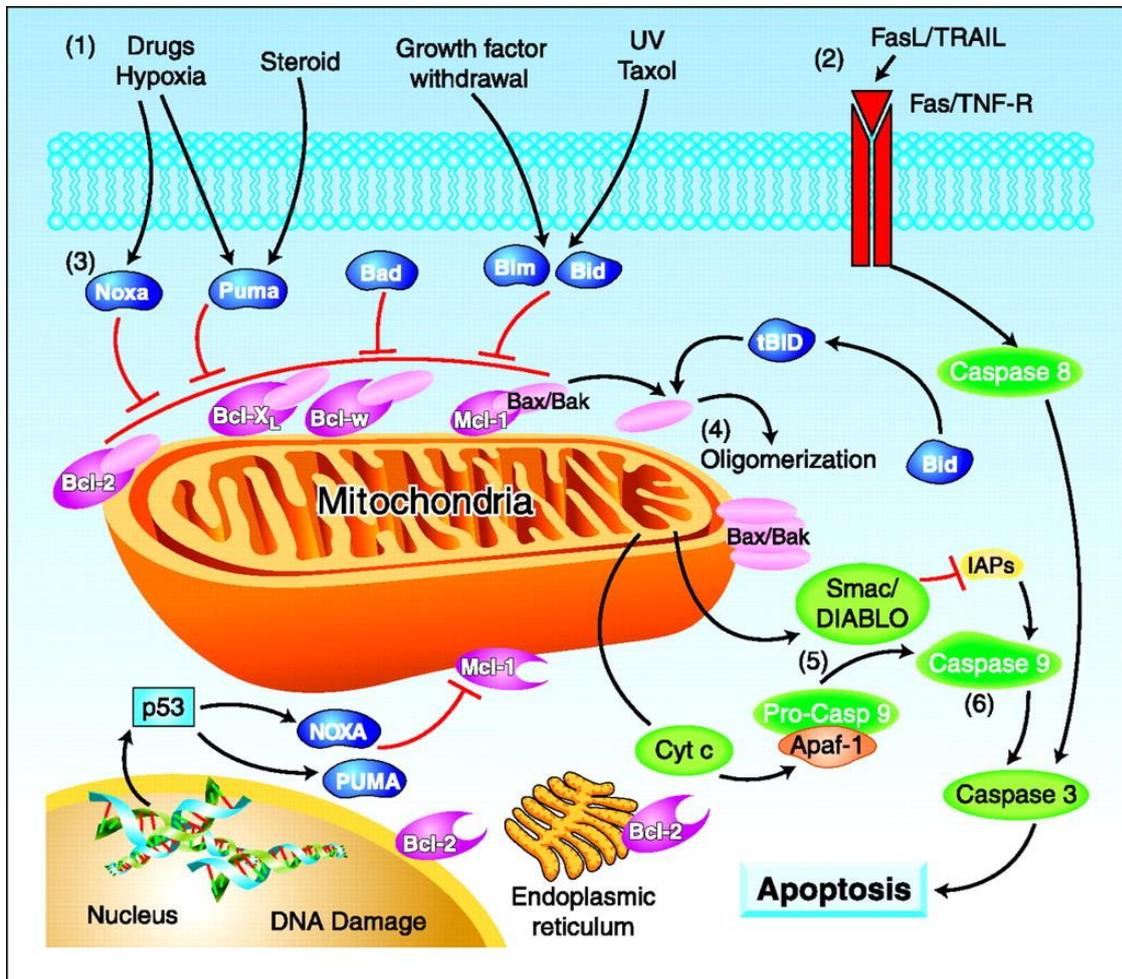


Figure 10. Régulation de la signalisation apoptotique par les membres de la famille Bcl-2. (1) La voie apoptotique intrinsèque est initiée par divers signaux, principalement d'origine extracellulaire. (2) La voie extrinsèque est activée par Fas ligand ou TRAIL, qui activent ensuite la caspase 8. La caspase 8 clive Bid. De plus, la caspase 8 initie la cascade activatrice des caspases. (3) Les protéines à domaine BH3 seul (Bim, Bid, Bad, Noxa, Puma) se lient aux protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, afin de lever l'inhibition de Bax et Bak. (4) Bax et Bak s'oligomérisent et s'activent, ce qui conduit à la perméabilisation de la membrane mitochondriale. (5) Cette perméabilisation permet le relargage du Cytochrome C et/ou Smac/DIABLO au niveau du cytoplasme où ils interagissent avec une molécule adaptatrice, APAF-1, ainsi que la procaspase 9, inactive, au sein d'un complexe nommé l'apoptosome. Smac/DIABLO lève la répression sur la caspase 9. (6) La caspase 9 active la caspase 3, ce qui initie la cascade activatrice des caspases. Convergence des voies apoptotiques extrinsèque et intrinsèque, vers l'activation de la caspase 3. *Adapté de Min H. Kang et al., Clinical cancer research, 2012*³²⁷

dans les LAGC ALK+, et un anticorps anti CD-30 (brentuximab) couplé à la vedotine a obtenu une AMM en ce sens.

I.F. LES MEMBRES DE LA FAMILLE BCL-2 DANS LES LAGC ALK+

Les facteurs appartenant à la famille B-cell lymphoma (nommée en référence à la protéine Bcl-2 qui en est le prototype) sont des protéines conservées au cours de l'évolution. Elles sont caractérisées par la présence de Bcl-2 Homology domains (domaines BH), et sont principalement connues pour leur rôle clé dans la régulation du processus d'apoptose, une forme de mort cellulaire programmée.

I.F.1 Généralités

Les protéines membres de la famille Bcl-2, codées par 25 gènes au total, se répartissent en 2 catégories : les facteurs pro-apoptotiques (Bax, Bak...) et, à l'opposé, les facteurs anti-apoptotiques (Bcl-2, Mcl-1...). L'équilibre entre ces deux catégories de facteurs (expression, activité) représente un véritable « checkpoint apoptotique » et constitue un élément clé dans la régulation de la voie apoptotique intrinsèque, dite mitochondriale, en intervenant au niveau de la membrane externe de la mitochondrie. Par conséquent, dans un contexte tumoral, les membres de cette famille peuvent être considérés comme ayant un effet suppresseur de tumeur, comme c'est le cas pour les pro-apoptotiques Bax et Bak, ou à l'inverse comme des oncogènes majeurs qui favorisent la survie des cellules tumorales : c'est par exemple le cas de Bcl-2, qui est surexprimé dans plus d'un cancer sur deux, et qui tire précisément son nom d'une variété de lymphome^{74,75}.

Tous les membres de cette famille ont en commun de posséder un ou plusieurs domaines BH (BH1, BH2, BH3 and BH4), qui sont les déterminants clés de leurs fonctions. Ainsi, les facteurs anti-apoptotiques possèdent en général les domaines BH1 et BH2 (Bcl-2 possède les 4 types de domaines) ; tandis que tous les facteurs pro-apoptotiques (Bax, Bak...) ont en commun de porter au minimum le domaine BH3, qui leur confère la faculté de se dimériser avec les autres protéines de la famille Bcl-2.

En conditions normales, les protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1, localisées à la surface de la mitochondrie, peuvent séquestrer les facteurs pro-apoptotiques tels que Bax et Bak en formant des hétérodimères avec ces derniers, empêchant l'interaction de ces facteurs pro-apoptotiques entre eux. En présence d'un stimulus apoptotique, Bcl-2, Bcl-XL ou Mcl-1 peuvent se retrouver à leur tour séquestrées par des protéines dites « à domaine BH3 seul » comme Bim et Bad, et Bax ou Bak sont alors libres de dimériser pour former des pores à la surface de la mitochondrie. Cette perméabilisation de la membrane mitochondriale permet le relargage du cytochrome C dans le cytoplasme, ce qui est un signal conduisant à l'activation des caspases, et entraînant la mort cellulaire par apoptose (Figure 10)⁷⁴.

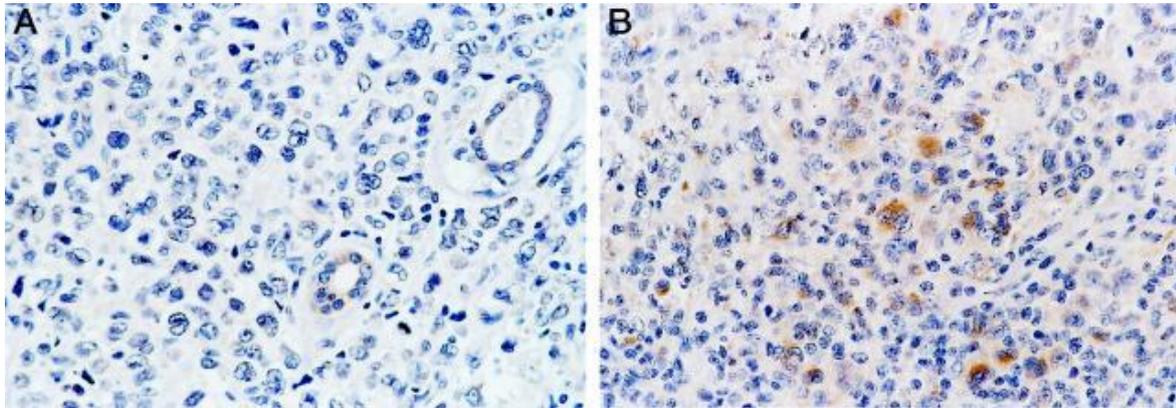


Figure 11. Profil de détection en immunohistochimie de Bcl-xL dans des LAGC ALK+ et ALK-. **A.** Absence d'expression de Bcl-xL dans un cas de LAGC ALK+ cutané. Des annexes cutanées sont cependant faiblement marquées. **B.** Forte expression de Bcl-xL dans un cas de LAGC ALK-. Une faible proportion de lymphocytes réactionnels sont faiblement mais positivement marquées pour Bcl-xL. *Rassidakis et al., The American Journal of Pathology, 2001*⁷⁸

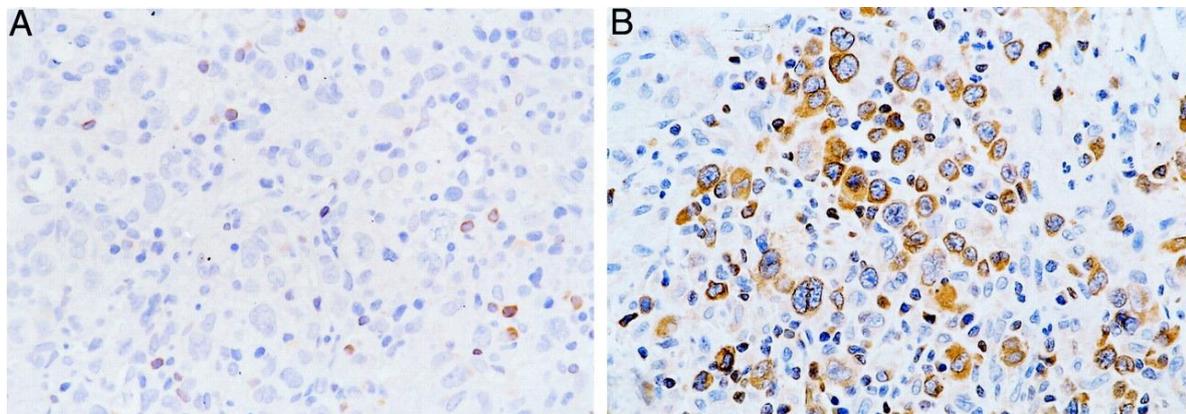


Figure 12. Profil de détection en immunohistochimie de Bcl-2 dans des LAGC ALK+ et ALK-. **A:** Absence d'immunoréactivité de Bcl-2 dans les LAGC ALK+. **B:** Cas de LAGC ALK- avec fort marquage cytoplasmique de Bcl-2. *Rassidakis et al., The American Journal of Pathology, 2001*⁷⁸

I.F.2 Expression dans les LAGC ALK+ et cas particulier de Bcl-2

Dans les LAGC ALK+, plusieurs études suggèrent que l'expression de ALK affecte le profil d'expression des membres de la famille Bcl-2, et la balance des facteurs pro/anti-apoptotiques. Des travaux ont ainsi montré que Mcl-1, un membre anti-apoptotique de la famille Bcl-2 (et fonctionnellement redondant avec la protéine éponyme) était surexprimé dans les LAGC ALK+ et constituait à la fois l'un des principaux oncogènes en aval de NPM-ALK ainsi qu'une cible thérapeutique potentielle de grande d'importance⁷⁶. Des travaux réalisés dans notre équipe ont en outre permis de mettre en évidence que dans ces cellules, NPM-ALK induisait la surexpression de Mcl-1 en réprimant l'expression de miR-29a, un régulateur négatif de l'expression de Mcl-1⁷⁷.

D'un point de vue plus général, des travaux réalisés sur des échantillons de patients ainsi que sur des lignées cellulaires indiquent cependant que par comparaison avec les LAGC ALK-, les LAGC ALK+ expriment plus fortement certains membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, tels que Bax ou Bcl-xS, et plus faiblement des facteurs anti-apoptotiques comme Bcl-xL, issu du même gène *BCL2L1* que Bcl-xS mais provenant d'un épissage alternatif (Figure 11)⁷⁸. Enfin, une observation encore plus frappante (réalisée notamment par notre équipe) est l'apparente absence d'expression de Bcl-2 dans la majorité des LAGC ALK+. Ceci s'illustre en particulier par une absence de détection de la protéine par immunohistochimie, spécifiquement dans les échantillons de patients atteints de LAGC ALK+, par opposition aux LAGC ALK-(Figure 12)⁷⁸⁻⁸⁰. Cette tendance générale, en particulier le profil d'expression de Bcl-2, pourrait permettre d'expliquer le pronostic plus favorable ainsi que la plus grande chimiosensibilité des LAGC ALK+, dans la mesure où plusieurs études ont permis d'établir 1) que des taux élevés de Bcl-2 corrélaient avec l'agressivité et 2) qu'ils pourraient être à l'origine de moins bonnes réponses aux traitements^{75,81}.

Cette observation surprenante, qui suggère que l'expression de l'oncogène NPM-ALK est paradoxalement responsable de la répression de celle de l'oncogène Bcl-2, constitue la pierre angulaire de mon travail de thèse : ce travail explore à la fois les conséquences dans le contexte des nouvelles thérapies ciblant ALK, ainsi que les mécanismes moléculaires potentiellement impliqués.

II. CONTRÔLE DE L'EXPRESSION GENIQUE AU NIVEAU POST-TRANSCRIPTIONNEL PAR NPM-ALK DANS LES LAGC ALK+

Selon le dogme classique de la biologie moléculaire, l'ARN messager (ARNm) constitue l'intermédiaire qui permet la transition de l'information contenue dans l'ADN (au niveau des gènes) vers sa traduction en protéine. Cependant, la mise en évidence de nombreuses autres fonctions des ARN, notamment la découverte du rôle central des ARN dits « non codants » dans la cellule, ont replacé cette molécule au cœur d'une vision globale plus complexe de la biologie moléculaire. La place centrale occupée par les

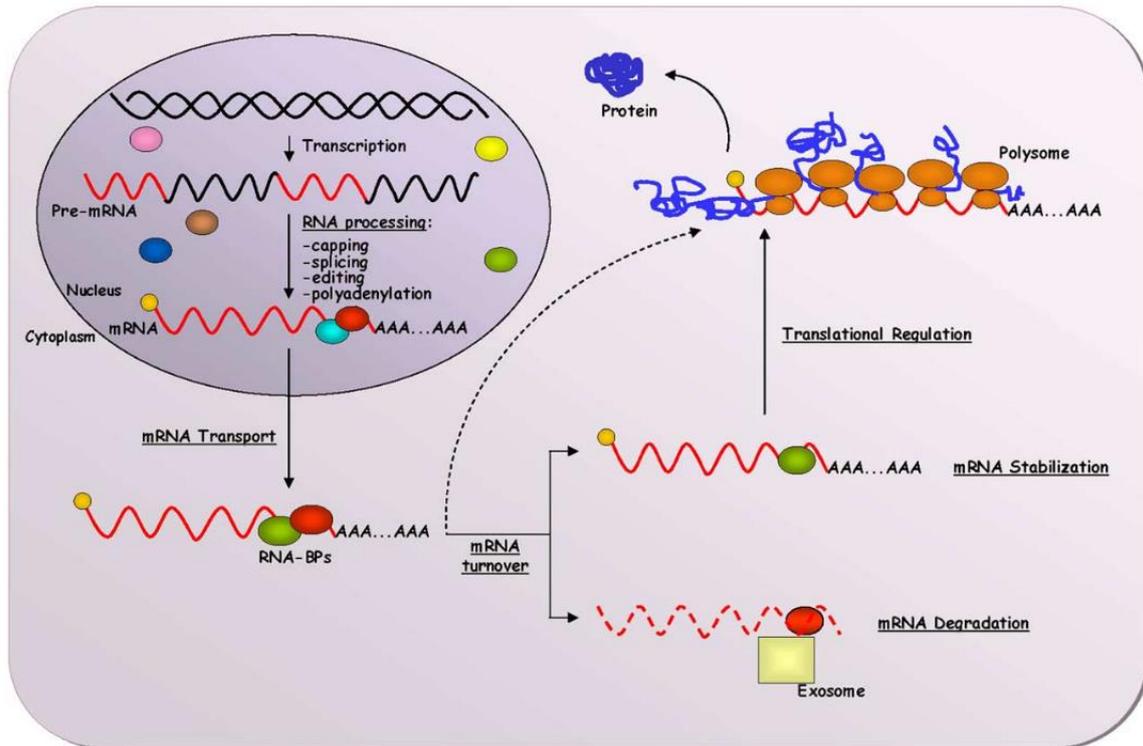


Figure 13. Schéma simplifié de la régulation post-transcriptionnelle d'un gène. Les précurseurs des ARNm (ARNpm) sont maturés en ARNm dans le noyau. La maturation consiste en l'addition d'une coiffe en 5', d'une queue poly-A en 3', en l'excision des régions introniques (épissage) et en l'édition des ARNm. L'ARNm mature est ensuite exporté au cytoplasme où il subit les processus de stabilisation ou de dégradation (« turnover »). Si l'ARNm n'est pas dégradé, il est recruté au niveau des polysomes pour y être traduit. *Adapté de Lopez de Silanes et al., 2008*⁸²

ARNm dans la transmission de l'information génique est ainsi apparue comme le théâtre d'un niveau de régulation supplémentaire de l'expression génique, faisant entre autres intervenir de multiples autres types d'ARN non codants (dont par exemple les miARN pour l'interférence à l'ARN). On parle ainsi de régulation post-transcriptionnelle, pour décrire les mécanismes de contrôle de l'expression génique intervenant entre la transcription et la traduction. Ces régulations englobent les étapes suivantes : la maturation des pré-ARNm, l'export nucléo-cytoplasmique des ARNm matures ainsi que la vérification de leur intégrité, le contrôle de leur demi-vie, de leur traductibilité et le contrôle de leur localisation subcellulaire (qui est étroitement liée à toutes les régulations mentionnées précédemment) (Figure 13)⁸². Dans la suite de ce manuscrit, le propos sera focalisé sur les mécanismes abordés au cours de ma thèse, c'est-à-dire les mécanismes impliqués dans la régulation de la demi-vie et de la traductibilité des ARNm : l'interférence ARN et la régulation par les protéines de liaison aux motifs riches en adénine et uridine (« AU-Rich Elements », ARE-binding protein ou ARE-BP).

II.A L'INTERFERENCE A L'ARN ET LES MICROARN (miARN)

II.A.1 Biogenèse des miARN

Les miARNs sont des petits ARN non codants, de 22 nucléotides de long en moyenne, que l'on retrouve chez les plantes, les animaux, chez certains virus ainsi que chez la levure. Initialement découverts chez *Caenorhabditis Elegans*⁸³, ils jouent en général un rôle de régulateurs post-transcriptionnels de l'expression génique de par leur incorporation au sein du complexe RISC (RNA-induced silencing complex) : ils permettent de recruter celui-ci au niveau des régions 3'UTR d'ARNm cibles, dont ils induisent alors l'inhibition traductionnelle et/ou la dégradation.

Les gènes codants les miARNs sont généralement transcrits par l'ARN polymérase II sous forme de longs transcrits primaires (miARN primaires ou pri-miARN), qui s'apparentent aux ARNm puisqu'ils comportent une coiffe, sont polyadénylés, et peuvent atteindre plusieurs kilobases^{84,85}. Ces pri-miARN adoptent très vite une structure secondaire en tige-boucle qui héberge le ou les miARN mature(s). Les pri-miRs sont ensuite pris en charge dans le noyau par un complexe « microprocesseur » composé entre autres des facteurs Drosha (une RNase III) et de DiGeorge syndrom critical region 8 (DGCR8), une protéine de liaison aux ARN (RNA-BP) liant les ARN doubles brins. Le microprocesseur réalise le clivage de la structure tige boucle et permet la formation des pre-microARNs ou pre-miRs (d'environ 70 nucléotides). Ces pre-miRs sont ensuite exportés dans le cytoplasme par l'intermédiaire de l'exportine 5⁸⁶. Dans le cytoplasme, les pre-miRs sont pris en charge par un deuxième complexe protéique comportant le facteur Dicer (une autre RNase III) qui permet la libération d'un duplex d'ARN « brin guide » / « brin passager » d'une taille comprise entre 19 et 24 nucléotides⁸⁷. Ce duplex est

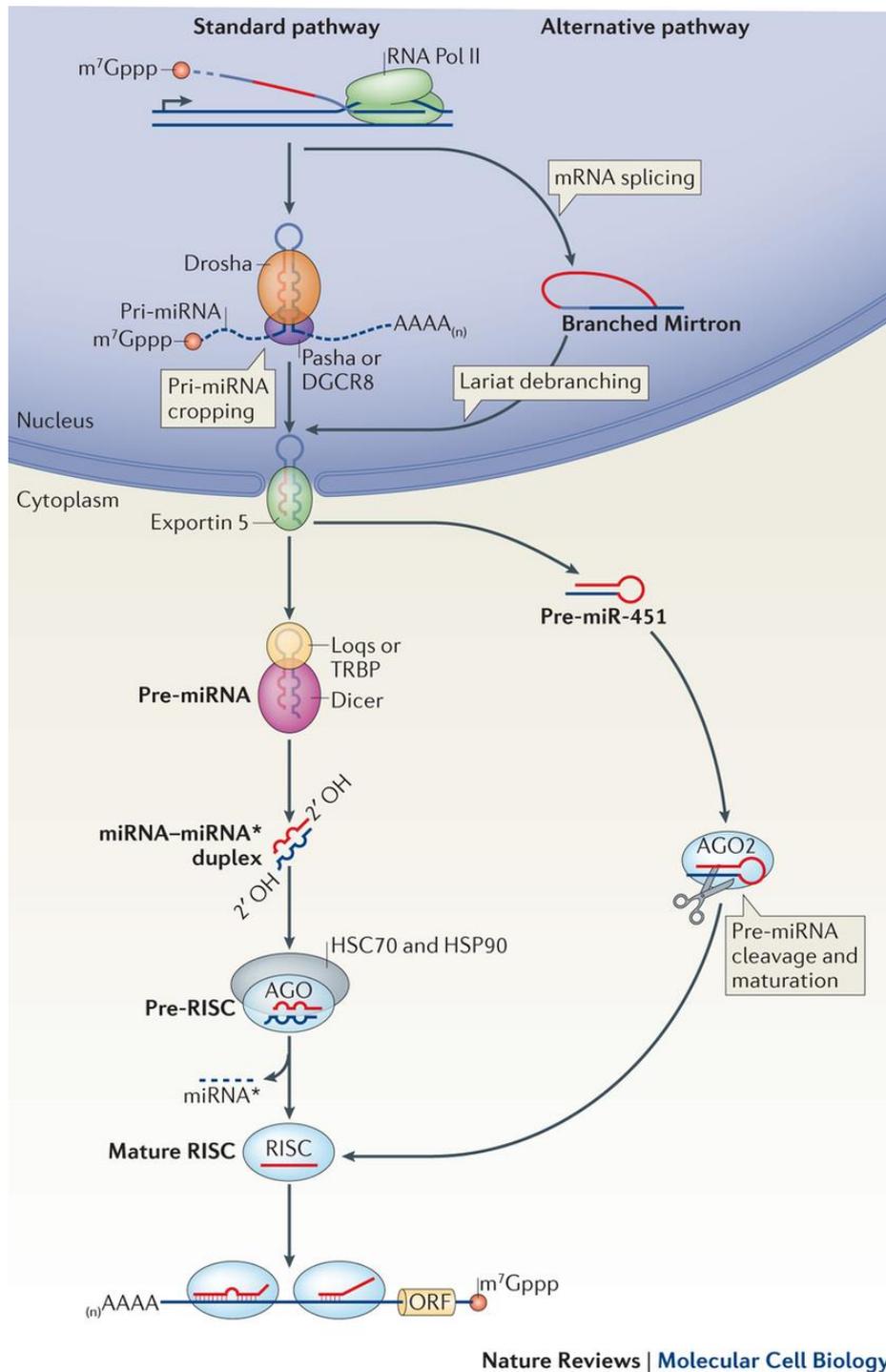


Figure 14. Biogenèse des miARN. La voie de biosynthèse canonique des miARN passe par la transcription de pri-miRs par l'ARN polymérase II. Ces pri-miRs sont ensuite pris en charge et clivés par Drosha-DGCR8 (Di Georges critical syndrom 8) pour former des pré-miRs. Ces pré-miRs sont exportés dans le cytoplasme *via* l'exportine 5 où ils seront maturés par Dicer-TRBP (Tar-RNA binding protein 2) puis chargés sur le complexe RISC (RNA-induced silencing complex) *via* la protéine Ago2. C'est ce complexe qui confère aux miRs une activité de régulation post-transcriptionnelle en permettant soit l'inhibition de la traduction, soit la dégradation d'ARNm. Il existe également des voies non canoniques de biosynthèse de miRs ne nécessitant pas l'action de Drosha-DGCR8, comme par exemple les miRtrons (miRNA contenus dans des introns), maturés par le spliceosome avant d'être exportés dans le cytoplasme. Ameres *et al.*, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2013³²⁸.

ensuite chargé au sein d'un complexe nommé pre-RISC (pre-RNA induced silencing complex) composé notamment de deux protéines aux fonctions cruciales : la protéine GW182 et une protéine de la famille des protéines Argonautes (Ago1, Ago2...) ⁸⁸. Après maturation, le brin passager est libéré du complexe puis dégradé, et le brin dit « guide » est lui intégré dans le complexe miRISC (microRNA induced silencing complex) mature (Figure 14) ^{89,90}.

II.A.2 Mécanisme de l'interférence à l'ARN

Comme évoqué plus haut, les miARN jouent le rôle d'ARN guides et permettent, par complémentarité de base, d'acheminer le complexe miRISC vers un ARNm cible dont ils diminueront la stabilité et affecteront la traduction. L'effet final des miARN dépend de plusieurs critères, notamment de l'accessibilité des sites de liaison sur l'ARNm ciblé, ainsi que de la qualité de l'appariement (parfait ou non) entre le miARN et l'ARNm. Un appariement parfait résulte effectivement en un clivage endonucléolytique de l'ARNm par le complexe miRISC : on parle alors d'un « effet siRNA » (short interfering RNA). A l'inverse, un appariement imparfait, ce qui semble constituer la majorité des cas chez les mammifères, induit en premier lieu une inhibition traductionnelle, puis est généralement suivi par une dégradation secondaire de l'ARNm cible (Figure 15). La spécificité d'action d'un miARN dépend ainsi d'une région « seed », de 6 à 8 nucléotides de long, responsable de la reconnaissance des transcrits cibles par appariement avec des sites le plus souvent localisés dans la région 3'UTR (3' UnTranslated Region) des ARNm cibles ^{89,91-94}.

L'étape d'inhibition traductionnelle semble pouvoir intervenir à différentes étapes du processus de traduction. Elle peut être réalisée par interférence avec l'étape d'initiation de la traduction : la protéine de la famille Ago, au sein du complexe RISC, peut effectivement entrer en compétition avec de nombreux facteurs d'initiation de la traduction, comme par exemple eIF4E. Les protéines Ago sont également capables d'inhiber la formation de la structure secondaire « en boucle fermée » de l'ARNm cible, ce qui réduit l'efficacité de leur traduction ⁹⁵. Certaines études mentionnent également une inhibition de la reconnaissance de la coiffe par le ribosome. L'interférence ARN semble également pouvoir intervenir durant les étapes suivantes de la traduction, notamment par interaction du miRISC avec divers facteurs d'élongation, inhibition du recrutement de ribosomes, induction de la dissociation des sous-unités ribosomales, voire entraîner une terminaison prématurée de la traduction, alors qualifiée d'abortive ⁹⁶⁻⁹⁸.

Une fois la traduction stoppée, l'interférence ARN peut donc aussi conduire à la dégradation de l'ARNm cible. Le complexe miRISC peut en effet, par l'intermédiaire de la protéine GW182, contacter des enzymes de déadénylation et/ou de décoiffage au niveau de l'ARNm qui sera alors exposé à l'action

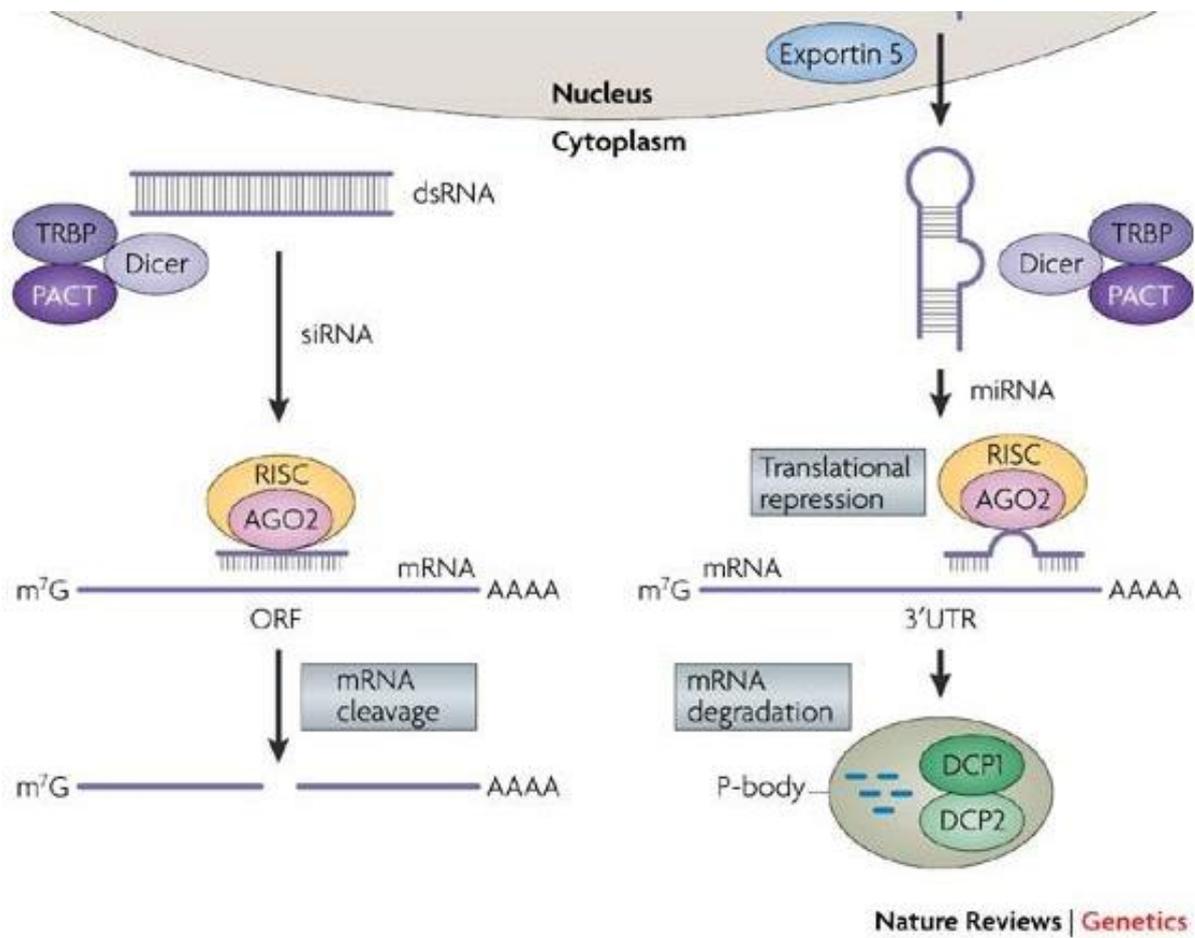


Figure 15. Illustration simplifiée du mécanisme de l'interférence à l'ARN.
 D'après Kim et al., Nature Reviews Genetics, 2006³²⁹

d'exonucléases cytoplasmiques et pris en charge par les systèmes de dégradation de l'ARN (dégradation dans le sens 3'-5' par l'exosome, ou dans le sens 5'-3' exonucléase XRN1 etc...) ⁹⁹.

De plus, comme nous l'indiquions plus haut, le complexe miRISC peut directement réaliser le clivage endonucléolytique de l'ARNm cible et générer des extrémités 5' et 3' non protégées au sein de l'ARNm cible, qui seront rapidement prises en charge et dégradés par les systèmes mentionnés ci-dessus. Comme évoqué plus haut, cet « effet siRNA » semble nécessiter un appariement parfait entre l'ARN interférent et l'ARNm cible, mais aussi requérir spécifiquement la présence, au sein du complexe RISC, de la protéine Argonaute 2 (Ago2) qui, dans la famille des protéines Ago, semble seule capable de réaliser ce clivage endonucléolytique ¹⁰⁰.

Notons enfin que les microARNs fonctionnent en étroite relation avec des structures particulières, les P-bodies (Processing-bodies,) qui sont des lieux de dégradation des ARNm. Ces structures contiennent en effet la plupart des protéines nécessaires au processus de dégradation des ARNm ; mais également des protéines impliquées dans le processus d'interférence à l'ARN comme GW182, ou les protéines Argonautes ^{101,102}.

II.A.3 Rôle des miARN dans les LAGC ALK+

L'altération de l'expression des miARNs est rapportée dans de nombreuses pathologies, en particulier dans les cancers, où ils peuvent soit exercer un rôle d'oncogènes, soit un rôle de suppresseurs de tumeur. L'équipe du Pr. O Merkel a été l'une des premières à réaliser une analyse de l'expression des miARN (sur biopuce) dans les LAGC ¹⁰³, mais plusieurs autres études similaires ont suivi (en utilisant différentes approches comme la RT-qPCR haut débit, le RNA-sequencing) ^{21,77,104-106}. En plus de mettre à jour une liste plus ou moins exhaustive des miARN dont l'expression était dérégulée dans les LAGC ALK+, ces études, complétées par des données fonctionnelles, ont permis de démontrer l'implication de l'oncogène NPM-ALK dans le contrôle du profil d'expression de cette classe d'ARN non-codants, et de mettre à jour le rôle majeur des miARN dans le développement, le maintien du phénotype cellulaire et la résistance aux traitements.

Notre équipe a participé à l'extension de ces connaissances en montrant, chez l'homme et la souris, que l'activité tyrosine kinase de ALK induisait une surexpression du facteur pro-angiogénique Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), *via* l'inhibition de l'expression de miR-16 (l'ARNm VEGF étant une cible directe de ce miARN), ce mécanisme contribuant à la reprogrammation du micro-environnement tumoral au bénéfice des cellules malignes ⁷⁷.

Comme évoqué en fin de partie I, notre équipe a également montré que l'expression de NPM-ALK entraînait la surexpression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1, en réprimant l'expression de miR-

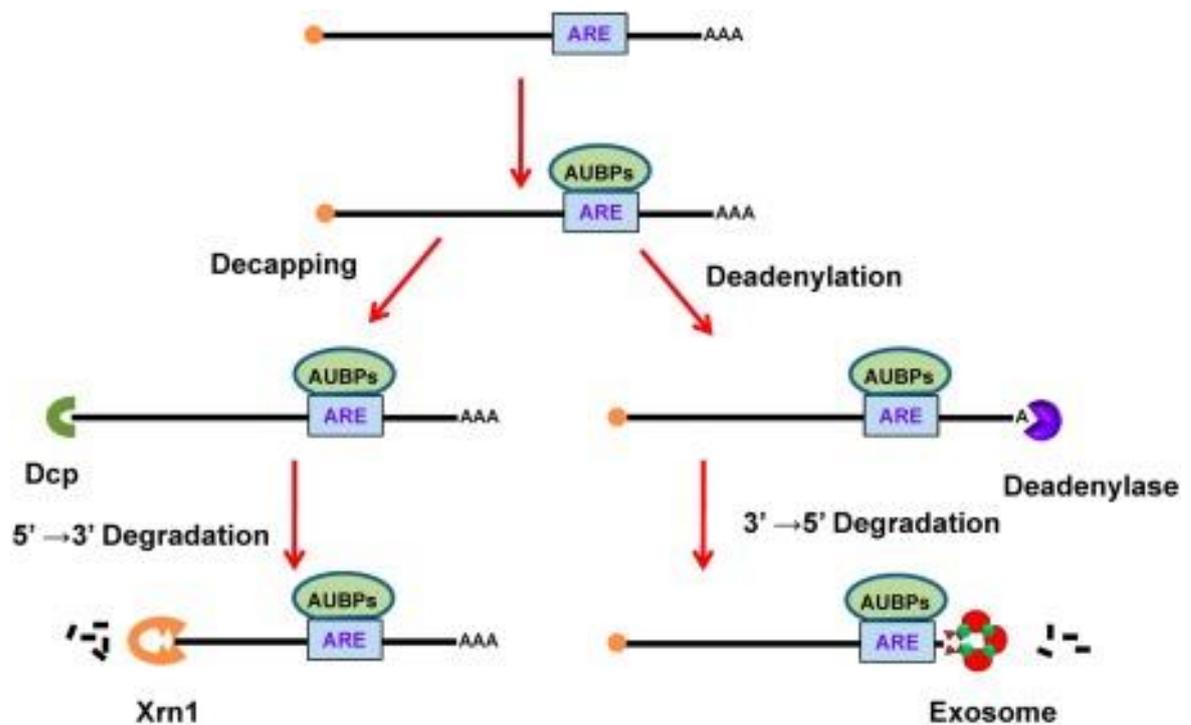


Figure 16. Représentation simplifiée du mécanisme de l'ARE-mediated decay (AMD). Dans le cytoplasme, les ARE-BP peuvent interagir avec les motifs ARE portés par les ARNm. Cette liaison permet le recrutement de Dcp, qui induit le décoiffage de l'ARNm, ou favorise la déadénylation. Les exonucléases peuvent ensuite dégrader l'ARNm dans le sens 5'-3' (Xrn1) ou le sens 3'-5' (exosome). D'après Ahmed et al., 2011³³⁰

29a qui cible cette protéine de la famille Bcl-2⁷⁷. En complément, notons que selon une autre étude, NPM-ALK semble également réprimer l'expression de miR-101, connu lui aussi pour inhiber l'expression de Mcl-1 : dans ce travail, publié par le groupe du Dr Kenner, il est démontré que la sous-expression de ce miARN favorise la prolifération cellulaire¹⁰³. D'autres travaux ont démontré que l'expression de NPM-ALK, dans les LAGC, inhibait l'expression de miR-150¹⁰⁷. Ces données ont été validées dans notre équipe, qui en a ensuite élucidé le mécanisme : NPM-ALK active STAT3 qui, à son tour, active la transcription de la DNA méthyltransferase 1 (DNMT1), capable d'hyperméthyler et ainsi mettre en silence le promoteur du gène hôte de miR-150. Cette perte d'expression de miR-150 dans les LAGC ALK+ se traduit alors par une augmentation de l'expression de l'une de ses cibles, l'oncogène v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog (MYB) qui favorise la prolifération cellulaire⁵⁸.

II.B REGULATION POST-TRANSCRIPTIONNELLE MEDIÉE PAR LES PROTEINES DE LIAISON AUX MOTIFS ARE (ARE-BP)

II.B.1 AU-rich Elements (ARE) et ARE-mediated decay (AMD)

Décrits pour la première fois en 1986 par Shaw et Kamen, les motifs (éléments) riches en Adénine et Uridine (ARE) ont initialement été qualifiés de motifs de « déstabilisation », après avoir observé la dégradation de l'ARNm de la β -Globine de lapin suite à sa fusion à l'ARE de l'ARNm codant la cytokine Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF)¹⁰⁸. La dégradation médiée par les motifs ARE (AMD) consiste, comme l'interférence à l'ARN, en une étape de déadénylation et de décoiffage, suivie d'une prise en charge et dégradation de l'ARNm ARE par la machinerie générale de dégradation des ARN. Ces différentes étapes font intervenir des protéines de liaison aux ARNm ARE (ARE-BPs) capables, en interagissant avec leur transcrite cible, de perturber l'interaction entre la protéine de liaison à la queue polyA (PABP) et/ou les protéines de la coiffe. Comme dans le cas de l'interférence à l'ARN, le recrutement d'un facteur de déadénylation, la Poly(A)-specific RiboNuclease (PARN) permet ensuite généralement la dégradation dans le sens 3'-5' par l'exosome, ou dans le sens 5'-3' par des ribonucléases telles que XRN1 (Figure 16)¹⁰⁹⁻¹¹¹. Pour établir un parallèle supplémentaire avec l'interférence à l'ARN, notons que les ARE-BP déstabilisatrices semblent, à l'instar du complexe RISC, coopérer avec les P-bodies : c'est particulièrement le cas des ARE-BP TTP (TriTetraProlin) et BRF1 (Butyrate Response Factor 1), capables d'acheminer les ARNm ARE vers ces structures¹¹².

On sait aujourd'hui que 5 à 8% des ARNm portent ce type de motifs, le plus souvent au niveau de leur extrémité 3' Non Traduite (3' NT), et qu'il s'agit pour la plupart d'ARNm issus de gènes dits « adaptatifs » ou « environnementaux », c'est-à-dire des gènes devant être exprimés de façon transitoire tels que les gènes codant les cytokines, les facteurs de croissance, les facteurs de transcription, de gènes impliqués dans les processus de réponses au stress ou encore certaines

enzymes du métabolisme^{113,114}. Les séquences ARE sont également fréquemment retrouvées sur des transcrits issus d'oncogènes tels que *c-fos*, *c-myc* ou *c-jun*¹¹⁵.

On distingue plusieurs classes d'ARNm ARE en fonction de la présence et, le cas échéant, de l'organisation d'un motif pentamérique AUUUA initial. Une première classe (classe I) d'ARE correspond ainsi à une localisation « isolée » à l'intérieur ou à proximité d'une région riche en U¹¹⁶. À l'inverse, une seconde classe (classe II) d'ARE correspond à des motifs possédant plusieurs pentamères AUUUA intriqués, et situés à l'intérieur ou à proximité de ces mêmes régions riches en U. Cette classe II est elle-même subdivisée en plusieurs sous-catégories, en fonction de l'organisation de ces pentamères. Enfin, la troisième et dernière classe d'ARE (classe III) est moins clairement définie ; et se caractérise principalement par l'absence de pentamère AUUUA^{113,114,117}.

II.B.2 Les principales ARE-BP et leur rôle dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique

La régulation de l'expression génique impliquant les motifs ARE dépend avant tout des ARE-BP s'y associant. Certaines ARE-BP favorisent ainsi l'aspect déstabilisateur des motifs ARE porté par l'ARNm tandis qu'à l'inverse d'autres ARE-BP ont plutôt pour effet de l'inhiber : on parle alors de « protection contre la dégradation » ou de « stabilisation » des ARNm cibles. Les ARE-BP peuvent également influencer le devenir des ARNm en affectant leur localisation subcellulaire, par exemple en relocalisant ces derniers au niveau des P-Bodies (comme évoqué plus haut) mais aussi les granules de stress ou encore les polysomes¹¹². Si la majorité des ARE-BP sont décrites pour leur effet déstabilisateur sur leur ARNm cibles, comme c'est le cas pour K-homology-type slicing regulatory protein (KSRP)¹¹⁸, TTP¹¹⁹ ou BRF1¹²⁰, d'autres sont d'avantage décrites pour leur rôle protecteur : c'est en particulier le cas de la protéine HuR ; appartenant à la famille ELAV/Hu¹²¹. Le cas de la protéine AUF1 est plus ambivalent, semblant osciller entre stabilisation et déstabilisation selon les transcrits et le contexte cellulaire¹²²⁻¹²⁴. De manière intéressante, dans les LAGC ALK+, il a été montré que l'activité d'AUF1 pouvait être directement modulée par NPM-ALK *via* phosphorylation sur résidu tyrosine. Cette phosphorylation induit une augmentation de la stabilité de ses transcrits cibles (comme *c-Myc*, *Cycline D1*, *A1*, *B2...*)¹²⁵. Enfin, d'autres AU-BPs telles que TIA-1 ou encore TIAR, semblent plutôt impliquées dans la régulation de la traduction de leur transcrits cibles.

Enfin remarquons que la plupart des ARE-BP partagent des transcrits cibles communs : elles sont donc susceptibles de réguler ces transcrits en agissant de manière compétitive ou synergique. Ishimaru et al. ont par exemple montré que, dans un modèle leucémique, la nucléoline et AUF1 entraient en compétition pour respectivement stabiliser ou induire la dégradation du transcrit Bcl-2 (qui est

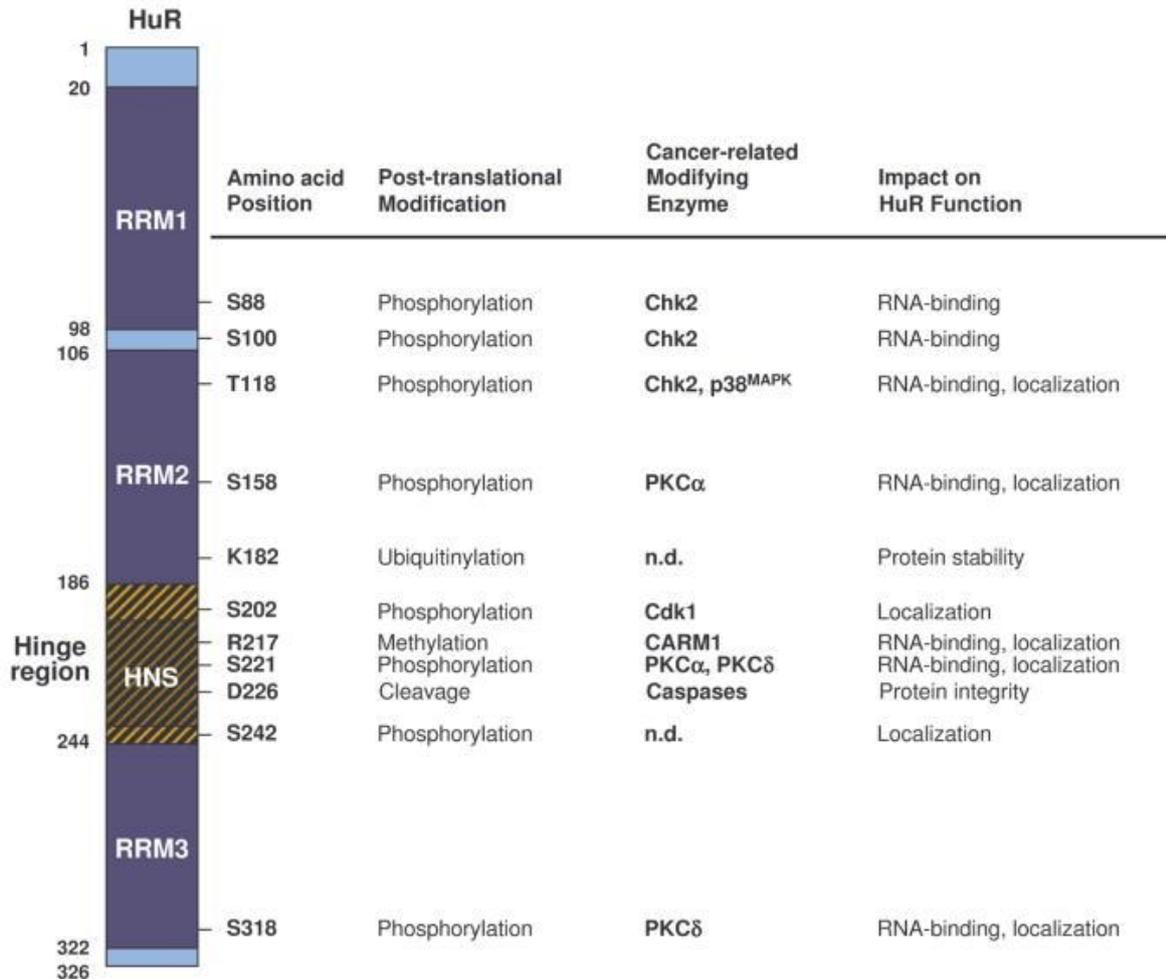


Figure 17. Structure de l'ARE-BP HuR. Localisation des 3 motifs de reconnaissance de l'ARN (RRM) ainsi que de la région "hinge", contenant le domaine de transport nucléocytoplasmique (HNS). Les résidus pouvant faire l'objet de modification post-traductionnelles sont indiqués (colonnes 1 et 2), de même que les enzymes impliquées dans ces modifications (colonne 3) et les propriétés de HuR affectées par ces mêmes modifications (colonne 4). D'après *Abdelmohsen et al., Wiley Interdiscip Rev RNA, 2010*¹²⁹

également connu pour être stabilisé par l'ARE-BP HuR)¹²⁶. Ce type de régulation coordonnée de groupes entiers d'ARNm, eux-mêmes souvent impliqués dans un même processus cellulaire, est à l'origine du concept « d'opéron d'ARN » voire, à un niveau d'organisation supérieur, au concept de « régulon d'ARN » lorsque ces ARNm appartiennent individuellement à de multiples opérons¹²⁷.

II.B.3 Cas de l'ARE-BP HuR dans les LAGC ALK+

Au cours de ma thèse, je me suis particulièrement intéressé à l'ARE-BP HuR (HuR), et notamment à son rôle dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression de Bcl-2 dans les LAGC ALK+.

II.B.3.a Structure

HuR, également nommée Embryonic Lethal Vision 1 (Elav-Like 1) est le seul membre de la famille des protéines Hu à être exprimé de façon ubiquitaire¹²⁸. L'architecture de cette protéine se compose de trois domaines de reconnaissances de l'ARN (RRM) ainsi que d'une région charnière riche en acides aminés basiques, Hinge ou HuR Nucleocytoplasmic shuttling sequence (HNS) (Figure 17)¹²⁹. Les RRM 1 et 2 de HuR sont principalement impliqués dans la reconnaissance des transcrits cibles de HuR, tandis que le RRM 3 serait permettrait l'oligomérisation de HuR (requisse pour exercer sa fonction après interaction avec son transcrit cible) et son interaction avec d'autres protéines partenaires^{130,131}. La région Hinge quant à elle serait, impliqué dans la stabilisation des complexes HuR/ARNm, en plus de son rôle explicite dans le trafic nucléocytoplasmique de HuR^{131,132}.

II.B.3.b Fonctions

HuR est une protéine majoritairement nucléaire capable d'être exportée vers le cytoplasme. Elle est ainsi impliquée dans différentes étapes, nucléaires comme cytoplasmiques, du processus d'expression génique : l'épissage alternatif, la polyadénylation des transcrits néosynthétisés, la stabilisation des ARN et la maturation des miARN. Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons de façon privilégiée à son rôle cytoplasmique dans la stabilisation/déstabilisation des ARNm.

L'export nucléaire de HuR est induit par son association avec les protéines nucléaires pp32 et APRIL qui, grâce à des motifs d'exports nucléaires (NES), sont reconnues et prises en charge par la protéine d'export CRM1. A l'inverse, l'import de HuR se fait grâce à son association avec les transportines 1 et 2¹³³⁻¹³⁵.

La délocalisation de HuR au cytoplasme dépend d'une grande variété de stimuli externes, tels que les cytokines, les facteurs de croissance, les médiateurs de l'inflammation et hormones, les UV, l'hypoxie, le stress oxydatif ou encore la carence en nutriments. Tous ces stimuli vont déclencher l'activation de

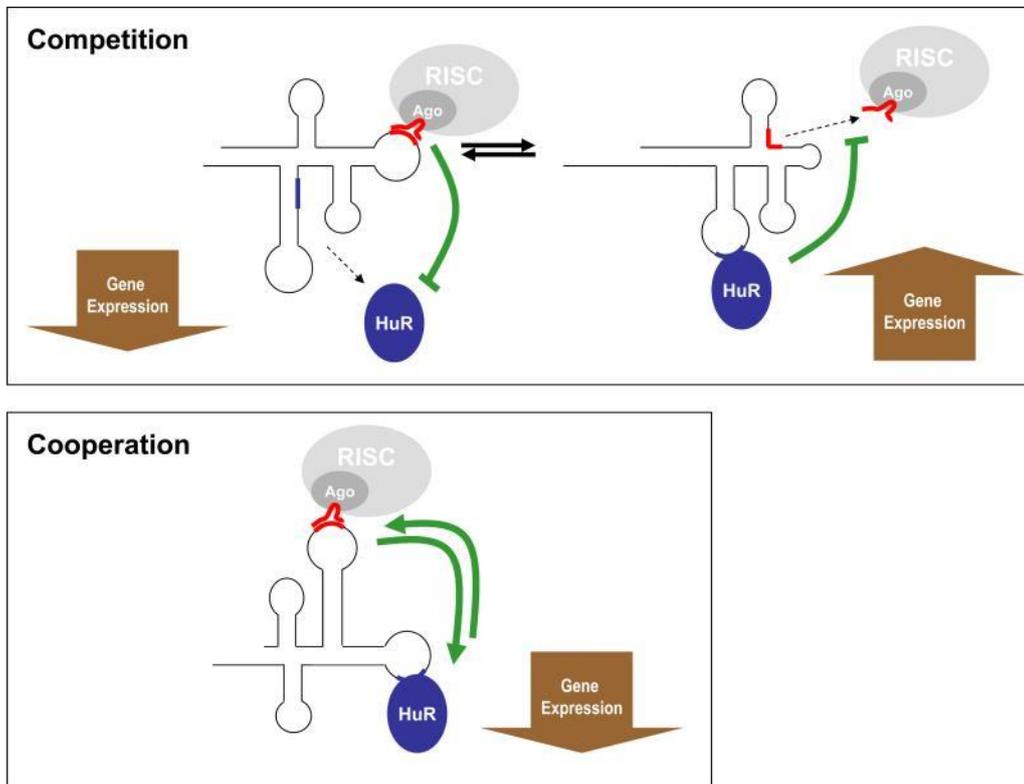


Figure 18. Schéma simplifié d'un dialogue de type coopératif ou de type compétitif entre HuR et les miARN. Haut. Modèle compétitif: la liaison du miARN au transcrite cible induit un changement conformationnel de ce dernier masquant le site de liaison de HuR à cet ARNm, ce qui diminue in fine le taux d'ARN ciblé. A l'inverse, la liaison de HuR au transcrite modifie la structure de ce dernier et masque son site de fixation pour le complexe miRISC, ce qui se traduit par une augmentation du taux de transcrite. Bas. Modèle coopératif: l'interaction entre HuR et le transcrite favorise le recrutement du complexe miRISC sur le transcrite cible commun, résultant en une diminution du taux d'ARNm ciblé. D'après *Srikantan et al., Curr Protein Pept Sci, 2012*¹³⁶

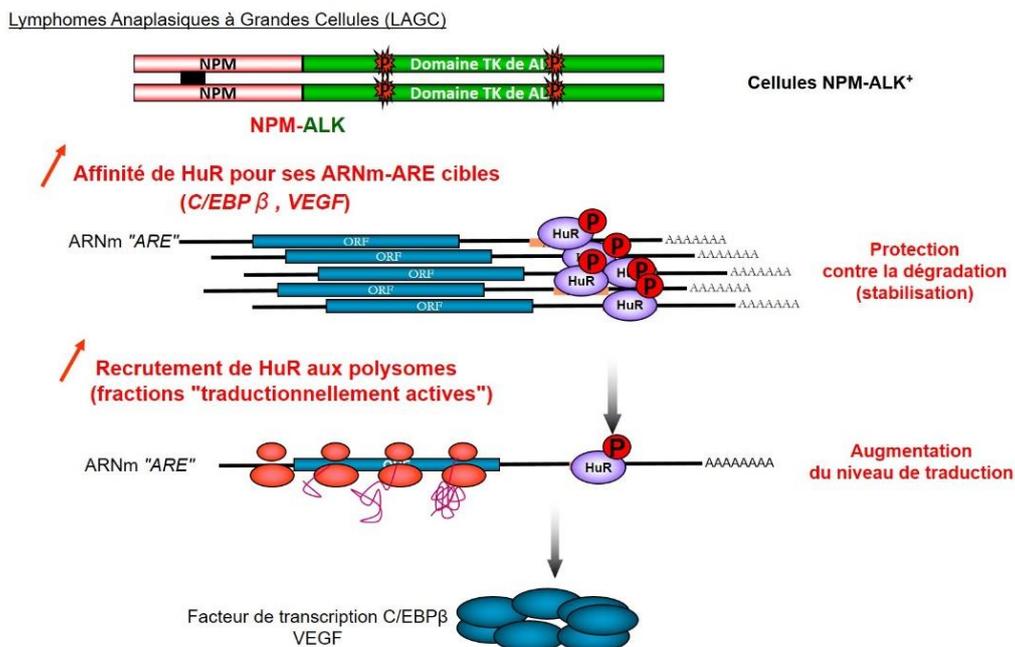


Figure 19. Représentation des rôles de HuR décrits dans les LAGC ALK+. Dans les LAGC ALK+, NPM-ALK peut phosphoryler HuR sur résidus tyrosine, ce qui augmente son affinité pour ses transcrits cibles et module son activité. Par cette interaction accrue, les transcrits cibles (C/EBP β , VEGF) sont stabilisés et leur traduction est accrue.

multiples voies de signalisation et aboutir à des modifications post-traductionnelles de HuR à l'origine de ce changement de localisation subcellulaire. Ces modifications peuvent consister en des ubiquitinations, des méthylations mais surtout de phosphorylations, à la fois sur sérine/thréonine mais aussi sur des résidus tyrosine¹²⁹. Selon la nature de ces modifications et les résidus ainsi modifiés, les effets peuvent dépasser le cadre du seul changement de localisation subcellulaire, et impacter directement la stabilité de la protéine HuR elle-même (ubiquitination déstabilisatrice sur la lysine 182), voire moduler son affinité pour ses transcrits cibles (phosphorylation sur la sérine 318 augmentant l'affinité pour les transcrits Cyclin D1, Cyclin A et Cox-2) ainsi que ses fonctions (stabilisation, et augmentation de la traductibilité de l'ARNm C/EBP β).

De manière remarquable, les séquences riches en ARE reconnues par HuR sont également les cibles de miARN. La stabilité/traduction des cibles de HuR pourrait ainsi dépendre d'un dialogue de nature « coopérative » ou « compétitive » entre cette ARE-BP et des miARN (Figure 18)^{136,137}. Cette hypothèse est étayée par de nombreuses données, comme par exemple le rôle « compétiteur » de HuR dans la levée de la répression traductionnelle de l'ARNm CAT1 exercée par miR-122 en réponse à un stress cellulaire. A l'inverse, d'autres travaux montrent que HuR favorise le recrutement de miARN au niveau des régions 3'UTR de certains ARNm (comme par exemple let7 au niveau de l'ARNm c-Myc), participant ainsi de manière active à l'inhibition de leur expression. HuR est ainsi considéré comme un facteur clé modulant l'activité des microRNA¹³⁶.

II.B.3.c Modulations par NPM-ALK de l'activité et de l'affinité de HuR pour ses cibles dans les LAGC

HuR, dont l'expression est ubiquitaire, est surexprimée dans la majorité des cancers, dans lesquels des études à grande échelle ont par ailleurs montré que sa proportion cytoplasmique était plus élevée que dans les cellules normales. De manière cohérente avec son rôle de protéine impliquée dans divers processus de réponses aux stress, la surexpression et l'accumulation cytoplasmique de HuR dans les cancers favorisent le processus tumoral, en stabilisant notamment des transcrits issus de gènes codant pour des protéines pro-oncogéniques telles que la déacétylase SIRT1, Mcl-1, VEGF, COX-2 ou encore Bcl-2^{136,138}.

Dans les LAGC ALK+, mon équipe a montré que NPM-ALK était capable de phosphoryler HuR sur résidus tyrosines et que cette phosphorylation augmentait son affinité pour ses gènes cibles, notamment le facteur de transcription C/EBP β , facteur ayant un rôle majeur dans la cancérogenèse des LAGC ALK+. Cette interaction accrue entre HuR et C/EBP β favorise à la fois la stabilité et la traduction de cet ARNm et *in fine* le processus tumoral (Figure 19)¹³⁹. Des travaux complémentaires non publiés, obtenues dans des lignées cellulaires humaines, et un modèle murin de xénogreffes, confirment par ailleurs que

la phosphorylation ALK-dépendante de HuR sur résidus tyrosines est nécessaire au maintien du phénotype tumoral dans les LAGC ALK+.

III. TRAITEMENT DES LYMPHOMES ANAPLASIQUES A GRANDES CELLULES

Il n'existe à ce jour pas de réel consensus international, européen ou même national quant au traitement des LAGC. Le choix du protocole thérapeutique le plus adapté est généralement réalisé suite à la mesure du volume tumoral, par tomoscintigraphie par émission de positons (TEP ; PET Scan). Plusieurs possibilités s'offrent alors au clinicien ; et les principales options thérapeutiques disponibles seront détaillées dans ce chapitre.

III.A. LES CHIMIOTHERAPIES

Dans la très grande majorité des cas, c'est la chimiothérapie qui constitue l'option thérapeutique standard, du moins en 1^{ère} intention. Chez les adultes, le protocole thérapeutique courant est celui des lymphomes agressifs, c'est-à-dire le protocole CHOP^{140,141}. Celui-ci combine 4 types de drogues :

- Le **Cyclophosphamide**, un agent alkylant appartenant à la famille des moutardes azotées. Il agit en formant des liaisons covalentes avec l'ADN, et engendre ainsi la formation de ponts alkyles intra-brins ou inter-brins. Ces ponts ont pour principal effet d'inhiber la réplication de l'ADN lors de la mitose, ce qui conduit à la mort de la cellule par apoptose. L'efficacité de cette drogue dépend donc lourdement du cycle cellulaire, elle est virtuellement inefficace sur les cellules en G0.
- L'**Hydroxydaunorubicine** (doxorubicine ou adriamycine) est une anthracycline : elle agit donc comme un agent intercalant de l'ADN et inhibe l'action de la topoisomérase II, une enzyme impliquée dans le maintien d'une structure tridimensionnelle « ouverte » de l'ADN, qui est notamment requise lors de la réplication.
- La vincristine (**Oncovin**), un alcaloïde extrait de la pervenche de Madagascar qui agit comme un poison du fuseau mitotique. En se fixant sur des dimères de tubuline libres, la vincristine empêche effectivement la polymérisation des microtubules ce qui entraîne un arrêt de la division cellulaire et déclenche l'entrée en apoptose.
- La **Prednisone**, qui est un anti-inflammatoire stéroïdien dérivé de la cortisone.

L'étoposide, un autre inhibiteur de topoisomérase II, est actuellement considéré comme supplément à ce protocole¹⁴².

Le traitement des LAGC pédiatriques est lui basé sur une chimiothérapie intensive, mais en cures courtes et discontinues, de manière à optimiser l'effet thérapeutique tout en limitant de potentielles

séquelles à long terme pour les enfants. Le protocole de référence pour le traitement des enfants est le protocole ALCL99 qui consiste, en plus de l'administration des molécules du CHOP, en de fortes doses de méthotrexate, un anti-métabolite et, dans le cas des patients à haut risque de rechute, l'ajout de vinblastine, un autre dérivé de la pervenche de Madagascar, en traitement de consolidation^{143,144}.

Il est important de remarquer que le taux de rémission complète obtenu après traitement est actuellement supérieur à 90%, et la survie sans évènements (EFS, « Event Free Survival », temps consécutif au traitement sans évènement ou complication que le traitement est sensé prévenir ou retarder) approche 70%. Cependant, dans la majorité des essais pédiatriques concernant les LAGC ALK+, 25 à 35% des patients ont rechuté ou progressé sous traitement¹⁴⁵. Des solutions thérapeutiques alternatives ou complémentaires à la chimiothérapie sont donc développées.

III.B. CHIMIOTHERAPIES INTENSIVES ACCOMPAGNEES DE GREFFES DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏÉTIQUES

Dans le cas des patients à haut risque de rechute, les cliniciens peuvent opter pour une chimiothérapie à plus haute dose. De manière à contrer la forte hématotoxicité générée par les drogues, des greffes de cellules souches s'avèrent alors nécessaires : il s'agit de greffes de cellules souches hématopoïétiques autologues (autogreffe). Cette technique consiste à recueillir et à conserver des cellules souches du patient avant la chimiothérapie intensive hématotoxique, puis à les lui réinjecter quelques jours avant la fin du traitement (autogreffe). On peut aussi utiliser les cellules souches d'un donneur (allogreffe), ce qui peut engendrer une réaction de type « greffon contre le cancer », où les cellules immunitaires du donneur reconnaissent les types mineurs de tissus des cellules cancéreuses du patient comme étrangers, et tuent les cellules cancéreuses. En raison de la durée de l'aplasie, le patient est en général placé dans une chambre stérile : il s'agit donc d'un traitement lourd nécessitant une hospitalisation de 3 à 4 semaines dans un service spécialisé. Cette approche n'est à l'heure actuelle pas considérée comme une approche standard en 1^{ère} intention pour les LAGC ALK+. Il s'agit en revanche de l'option la plus courante en 2^{nde} intention, dans le cas de patients réfractaires ou ayant rechuté après un traitement, en particulier dans le cas des adultes. Toutefois, il n'existe qu'une petite série de patients éligibles pour de telles greffes et peu de données sont actuellement disponibles dans ce type de cas. On sait néanmoins que l'EFS à 3 et 5 ans varie entre 25 et 75% pour l'utilisation de l'autogreffe chez des patients atteints de lymphomes T périphériques en rechute (dont les LAGC ALK+)¹⁴⁶⁻¹⁴⁸, tandis que la survie globale médiane est de seulement 3 mois chez des patients atteints de LAGC non éligibles pour une greffe, avec une survie sans progression (délai entre le début du traitement et la progression de la maladie ou la mort) de 1,8 mois à peine¹⁴⁹. Chez l'enfant, une étude récente a permis de confirmer l'efficacité de l'allogreffe, mais la plupart des cliniciens ne considèrent que le recours à cette technique justifié qu'en cas de deuxième rechute, notamment en raison de la morbidité élevée qu'elle entraîne.

De manière générale, chez l'adulte et chez l'enfant, toutes les options thérapeutiques envisagées en 2nde intention sont lourdes et ont un impact important sur la qualité de vie des patients (notamment pour les enfants). Si l'on considère que certains patients ne sont en outre pas éligibles pour des thérapies impliquant la greffe de cellules souches hématopoïétiques, la nécessité de nouvelles alternatives thérapeutiques dans le traitement des LAGC émerge comme une évidence : ceci a conduit à la mise au point de stratégies thérapeutiques ciblées novatrices avec, en tête de file, le crizotinib, un inhibiteur pharmacologique de ALK.

III.C LE CRIZOTINIB : UNE THERAPIE CIBLANT ALK

III.C.1 Les thérapies ciblées dans les LAGC ALK+ : généralités

En raison de leurs nombreux avantages (mieux tolérées, effets secondaires souvent moins lourds), les thérapies ciblées sont utilisées de plus en plus fréquemment afin d'améliorer l'efficacité des traitements de différents cancers. Souvent complémentaires de la chimiothérapie, voire alternatives à celle-ci, la démocratisation de ces dernières est considérée comme l'une des récentes avancées majeures en oncologie, et leur développement constitue un enjeu crucial pour la pratique clinique des années à venir. Parmi les exemples les plus connus, on peut citer le cas du Trastuzumab (Herceptin), un anticorps monoclonal ciblant Her-2 dans les cancers du sein et l'Imatinib, un inhibiteur de tyrosine-kinase qui inhibe l'activité de BCR-ABL dans les leucémies myéloïdes chroniques.

Dans le cas des LAGC ALK+, plusieurs stratégies de thérapies ciblées sont parallèlement en cours d'investigation ; néanmoins, la majorité des efforts se concentrent sur le développement d'inhibiteurs pharmacologiques de la tyrosine kinase ALK, au cœur de la pathologie. Si plusieurs inhibiteurs de ALK dits « de seconde génération » sont actuellement en cours de développement (brigatinib, alectinib, ceritinib)¹⁵⁰, mon travail de thèse s'est concentré sur le premier de ces inhibiteurs historiquement mis au point, le crizotinib¹⁵¹, qui est à l'heure actuelle le candidat le plus proche de la clinique pour les LAGC, et qui constitue véritablement le prototype de cette classe de molécules. Toutefois, il est nécessaire d'évoquer ici les autres pistes thérapeutiques considérées, qui ne feront pas l'objet d'un développement supplémentaire dans la suite de ce manuscrit. On peut ainsi mentionner la piste qui semble la plus prometteuse après les inhibiteurs de ALK : le ciblage de CD30. CD30 est un marqueur d'activation des lymphocytes B et T qui est surexprimé dans les cellules de LAGC ALK+, et cette cible présente l'avantage de n'être exprimé ni par les précurseurs lymphocytaires, ni par les lymphocytes matures non activés. Un anticorps humanisés conjugué à des molécules cytotoxiques (Brentuximab-Védotine ou SGN-35, ADCETRIS®) permet ainsi de cibler les cellules CD30 positives : suite à l'interaction de type ligand-récepteur et à l'endocytose, la molécule active (dans ce cas un poison du fuseau mitotique) induit la mort par apoptose^{152,153}. Des essais prometteurs dans des cas de LAGC

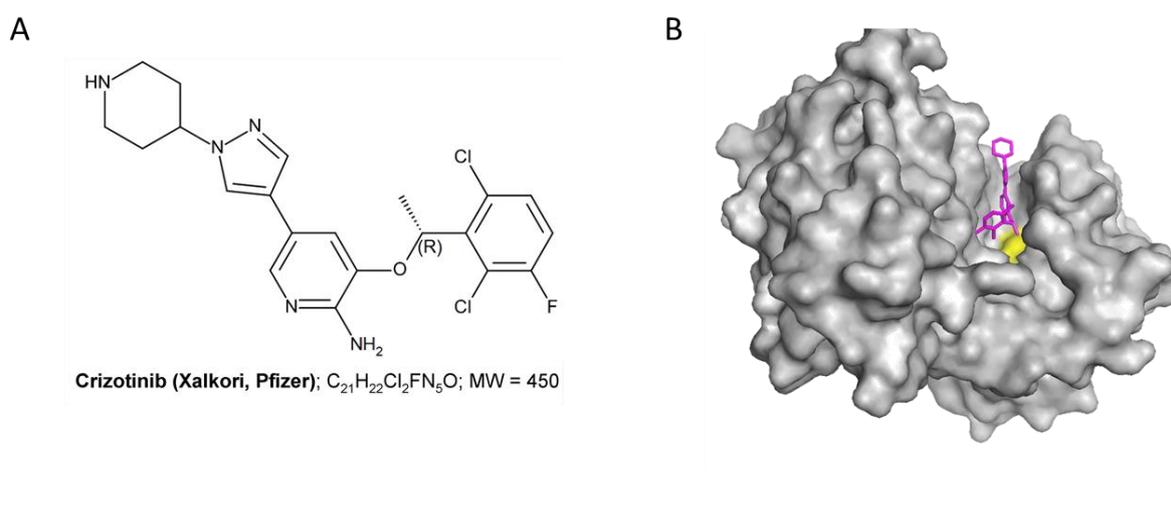


Figure 20. Structure cristallographique du crizotinib complexé à ALK. A. Formule chimique du Crizotinib (PF-02341066, Xalkori®), développé par Pfizer. **B.** Structure de ALK en complexe avec le Crizotinib (en rose) (cristallographie). Le résidu gatekeeper (L1196M, résidu au sein de la poche à ATP contrôlant la sensibilité de la kinase à divers inhibiteurs) est représenté en jaune (représentation visualisée par le logiciel Pymol, code Protein Data Bank 2xp2). D'après la thèse de Julie Frentzel, 2016

ALK+ réfractaires ou en rechute ont conduit à l'approbation du Brentuximab-Védotine par la FDA en août 2011, puis une autorisation de mise sur le marché en Europe et en France pour le traitement des LAGC systémiques récidivants ou réfractaires chez l'adulte. Ces avancées ont permis le lancement de plusieurs essais cliniques actuellement en phase IV dont les résultats sont très attendus (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01909934>)¹⁵⁴⁻¹⁵⁷.

III.C.2 Le crizotinib : découverte, structure et mécanisme d'action

Le crizotinib (PF-02341066, Xalkori®) ou (R)-3-[1-(2,6-dichloro-3-fluoro-phenyl)-ethoxy]-5-(1-piperidin-4-yl-1H-pyrazol-4-yl)-pyridin-2-ylamine, est un inhibiteur de tyrosine kinases développé par la société Pfizer. Cette molécule a été initialement développée afin de cibler la tyrosine kinase c-MET (HGFR, Hepatocyte Growth Factor Receptor), impliquée dans le développement de nombreux cancers. Des criblages pharmacologiques réalisés par la suite ont cependant permis de mettre en évidence que le crizotinib ciblait en réalité pas moins de 13 kinases dont c-MET, mais aussi (et surtout) ALK (36% d'homologie avec c-MET)¹⁵⁸.

Le mode d'action du crizotinib a pu être précisément élucidé lors de la détermination de la structure cristallographique de la molécule, en complexe avec ALK (code Protein Data Bank 2xp2) (Figure 20 ci-contre). Ces expériences de cristallographie montrent en effet que lorsque le crizotinib est lié à ALK, la kinase se trouve dans un état dit « intermédiaire », qui présente certaines (mais pas toutes) caractéristiques de l'état inactif et inhibe la fixation de l'ATP sur la kinase : le crizotinib agit donc comme un inhibiteur compétitif de l'ATP¹⁵⁸.

A l'échelle cellulaire, plusieurs études ont montré que l'inhibition de l'activité tyrosine-kinase de ALK avait pour effet principal d'entraîner une inhibition de la prolifération cellulaire, se traduisant par un arrêt du cycle en phase G1/S dans plusieurs modèles cancéreux, notamment les LAGC ALK+, les NSCLC ALK+, ou encore des lignées de neuroblastomes présentant une mutation activatrice de ALK. L'effet du crizotinib se caractérise également par une inactivation des voies cellulaires en aval de ALK (JAK/STAT3, MAPK), une entrée des cellules en apoptose ainsi qu'une diminution de la croissance tumorale (observée sur des souris immunodéprimées xénotreffées par des tumeurs humaines)^{151,159}.

III.C.3 Utilisations actuelles et futures du crizotinib dans la prise en charge des LAGC ALK+

Le crizotinib bénéficie déjà d'une autorisation de mise sur le marché pour le traitement en seconde intention de NSCLC ALK+, aux Etats-Unis et en France. Plus récemment, en 2015, la Food and Drug Administration (FDA) a étendu aux Etats Unis cette autorisation au traitement de première intention des NSCLC ALK+^{160,161}. Dans les LAGC ALK+, le crizotinib a été utilisé pour la première fois en 2010 chez deux patients en rechute après chimiothérapie et greffe de cellules souches¹⁶², puis chez deux

patients comme traitement de transition entre une chimiothérapie et une greffe cellules souches^{163,164}. Les travaux les plus marquants restent cependant l'étude réalisée par l'équipe du Pr. Carlo-Gambacorti-Passerini sur un total de 11 patients atteints de LAGC ALK+ réfractaires à la chimiothérapie ou ayant rechuté. Dans cette étude, tous les patients ont répondu à la thérapie ciblée (seule ou en combinaison avec des transplantations de cellules souches hématopoïétiques) et sont demeurés en réponse complète pendant plus de 40 mois¹⁶⁵.z

Chez les enfants, le Children's Oncology Group (COG, CA USA) a mis en place un essai clinique (NCT00939770, <https://clinicaltrials.gov>) dont la phase I visait à déterminer la dose maximale de crizotinib tolérée chez les enfants et jeunes adultes. Cette première phase, menée sur 79 patients âgés de 1 à 22 ans, s'est achevée en 2012 et nous a appris que la dose maximale tolérée utilisable était de 280mg/m², à raison de deux administrations par jour. Notons que parmi les 79 patients inclus dans cette étude, 9 avaient déjà préalablement subi une chimiothérapie et que pour 7 de ces derniers, des réponses complètes ont été rapportées. Cette étude se poursuit actuellement en phase II sur 122 patients de la même tranche d'âge.

Le COG a parallèlement lancé, de manière similaire à l'Université de Pékin, un essai clinique (NCT01606878, <https://clinicaltrials.gov>) visant à déterminer l'efficacité de combinaisons thérapeutiques entre le crizotinib et les chimiothérapies, mais comme traitements de seconde intention et chez de jeunes patients (< 21ans), réfractaires ou ayant rechuté suite aux traitements de première ligne ; cet essai est actuellement en phase I. Enfin, un troisième essai comparable a été lancé par le National Cancer Institute (NCT01979536, actuellement en phase II, <https://clinicaltrials.gov>), mais cette fois pour le traitement en première intention chez l'enfant.

Si les résultats de ces différentes études sont très attendus pour clarifier la place que le crizotinib jouera dans la thérapeutique des LAGC ALK+, relevons qu'une observation cruciale a d'ores et déjà été réalisée : celle de la nécessité d'un traitement continu et permanent par le crizotinib. En effet, dans le cas de deux patients âgés de 4 et 26 ans, une rechute brutale a été observée quasi-instantanément après l'arrêt du traitement¹⁶⁶. Cette rechute s'expliquerait par la persistance de cellules tumorales résiduelles jusqu'à 3 ans après le début du traitement et nous amène dès à présent à considérer les limites du crizotinib, et donc la nécessité de développer des stratégies permettant d'optimiser l'efficacité de cette molécule. Ce point est l'un des aspects sur lequel je me suis particulièrement concentré au cours de ma thèse.

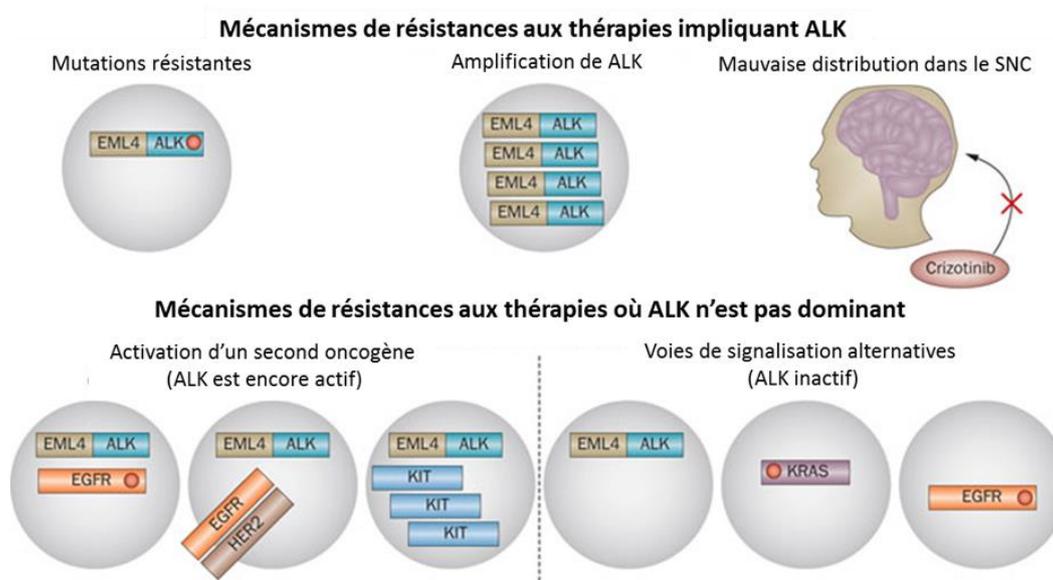


Figure 21. Mécanismes de résistance au crizotinib retrouvés dans les Cancers du Poumon Non à Petites Cellules ALK+ (NSCLC EML4-ALK). Les mécanismes de résistance au Crizotinib peuvent être classés en deux catégories : ceux dans lesquels la signalisation de ALK joue un rôle dominant, et les autres. Les résistances impliquant ALK peuvent survenir à travers des mutations de la kinase qui empêchent l'action du crizotinib, et conservent l'activation constitutive de ALK. On peut également observer une amplification des copies du gène codant pour ALK (copy number gain), qui peut coexister avec l'apparition de mutations résistantes. Enfin, la mauvaise distribution du crizotinib dans le système nerveux central (SNC), permet la croissance des cellules tumorales au niveau du cerveau. Les cellules portant l'oncogène ALK peuvent également activer des oncogènes secondaires, *via* des mutations activatrices (point rouge). Ces mutations peuvent également avoir lieu dans des cellules n'exprimant pas ALK et ainsi permettre la croissance et le développement de nouveaux clones. D'après Doebele et al., 2012¹⁶⁸

Mutations limitants l'effet du crizotinib	
NSCLC (EML4-ALK)	LACG (NPM-ALK)
1151T-Ins	
L1152R	
C1156Y	
I1171S/T/N/H	I1171S/T/N
F1174C/V/L	F1174C/V/I
L1196M	L1196Q
V1180L	
G1202R	
D1203N	
S1206Y	
G1269A	

Tableau 5. Mécanismes de résistance au crizotinib retrouvés dans les Cancers du Poumon Non à Petites Cellules ALK+ (NSCLC EML4-ALK). Les mutations retrouvées dans les deux pathologies apparaissent en rouge. D'après Shaw et al., 2016, Wu et al., 2016, Sullivan et al., 2016, Amin et al., 2015³³¹⁻³³³

III.D MECANISMES DE RESISTANCE AU CRIZOTINIB

Le recul accumulé au cours des dernières années en clinique permet de dresser un constat général, selon lequel le bénéfice clinique apporté par les thérapies ciblées ne s'inscrit malheureusement pas toujours dans la durée. Ce constat alarmant est lié à l'apparition inéluctable de résistances vis-à-vis de ces thérapies. Dans le cas du crizotinib, les premières résistances à cet inhibiteur sont apparues peu après le premier essai clinique de 2006 dans les NSCLC ALK⁺¹⁶⁷⁻¹⁷². Plus récemment, des cas de résistance ont également été rapportés dans les LAGC ALK⁺^{173,174}: ceci laisse donc à penser que plusieurs des mécanismes de résistance au crizotinib décrits dans les NSCLC pourraient se transposer dans les LAGC ALK⁺ (Figure 21).

III.D.1 Mutations du domaine kinase de ALK

L'un des mécanismes les mieux documenté sur l'apparition de résistance aux inhibiteurs de RTK est la survenue de mutations dans le domaine kinase. L'exemple le plus connu est sans conteste celui de la tyrosine kinase oncogénique BCR-ABL, exprimée dans les leucémies myéloïdes chroniques (LAM), dont les mutations au niveau du domaine ABL la rendent insensible à l'imatinib¹⁷⁵. Concernant ALK, ce type de mutation est responsables de près de 30% des résistances au crizotinib dans les NSCLC ALK⁺, qui sont détaillées dans le Tableau 5 (ci-contre)¹⁷⁶.

Dans les LAGC ALK⁺, plusieurs modèles de lignées cellulaires cultivées en présence de concentrations croissantes de crizotinib ont également fini par développer une résistance vis-à-vis de ce dernier¹⁷³ et, comme pour les NSCLC ALK⁺, plusieurs mutations différentes ont été décrites (Tableau 5, ci-contre). Plus récemment, le groupe du Pr. Gambacorti a décrit l'apparition de ce type de mutations chez deux patients (sur les onze ayant participé à l'essai mené par ce groupe, et évoqué plus haut)¹⁶⁵ : ces mutations correspondent à des mutations déjà décrites dans les lignées cellulaires de LAGC NPM-ALK⁺ (Tableau 5).

III.D.2 Amplification génique de ALK

La résistance des cellules cancéreuses aux agents ciblant ALK peut également passer par une amplification du gène codant *ALK*. Ce mécanisme, qui est retrouvé dans près de 18% des cas de NSCLC ALK⁺ résistants, peut être retrouvé dans des cellules présentant également une mutation du domaine tyrosine kinase de ALK^{169,177,178}. Dans les LAGC ALK⁺, le groupe du Pr Gambacorti a montré qu'un mécanisme similaire d'amplification de NPM-ALK pouvait apparaître dans une lignée cellulaire de LAGC ALK⁺ (Karpas-299)¹⁷⁹.

III.D.3 Activation de voies de signalisation compensatrices

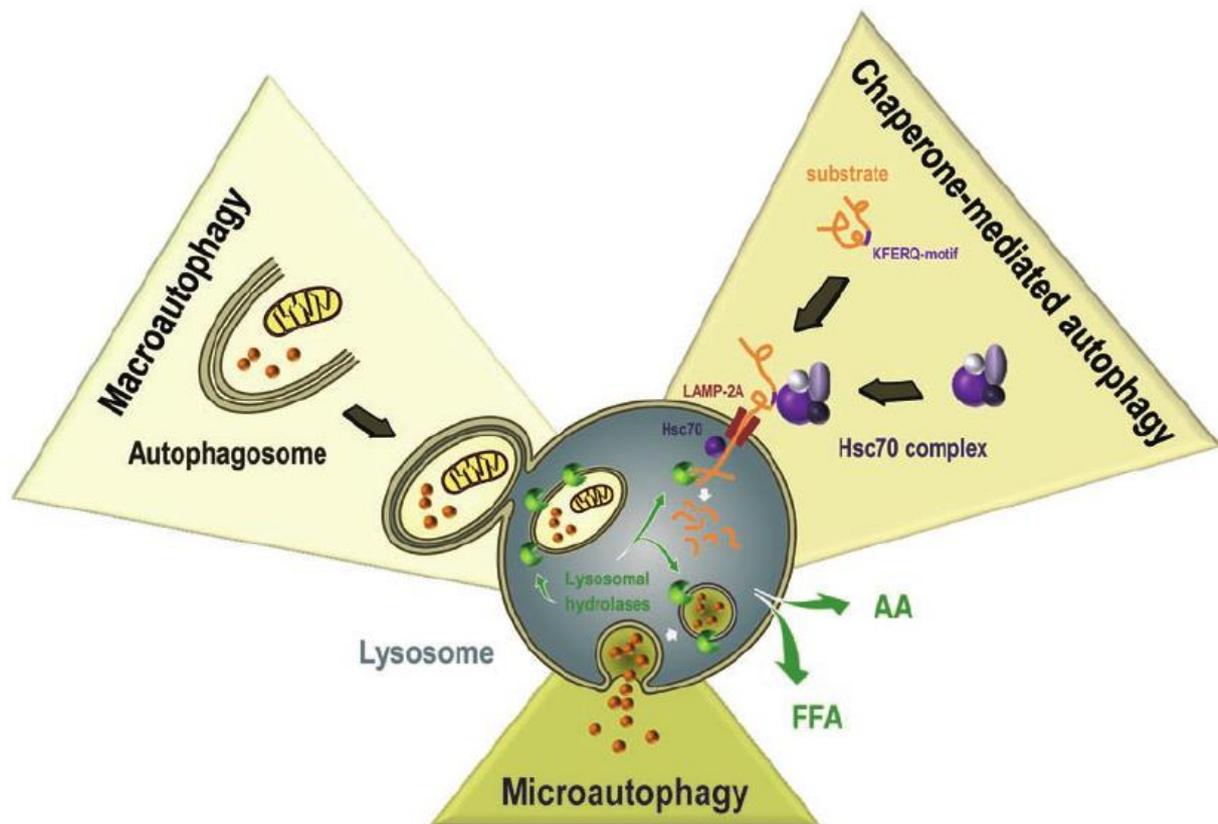


Figure 22. Les différents types d'autophagie. La **macroautophagie** est caractérisée par la prise en charge d'un cargo cytoplasmique *via* des vésicules à double membranes appelées autophagosomes. Ceux-ci pourront fusionner avec le lysosome, ce qui entraîne la dégradation de leur contenu. **L'autophagie médiée par les protéines chaperonnes (CMA)** permet la reconnaissance de protéines spécifiques portant un motif « KFERQ ». Ces protéines sont prises en charge par la protéine chaperonne Hsp70 et adressées au lysosome. Elles sont alors reconnues par la protéine LAMP2A, dépliées, puis transférées à l'intérieur du lysosome, ce qui assure leur dégradation. **La microautophagie** est une invagination de la membrane de lysosome, permettant la séquestration et la dégradation de portions cytoplasmiques. *D'après Wirawan et al., Cell res, 2012*³³⁴

Le troisième grand mécanisme de résistance mis en place par les cellules tumorales consiste en l'activation de voies de signalisation alternatives capables de limiter l'efficacité du crizotinib. Ce type de résistance, qualifié de « résistance adaptative », a été décrit dans 36% des cas de NSCLC ALK+ résistants au crizotinib^{168,177,178}, par une activation d'oncogènes supplémentaires tels que c-KIT, EGFR, KRAS (V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) et IGF1R (insulin-like growth factor 1 receptor).

Dans les LAGC ALK+, ce type de résistance n'a jusque-là pas été rapporté ; mon travail de thèse apporte à ce propos un éclairage nouveau en décrivant l'activation de l'expression de l'oncogène Bcl-2 en réponse à l'inhibition de l'activité tyrosine-kinase de ALK par le crizotinib. Ce résultat clé de mon travail est à l'origine de la soumission d'un article, actuellement en cours de révision, dans le journal « Blood » et fera l'objet d'un développement ultérieur dans la partie « Résultats ».

IV. L'AUTOPHAGIE : UN NOUVEL ENJEU THERAPEUTIQUE POUR LES LAGC ALK+

IV.A GENERALITES SUR L'AUTOPHAGIE

Afin d'assurer l'homéostasie, les cellules doivent maintenir un équilibre entre les voies métaboliques permettant la néosynthèse et la dégradation de macromolécules ou organites cellulaires. Il existe deux principaux mécanismes de dégradation : la dégradation médiée par le protéasome, et celle faisant intervenir les vacuoles lysosomales ou autophagie. Le terme « autophagie », issu du grec *auto* (soi-même) et *phagos* (manger) a été proposé pour la première fois par le professeur Christian de Duve en 1966 pour désigner les mécanismes permettant à la cellule de dégrader son propre contenu cytoplasmique^{180,181}. Il s'agit d'un processus physiologique ubiquitaire, intervenant dans toutes les cellules eucaryotes, et permettant la prise en charge des macromolécules à longue durée de vie voire d'organites cellulaires entiers, contrairement à la voie du protéasome qui prend en charge des complexes plus petits. On sait aujourd'hui que l'autophagie joue un rôle majeur dans divers processus clés tels que le développement, le métabolisme énergétique (notamment en cas de carence nutritive), la réponse immunitaire, l'élimination de pathogènes, la différenciation cellulaire, la réparation et la survie cellulaire¹⁸²⁻¹⁸⁴. De fait, l'autophagie est également impliquée dans de nombreuses pathologies comme les maladies neurodégénératives, infectieuses, cardiaques, métaboliques, pulmonaires, le vieillissement, mais aussi les cancers^{185,186}. On distingue à ce jour trois grands types d'autophagie : la micro-autophagie et l'autophagie médiée par des protéines chaperonnes (Chaperone Mediated Autophagy ou CMA), qui ne seront évoquées que brièvement, et la macro-autophagie à laquelle je me suis particulièrement intéressé au cours de ma thèse, et qui fera l'objet de la majeure partie de ce chapitre introductif (Figure 22).

La micro-autophagie est un processus caractérisé par une invagination de la membrane lysosomale (« tube autophagique ») pour former une vésicule incluant des portions de cytoplasme qui seront dégradées par des hydrolases lysosomales¹⁸⁷. Ce type d'autophagie n'a été décrit à l'heure actuelle que chez la levure. Elle diffère en cela de la CMA qui, à l'inverse, semble restreinte aux mammifères^{188,189}. Cette dernière a pour principale caractéristique de ne pas dépendre du trafic vésiculaire et permet une dégradation sélective de protéines portant un motif pentapeptidique Lysine-Phénylalanine-Acide glutamique-Arginine-Glutamine (KFERQ) ou « KFERQ like »¹⁹⁰, reconnu par la protéine Heat Shock Cognate protein 70 (HSC70), une chaperonne exprimée par les cellules de mammifères. Ce complexe protéique interagit ensuite avec la protéine Lysosome-Associated Membrane Protein type 2A (LAMP-2A) localisée au niveau de la membrane lysosomale, suite à quoi la protéine est transloquée dans la lumière du lysosome pour y être dégradée¹⁹¹.

IV.A.1 La macro-autophagie

La macro-autophagie, plus communément appelée « autophagie », permet la dégradation de constituants cytoplasmiques en surplus, non-fonctionnels ou toxiques, par le lysosome. Ce processus est caractérisé par la formation d'une vésicule à double membrane, l'autophagosome, à l'intérieur de laquelle sont dégradés des éléments cellulaires tels que les protéines à longue durée de vie, les agrégats protéiques, les organites cellulaires endommagés voire certains micro-organismes intracellulaires^{183,192}.

L'autophagie est un processus rapide et dynamique qui ne nécessite que quelques heures pour sa mise en place suite à un stimulus¹⁹³, et consiste en une cinétique particulière d'évènements à l'origine de la notion de « flux autophagique ». Le processus débute ainsi par la formation d'une double membrane, appelée phagophore ou membrane d'isolation, qui s'allonge afin d'englober des portions de cytoplasme (appelées « cargo »), et se referme en formant ainsi l'autophagosome. Ce dernier peut ensuite fusionner avec le lysosome pour former un autophagolysosome ou autolysosome. C'est dans cet autolysosome que survient l'hydrolyse du contenu cytoplasmique préalablement « emprisonné », par l'intermédiaire des enzymes lysosomales. Suite à cette dégradation, le contenu de l'autolysosome est ensuite relargué dans le cytoplasme grâce aux perméases lysosomales. Afin d'être en mesure d'assurer le maintien de l'homéostasie cellulaire, notons qu'il existe un mécanisme appelé « Autophagic lysosomal reformation », permettant la formation de nouveaux lysosomes à partir d'autolysosomes pré-existants de manière à ne jamais être à cours d'autolysosomes « libres »^{194,195}.

L'autophagie a longtemps été considérée comme un processus de dégradation non sélectif car, lors de sa formation, l'autophagosome englobe aléatoirement une portion du cytoplasme de la cellule. Aujourd'hui, il apparaît clairement que ce mécanisme participe lui aussi au « contrôle qualité » du

cytoplasme, ce qui requiert une capacité à cibler certains types de substrats de manière relativement sélective. Cette autophagie sélective, capable de dégrader spécifiquement certains cargos, fait intervenir des protéines adaptatrices permettant l'interaction entre cargo et l'autophagosome.

L'exemple le plus connu est celui de la protéine Sequestosome 1 (p62 / SQSTM1), première protéine adaptatrice humaine identifiée comme étant impliquée dans la dégradation d'agrégats protéiques par autophagie (aggréphagie). P62 peut d'une part se fixer aux protéines poly-ubiquitinylées *via* sa partie C-terminale contenant un domaine UBA (ubiquitin associated domain) et, d'autre part, lier la protéine LC3 ou MAP1LC3 (Microtubule associated protein 1 light chain 3) présente à la surface des autophagosomes *via* son domaine LIR (LC3 interacting region), ce qui permet *in fine* l'adressage du cargo à l'autophagosome, pour dégradation^{196,197}. D'autres protéines adaptatrices portant un domaine LIR comme NBR1, NDP52, et OPTN ont depuis été mises en évidence, et agissent selon un mode d'action relativement similaire.

L'implication de l'autophagie sélective a été décrite dans la dégradation de nombreux types de cargos, allant des protéines poly-ubiquitinylées (telles que l'oncogène BCR-ABL)¹⁹⁸ aux mitochondries (mitophagie), en passant par des portions du noyau (nucléophagie), les peroxisomes (pexophagie), les ribosomes (ribophagie), des portions de réticulum endoplasmique (réticulophagie), les lipides (lipophagie), voire même certains pathogènes (xénophagie), cette liste n'étant pas exhaustive.

IV.A.2 Les principales étapes de l'autophagie et leur régulation

La formation de l'autophagosome est orchestrée par un ensemble de protéines nommées ATG pour « AuTophagy related » proteins. Une trentaine de gènes codant pour les protéines ATG ont été identifiés grâce à des criblages génétiques chez la levure. Cette découverte a très récemment valu le prix Nobel au Professeur Ohsumi¹⁹⁹. Dix-huit de ces ATG sont connues pour être recrutées lors de l'isolation de la membrane de l'autophagosome. La formation de l'autophagosome peut être très simplement divisée en trois étapes : l'initiation, la nucléation et l'élongation/maturation. L'initiation correspond à la transmission du signal à la membrane source nécessaire à la genèse du phagophore, la nucléation mène à l'isolation de cette membrane et enfin l'élongation se déroule jusqu'à ce que l'autophagosome soit totalement formé. Les protéines Atg sont recrutées au niveau du site de formation de l'autophagosome pour former des complexes qui participent ensuite à toutes les étapes du processus autophagique.

IV.A.2.a L'initiation

Le site de formation de l'autophagosome, qui sert à la fois de source membranaire et de plateforme d'assemblage du phagophore lors de l'initiation, est nommé « l'omégasome »²⁰⁰. L'omégasome a

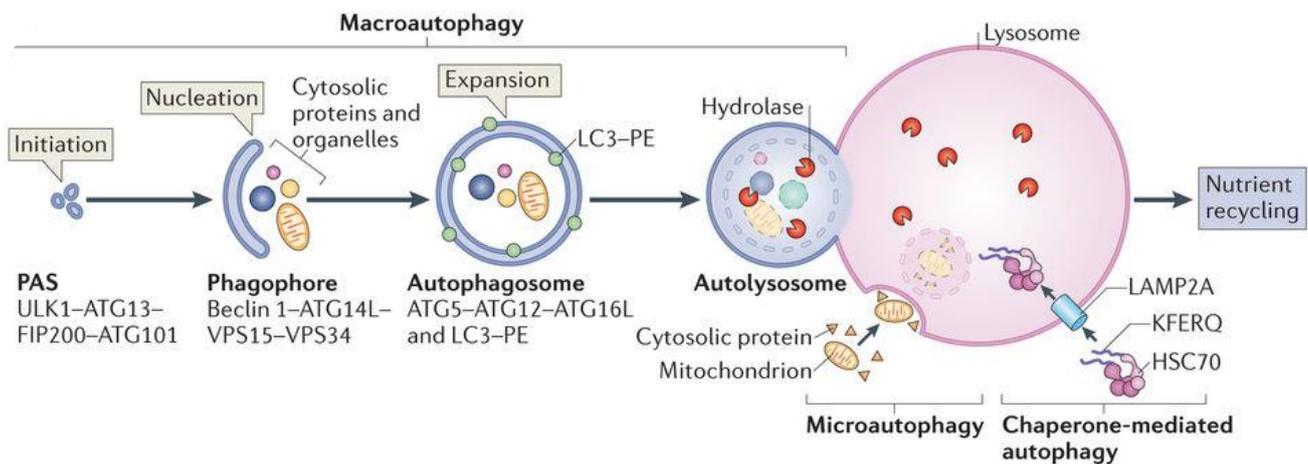


Figure 23. Principales étapes du processus autophagique. L'initiation après un stress métabolique ou thérapeutique est médiée par le complexe comprenant la protéine ULK1 (Unc51 like kinase 1). L'étape de **nucléation**, durant laquelle la formation du phagophore (ou membrane d'isolation) est initiée, est principalement permise par le complexe comprenant la PI3Kinase de classe III, VPS34 (vacuolar protein sorting 34). L'**élongation** du phagophore fait intervenir deux systèmes de conjugaison « ubiquitin like », ayant pour but la conversion de la protéine LC3-I en LC3-II (PE), protéine nécessaire à la formation de l'autophagosome. Une fois formé, l'autophagosome contenant un cargo cytosolique à dégrader va **fuser avec le lysosome**, ce qui entraîne la **dégradation** de son contenu et le relargage des constituants primaires dans le cytoplasme pour recyclage. D'après Kaur et al., *Nature Revs Mol Cell Biol*, 2013³³⁵

initialement été identifié comme étant une zone particulièrement riche en phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) au niveau du réticulum endoplasmique (RE), ce qui permettrait le recrutement de nombreuses protéines effectrices telles que DFCP1 (double FYVE domain-containing protein 1) ou les protéines de la famille WIPI (WD-repeat protein interacting with phosphoinositides) impliquées dans la formation du phagophore²⁰¹⁻²⁰³. On sait aujourd'hui que d'autres sources de membrane peuvent également alimenter la formation du phagophore, comme les « ER-exit sites », le ER-golgi intermediate compartment (ERGIC), l'appareil de Golgi lui-même, la membrane plasmique voire des endosomes en cours de recyclage²⁰⁴⁻²⁰⁸.

L'étape critique de l'initiation est l'activation du complexe ULK1 (Unc-51-like autophagy activating kinase 1). Ce complexe est composé de ULK1 (dans certains cas ULK2), une serine/théronine kinase orthologue d'Atg1 chez la levure, ainsi que des protéines Atg13, Atg101 et FIP200 (FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa) (Figure 23). Chez les mammifères, le complexe ULK1 est placé sous le contrôle de la voie mTOR (mammalian target of rapamycin) qui maintient le complexe ULK1 sous forme phosphorylée et inactive en conditions nutritionnelles normales. En cas de carence, cette phosphorylation répressive de ULK1 est perdue, ce qui induit l'autophagie. En outre, ULK1 peut également être directement activée par l'AMPK (Adenosine Monophosphate activated Protein Kinase), ce qui entraîne sa relocalisation du complexe ULK1 au niveau de l'omégasome et permet l'initiation²⁰⁹. Le complexe ULK1 actif permet d'y recruter les protéines nécessaires à la formation de l'autophagosome telles que AMBRA1 (activating molecule in Beclin 1-regulated autophagy), le complexe Atg12-Atg5-Atg16L, et la protéine Beclin-1 permettant d'activer le complexe Phosphatidylinositol 3 kinase de classe III qui est nécessaire à l'étape suivante : l'étape de nucléation^{210,211}.

IV.A.2.b La nucléation

L'étape de nucléation du phagophore nécessite plusieurs complexes protéiques qui semblent requérir 3 protéines en particulier : la Phosphatidylinositol 3 kinase de classe III (Vps34 (évoquée plus haut), Beclin 1 et la phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 4 (PIK3R4 ou Vps15). L'activité kinase de Vps34 permet de produire le PI3P requis pour la formation de l'autophagosome ; tandis que Beclin 1 et Vps15 régulent l'activité de Vps34 (Figure 23)²¹².

Il est utile de mettre ici en avant le rôle central de la protéine Beclin 1 (autour duquel se base une partie du travail présenté dans ce manuscrit). Cette protéine peut en effet interagir avec la protéine Atg14L (Atg14 like, aussi appelée BARKOR pour Beclin 1 associated autophagy related key regulator) afin de permettre l'activation de Vps34^{213,214}. Beclin 1 peut aussi interagir avec la protéine UVRAG (UV radiation resistance associated gene protein) qui rentre en compétition avec Atg14L²¹⁵, et peut

permettre la formation de deux sous-complexes distincts : 1) un complexe activateur de l'autophagie lorsque UVRAG est associé à la protéine Bif-1 (Bax-interacting factor 1) ou 2) un complexe inhibant la maturation de l'autophagosome quand UVRAG s'associe à la protéine Rubicon (RUN domain and cystein-rich domain containing Beclin 1-interacting protein)^{214,216}.

Notons à ce propos que, de manière générale, Beclin 1 peut interagir avec un grand nombre de partenaires, ce qui résulte en des effets différents -voire opposés- sur la régulation de l'autophagie. Beclin 1 peut par exemple interagir avec la protéine AMBRA1 (activating molecule in Beclin 1-regulated autophagy) et induire sa relocalisation vers l'omégasome, ce qui active le processus autophagique²¹⁷. A l'inverse, Beclin 1 peut, par l'intermédiaire de son domaine BH3, s'associer et être séquestrée par la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (lorsque celle-ci est localisée au niveau du RE), bloquant alors le processus autophagique. Le rôle du couple Bcl-2/Beclin est précisément l'un des éléments centraux de mon travail de thèse.

IV.A.2.c L'élongation

Le phagophore nécessite ensuite, pour son élongation, deux systèmes de conjugaison de type « ubiquitin like ».

Le système de conjugaison Atg12/Atg5/Atg16L fait intervenir la fixation covalente de la protéine Atg12 à la protéine Atg5 par le biais de deux enzymes : Atg7, une enzyme de type E1 (enzyme activatrice de l'ubiquitine) et Atg10, une enzyme de type E2 (enzyme de conjugaison de l'ubiquitine), nommées ainsi par analogie avec les facteurs impliqués dans la dégradation ubiquitine-dépendante des protéines. Une fois formé, le complexe Atg12/Atg5 s'associe à la protéine Atg16L (Atg16 like), puis le complexe Atg12-Atg5-Atg16L est adressé à la membrane de l'autophagosome où il permet de recrutement de la protéine LC3 (Figure 23)^{218,219}.

La lipidation de la protéine LC3 est une étape nécessaire à la formation de l'autophagosome : c'est là qu'intervient le système de conjugaison LC3-Phosphatidyléthanolamine. Cette conjugaison consiste, comme son nom l'indique, en l'adjonction d'un phospholipide, la phosphatidyléthanolamine (PE,) à la protéine LC3. Celle-ci est concrètement réalisée comme suit : après synthèse du précurseur « pro-LC3 » de LC3, LC3 est clivée par Atg4B afin de générer la forme cytosolique « LC3-I » de la protéine. Ceci permet à Atg7 (enzyme de type E1) et Atg3 (enzyme de type E2) de catalyser l'association de la PE à LC3-I, ce qui donne la forme LC3-II qui restera associée à la membrane de l'autophagosome^{220,221}. LC3-II représente pour cela l'un des seuls marqueurs réellement caractéristiques des autophagosomes²²².

IV.A.2.d Maturation et étape de fusion/dégradation

Une fois formés, les autophagosomes sont acheminés vers les lysosomes avec lesquels ils devront fusionner. Pour cela, ils empruntent le réseau de microtubules qu'ils remontent, par l'intermédiaire d'une protéine leur servant de moteur moléculaire, la dynéine, jusqu'au centre organisateur des microtubules (MTOC, MicroTubule Organization Center) qui est justement une zone riche en lysosomes²²³. Les autophagosomes peuvent alors soit fusionner avec des endosomes pour former des amphisomes, soit fusionner directement avec des lysosomes pour former les autolysosomes. La fusion en elle-même fait intervenir de nombreux facteurs dont les protéines de la famille SNARE (Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachment protein REceptor), la protéine Rab, ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required forTransport), et LAMP (Lysosome-associated membrane protein)²²⁴⁻²²⁷. Suite à la fusion, les hydrolases lysosomales dégradent le matériel séquestré dans l'autolysosome ainsi que la membrane interne de ce dernier, ce qui permet ultérieurement le relargage d'acides aminés ainsi « recyclés » dans le cytoplasme (Figure 23). La protéine LC3-II située sur la membrane interne de l'autophagosome est elle aussi dégradée à ce moment-là, tandis que la fraction de LC3-II localisée au niveau de la membrane externe sera recyclée en LC3-I cytosolique après clivage de la PE par Atg4^{222,228}.

IV.B Régulation de l'autophagie

En raison de son importance dans le maintien de l'homéostasie intracellulaire, l'autophagie est présente à un niveau basal au sein de tous les types cellulaires. Néanmoins, le flux autophagique peut être plus fortement induit, par exemple lors de la déprivation en nutriments : c'est donc un processus majeur de la réponse adaptative aux conditions de stress²²⁹⁻²³¹. Comme la plupart des systèmes de réponse aux stress, un excès comme un défaut d'autophagie peuvent tous deux s'avérer létaux. En raison de l'impact majeur de ce processus sur le destin cellulaire, chacune de ses étapes est très finement régulée :

- au niveau transcriptionnel, par différents facteurs de transcription tels que NFκB, FOXO3, STAT3 ou TFEB²³²
- au niveau post-transcriptionnel, par de nombreux miARN qui contrôlent à la fois la stabilité et le niveau de traduction de plusieurs cibles identifiées tout au long du processus autophagique (Figure 25). L'implication des protéines de liaison aux ARN, et notamment des ARE-BP, autres acteurs clés du contrôle de l'expression génique au niveau post-transcriptionnel, reste encore aujourd'hui mal connue : cette question a fait l'objet d'une partie de mon travail de thèse.
- au niveau post-traductionnel, par phosphorylation ou ubiquitinylation de différents acteurs clés du processus autophagique.

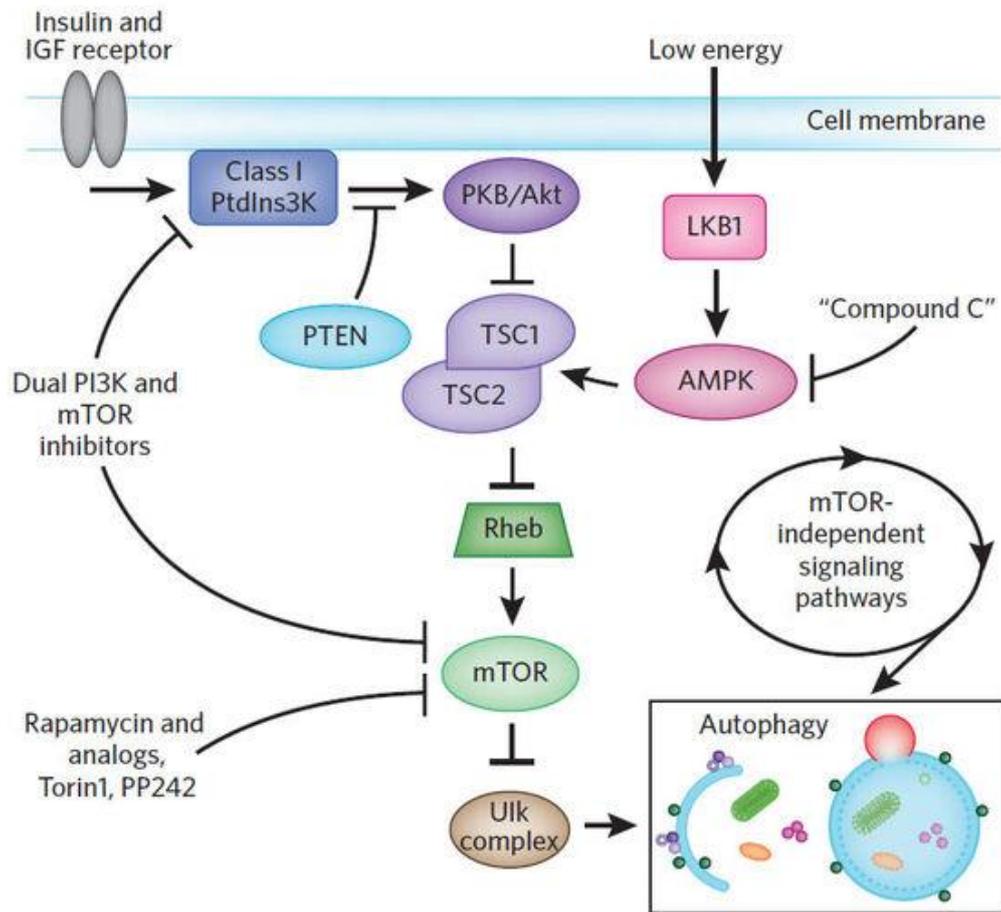


Figure 24. Régulation de l'activité du complexe mTORC1. L'autophagie est négativement régulée par mTOR, une sérine/thréonine kinase, par l'intermédiaire du complexe mTORC1. L'insulin Growth Factor 1 (IGF1), ou le niveau d'énergie (ATP) maintiennent le complexe TSC1/2 inactif, par une activation des voies PI3K/Akt et MAPK (IGF1) ou l'inhibition de l'AMPK (ATP). En l'absence de ces signaux, TSC1/2 est déréprimé et favorise la conversion de GTP-Rheb en GDP-Rheb, qui perd alors la capacité d'interagir avec mTORC1: cette perte d'interaction inhibe l'activité kinase de mTORC1 ce qui active le flux autophagique. D'après Fleming et al., 2011³³⁹

Quel que soit le niveau de régulation considéré, il est capital de préciser que ces mécanismes de contrôles ne sont effectifs que suite à l'intégration de différents signaux, qui dans le cas de l'autophagie, convergent principalement (mais pas exclusivement) vers la voie mTOR et plus précisément le complexe mTORC1.

IV.B.1 Régulation de l'activité du complexe mTORC1

mTOR est une sérine thréonine kinase appartenant à la famille des PI3K (Phosphoinositide 3 Kinase). Elle peut être incluse dans deux types de complexes : mTORC1 et mTORC2, qui diffèrent de par leur sensibilité à la rapamycine, leurs activateurs et leurs cibles. Outre la kinase mTOR, les deux complexes partagent d'autres protéines comme mLST8 (mammalian lethal with sec-13 protein 8) dont la fonction est encore inconnue, mais aussi Deptor (DEP domain containing mTOR interacting protein) un régulateur négatif de mTOR, et enfin le complexe Tti1/Tel2 servant de support et de stabilisateur à la formation des deux complexes. Les protéines Raptor (regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin), et pRAS40 (proline-rich Akt substrate 40kDa) sont propres au complexe mTORC1, tandis que rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR), mSin1 (mammalian stress-activated map-kinase interacting protein 1), et protor1/2 (protein observed with rictor 1 and 2) sont quant à elles exclusives à mTORC2²³³.

Dans la suite de ce manuscrit, je me focaliserai uniquement sur le complexe mTORC1 qui semble être le seul impliqué dans le contrôle de l'autophagie.

Comme énoncé précédemment, le complexe mTORC1 permet d'intégrer les signaux cellulaires provenant de voies différentes : les voies énergétiques, la teneur en facteurs de croissance, en acides aminés, et en oxygène²³⁴⁻²³⁷. En fonction des besoins cellulaires, mTORC1 permet de réguler la balance entre les processus cellulaires anaboliques (synthèse protéique, lipidique) et les processus cataboliques, en particulier l'autophagie.

L'intégration de la plupart de ces signaux fait intervenir le complexe TSC1/2 (tuberous sclerosis complex 1/2). Par exemple, la présence de facteurs de croissance dans le milieu, tels que l'Insulin Growth Factor 1 (IGF1), ou encore la teneur en ATP et en oxygène, maintiennent le complexe TSC1/2 inactif, respectivement par une activation des voies PI3K/Akt et MAPK (IGF1) ou l'inhibition de l'AMPK (ATP, oxygène). En conditions de stress, lorsque ces facteurs viennent à manquer, la répression sur le complexe TSC1/2 est levée. Ce complexe fonctionne alors comme une protéine activatrice de GTPase (GTPase-activating-protein, GAP) vis-à-vis de la protéine Rheb (Ras homolog enriched in brain) et stimule la conversion de GTP-Rheb en GDP-Rheb qui perd alors la capacité de se lier à mTORC1. Cette perte d'interaction avec Rheb inhibe alors l'activité kinase de mTORC1 ce qui active le flux autophagique²³⁸⁻²⁴¹ (Figure 24).

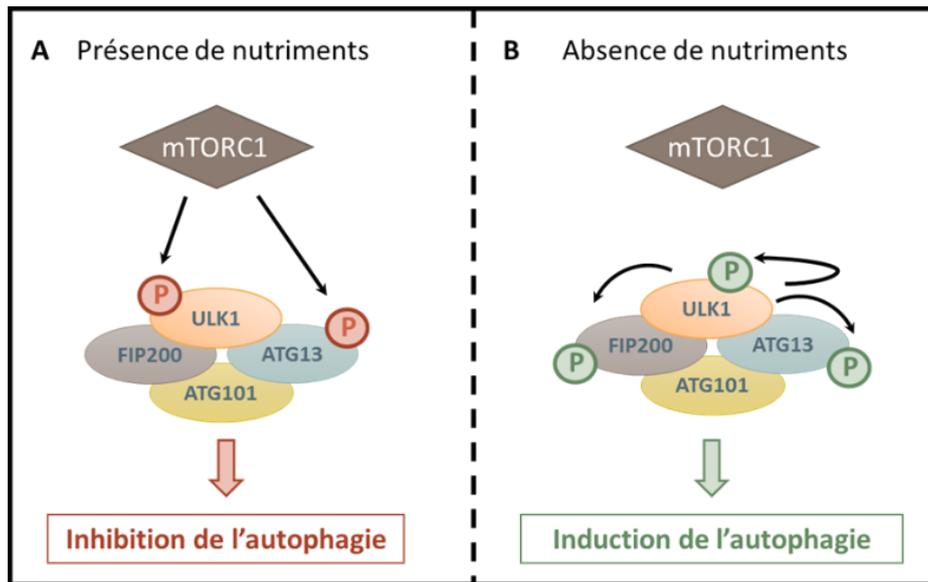


Figure 25. Contrôle par mTOR de l'activation du complexe d'initiation ULK1. A. En présence de nutriments, mTORC1, en phosphorylant ULK1 et Atg13, maintient le complexe d'initiation sous forme inactive. L'autophagie est donc inhibée. B. En cas de carence nutritionnelle, mTORC1 se dissocie de ULK1, entraînant la déphosphorylation de ULK1 et de Atg13. ULK1 est alors activé, peut s'autophosphoryler, et phosphoryler Atg13 et FIP200 entraînant l'activation du complexe de nucléation et ainsi l'induction de l'autophagie.

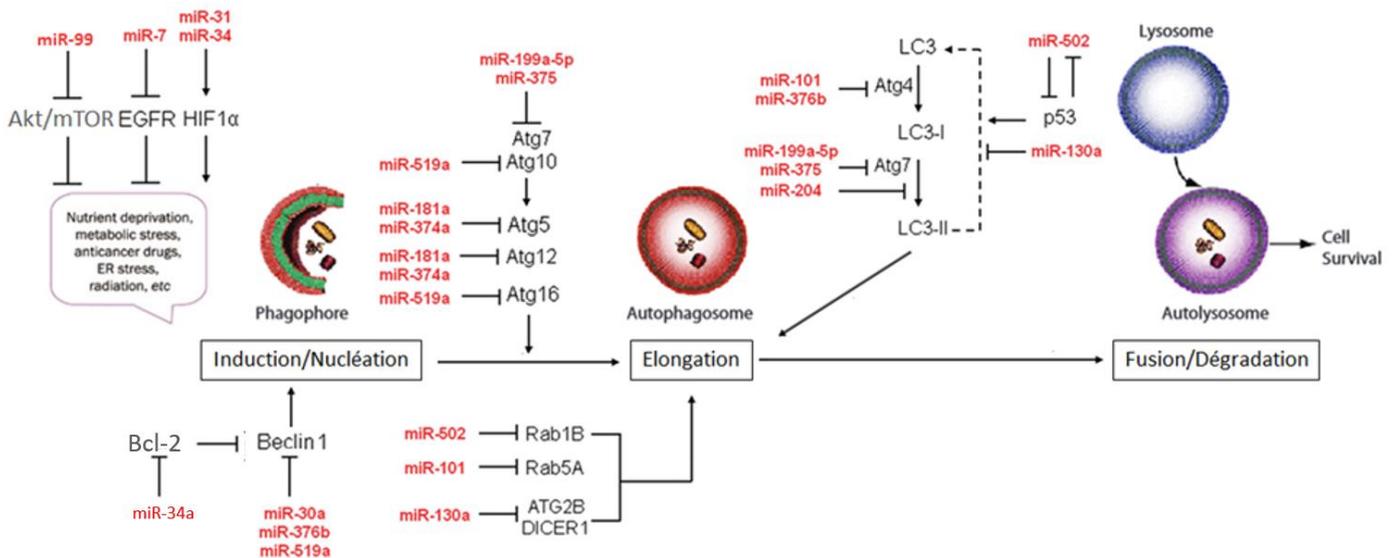


Figure 26. Principaux miARN impliqués dans la régulation de l'expression d'acteurs clés du processus autophagique. Adapté de Liang et al., 2014³³⁶

Dans le cas d'une déprivation en acides aminés, l'activation du complexe TSC1/2 n'est pas requise pour inhiber mTOR: le complexe mTOR est dans ce cas de figure directement inactivé par une perte de l'interaction au niveau du lysosome avec le complexe régulateur (dépendant des GTPases RAG), requis pour l'activation de mTOR²⁴²⁻²⁴⁴.

En conclusion, l'aspect capital à retenir est que l'induction du flux autophagique résulte le plus souvent d'une levée de répression exercée par mTOR sur le processus autophagique ; c'est du moins ce que semble indiquer des données non publiées de notre équipe, dans le cas de LAGC ALK+.

IV.B.2 Régulation du processus autophagique par mTORC1

En conditions nutritionnelles normales (en absence de carence), mTORC1 est actif et se lie à ULK1 *via* la protéine Raptor²⁴⁵. Cette liaison entraîne la phosphorylation d'Atg13, ainsi que de ULK1 au niveau du résidu sérine 757 (Ser757), ce qui maintient le complexe ULK1 sous forme inactive et inhibe l'initiation de l'autophagie (Figure 24-A)²⁴⁶. mTORC1 peut également inhiber le processus autophagique en intervenant directement lors de l'étape de nucléation, par phosphorylation d'Atg14L (et inhibition subséquente de la kinase Vps34). Lors d'une carence nutritionnelle, l'inactivation de mTORC1 permet la libération du complexe ULK1, ce qui provoque la perte des phosphorylations de Atg13 et de ULK1 (Ser757) mentionnées plus haut, et donc l'activation du complexe ULK1 (Figure 25-B). Ce dernier peut alors s'autophosphoryler au niveau de sa sérine 467 mais aussi phosphoryler Atg13 et FIP200 : le complexe ULK1 est ainsi relocalisé au niveau de l'omégasome et permet l'initiation de l'autophagie.

IV.B.3 Régulation post-transcriptionnelle du processus autophagique par les ARE-BP et les miARN

Au cours de ces dernières années, de nombreuses études se sont intéressées à la régulation de l'autophagie au niveau post-transcriptionnel. Ces études ont notamment permis de mettre en évidence des liens étroits entre les miARN et certains acteurs clés de la machinerie autophagique (Figure 26).

De façon intrigante, comme relevé par le Dr Lisa Frankel²⁴⁶, de nombreux miARNs capables d'inhiber le processus autophagique, tels que miR-34a, miR-30a et miR-101, sont considérés comme suppresseurs de tumeur, ce qui suggère une dépendance de certaines tumeurs vis-à-vis du processus autophagique. De manière générale, il semble même que le réseau des miARN joue, dans sa globalité, un rôle important dans l'autophagie, comme démontré dans un modèle de leucémie lymphocytaire chronique (LLC) où l'inactivation de DICER (un facteur nécessaire à la biogenèse des miARN) inhibe l'autophagie et conduit les cellules à la mort²⁴⁷.

mirR-34a, miARN auquel je me suis particulièrement intéressé dans le cadre de mon travail de thèse, est connu pour cibler les transcrits ATG9A et ATG4B, et ainsi inhiber l'autophagie (257). Pourtant, selon les contextes cellulaires, ce miARN semble jouer un rôle ambivalent vis-à-vis de l'autophagie : en effet, une autre cible de ce miARN est l'ARNm Bcl-2 qui est lui-même un régulateur négatif de l'autophagie^{248,249}. Ainsi, comme cela a été rapporté dans d'autres modèles cellulaires, miR-34a peut également, en ciblant Bcl-2, lever la répression exercée par cette protéine sur l'autophagie et favoriser ce processus cellulaire.

Le rôle des protéines de liaison à l'ARN dans la régulation du processus autophagique demeure à ce jour plus mystérieux. Parmi les quelques exemples documentés, on peut notamment citer le rôle joué par les protéines de la famille ELAV/Hu (présentées en partie II), qui apparaissent comme des régulateurs positifs de la stabilité et de la traduction d'ARNm impliqués dans l'autophagie. L'ARE-BP HuR a par exemple été décrite comme pouvant stabiliser le transcrit P62 dans la lignée cellulaire ARPE-19. Une autre protéine de la même famille, Human antigen D (HuD), est capable d'interagir avec l'ARNm ATG5 dans les cellules pancréatiques β , et de favoriser ainsi sa traduction et le processus autophagique en général²⁵⁰. L'implication des protéines de liaisons aux ARN pourrait également constituer un aspect majeur de la « RNAutophagy », un processus récemment dévoilé de dégradation sélective de certains ARN par autophagie²⁵¹. Le nouveau champ d'investigation ouvert par le rôle des ARE-BP dans la régulation de l'autophagie reste cependant largement inexploré, et des études ultérieures seront nécessaires afin d'appréhender pleinement cet aspect.

IV.C ROLE DE L'AUTOPHAGIE DANS LES CANCERS

Généraliser le rôle de l'autophagie dans les cancers est très compliqué, puisque ce rôle diffère selon les contextes : ce processus cellulaire peut en effet aussi bien avoir un rôle pro-tumoral que suppresseur de tumeur. L'autophagie peut ainsi être mise en place par les cellules tumorales pour disposer d'une autre source d'énergie ce qui favorise leur survie et leur prolifération. A contrario, elle peut également être un mécanisme de suppression tumorale, par exemple en favorisant la mort cellulaire (Figure 27).

IV.C.1 L'autophagie dans les cancers : une arme à double tranchant

IV.C.1.a Fonction suppresseur de tumeur

Le premier lien spécifique entre l'autophagie et cancer a été établi en 1999 : l'autophagie était alors présentée comme un mécanisme suppresseur de tumeur, et l'absence de la protéine Beclin 1 fut pour la première fois incriminée dans le cancer du sein. Par la suite, des délétions monoalléliques telles qu'UVRAG, Bif-1 ou AMBRA (protéines partenaires au sein du complexe PI3K de classe III) furent également observées dans plusieurs cancers tels que celui du sein,

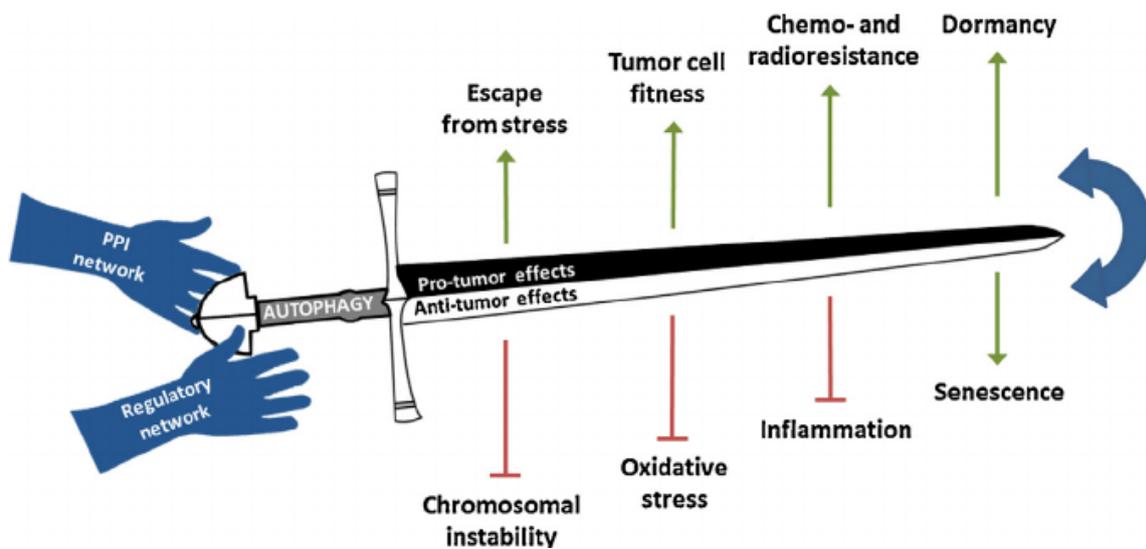


Figure 27. L'autophagie, une arme à double tranchant dans les cancers. L'autophagie peut promouvoir la tumorigenèse par plusieurs mécanismes incluant : la résistance aux stress, notamment la carence en nutriments, la résistance aux thérapies anti-cancéreuses et promouvoir l'entrée en dormance de cellules malignes. L'autophagie peut aussi exercer des fonctions anti-tumorales par plusieurs mécanismes : la préservation de la stabilité génomique, diminuer le stress oxydatif, inhiber les processus inflammatoires et induire la mort cellulaire ou la sénescence. D'après Kubisch et al, *Semin. Cancer Biol.*, 2013³³⁷

de l'ovaire ou encore de la prostate, favorisant l'incidence de l'apparition de tumeurs spontanées^{216,252,253}. Des études complémentaires dans des modèles murins ont permis d'assigner des fonctions suppresseur de tumeurs à diverses protéines de l'autophagie, comme Atg5 et Atg7, dont la délétion entraîne la formation de carcinomes hépatiques²⁵³, ou encore Atg4c dont la délétion augmente la susceptibilité de développer des fibrosarcomes chimio-induits dans les souris²⁵⁴. Il est également intéressant de mentionner que la majorité des voies de signalisation impliquées dans l'inhibition de l'autophagie sont souvent également impliquées dans la tumorigénèse : l'exemple le plus frappant reste la voie mTOR dont l'activation en aval de nombreux oncogènes (comme par exemple ALK dans les LAGC) restreint le processus autophagique.

Plusieurs mécanismes sont proposés pour expliquer cet effet onco-suppresseur de l'autophagie. On peut mentionner le fait que l'autophagie contribue à limiter l'instabilité chromosomique²⁵⁵ en permettant le « recyclage » des mitochondries endommagées (mitophagie), diminuant ainsi le stress oxydatif généré par l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) génotoxiques²⁵⁶. Ce recyclage des mitochondries usées par l'autophagie permet également de diminuer l'émission par ces dernières de signaux inflammatoires pouvant participer à la tumorigénèse. De même, l'autophagie limite l'inflammation en permettant la dégradation de l'inflamasome, une plateforme supramoléculaire responsable de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires²⁵⁷.

De plus, bien que cet aspect soit controversé, l'activation de l'autophagie pourrait aussi induire un arrêt permanent du cycle cellulaire, c'est-à-dire l'entrée en sénescence, par dégradation autophagique de protéines impliquées dans la prolifération comme Ras homolog family member A (RhoA) ou la lamine B1²⁵⁸⁻²⁶¹. Enfin, l'activation de l'autophagie peut également permettre la dégradation de certaines protéines pro-oncogéniques, comme démontré pour la tyrosine-kinase oncogénique BCR-ABL, ce qui entraîne indirectement la mort des cellules cancéreuses soumises au phénomène d'addiction oncogénique¹⁹⁸.

IV.C.1.b Fonction pro-tumorale

A l'inverse, de nombreuses études montrent que l'autophagie peut aussi revêtir un caractère pro-tumoral. Pour faire écho aux exemples mentionnés plus haut, des expériences réalisées *in vivo* montrent que les délétions d'Atg5 et d'Atg7 préviennent la croissance tumorale induite par l'oncogène RAS²⁶². De même, la délétion monoallélique de Beclin 1 inhibe totalement la formation de tumeurs dans des souris TSC^{+/-}²⁶³.

Cette fonction pro-tumorale de l'autophagie peut être médiée par différents mécanismes. L'autophagie permet par exemple de fournir une quantité accrue d'énergie aux cellules tumorales, qui sont généralement localisées dans un environnement hypoxique et carencé en nutriments. Une étude

a ainsi montré que l'autophagie était fortement activée au niveau du centre hypoxique des tumeurs, pour permettre aux cellules de « résister » avant que la néo-angiogenèse tumorale ne prenne le relai de l'approvisionnement^{264,265}. Au niveau métabolique, l'autophagie peut contribuer à soutenir la demande énergétique accrue générée par l'effet Warburg en libérant des acides aminés, certaines tumeurs présentant même ce que l'on qualifie « d'addiction à l'autophagie » tant elles dépendent de l'autophagie pour leur besoin en énergie²⁶⁶.

Toujours en écho aux exemples précédents, si l'autophagie peut contribuer à l'entrée en sénescence (arrêt définitif du cycle cellulaire), elle peut également n'induire qu'un arrêt transitoire de la prolifération. On parle alors d'entrée en « dormance » des cellules tumorales, et les cellules dormantes, susceptibles de proliférer à nouveau, sont qualifiées de « réservoirs de la pathologie ». L'implication de l'autophagie a par exemple été mise en évidence dans la persistance, par entrée en dormance de cellules souches cancéreuses (CSCs, Cancer Stem Cells), dont on avait préalablement établi la responsabilité dans la résurgence de la maladie²⁶⁷. De plus, ce phénomène d'entrée en dormance des cellules cancéreuses peut également être induit lors de stress thérapeutiques, permettant une reprise ultérieure de la prolifération suite à l'arrêt des traitements^{268,269}. Enfin, ce rôle facilitateur de l'autophagie dans l'entrée en dormance pourrait favoriser la survie de cellules lors de la dissémination métastatique lors de la colonisation de sites secondaires²⁷⁰.

Enfin, l'autophagie semble favoriser le processus de transition mésenchymato-épithéliale, un élément clés du développement des métastases²⁷¹, en permettant par exemple aux cellules tumorales de résister à l'anoïkis (mort cellulaire déclenchée par la perte de l'ancrage à la matrice extracellulaire)²⁷². De façon plus générale, l'autophagie peut permettre aux cellules métastatiques de s'adapter aux stress afférents à leur migration, ainsi qu'à l'environnement des sites de dissémination.

IV.C.2 Régulations croisées entre autophagie et mort(s) cellulaire(s)

L'ambivalence de la fonction du processus autophagique dans les cancers (rôle pro- ou anti-tumoral), et la complexité sous-jacente de ce rôle duel, s'illustre particulièrement par les nombreuses régulations croisées existant entre le processus autophagique et différentes formes de mort cellulaire (Figure 28)²⁷³⁻²⁷⁵.

L'un des principaux points de convergence où se rejoignent apoptose et autophagie a déjà été brièvement évoqué : il s'agit de la régulation de l'étape de nucléation par la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Bcl-2 a ainsi la faculté d'interagir, au niveau de la membrane du RE, avec la protéine Beclin 1 par l'intermédiaire du domaine BH3 de cette dernière. De ce fait, la séquestration de Beclin 1 par Bcl-2 inhibe l'autophagie en empêchant la formation du complexe de nucléation des autophagosomes^{276,277}.

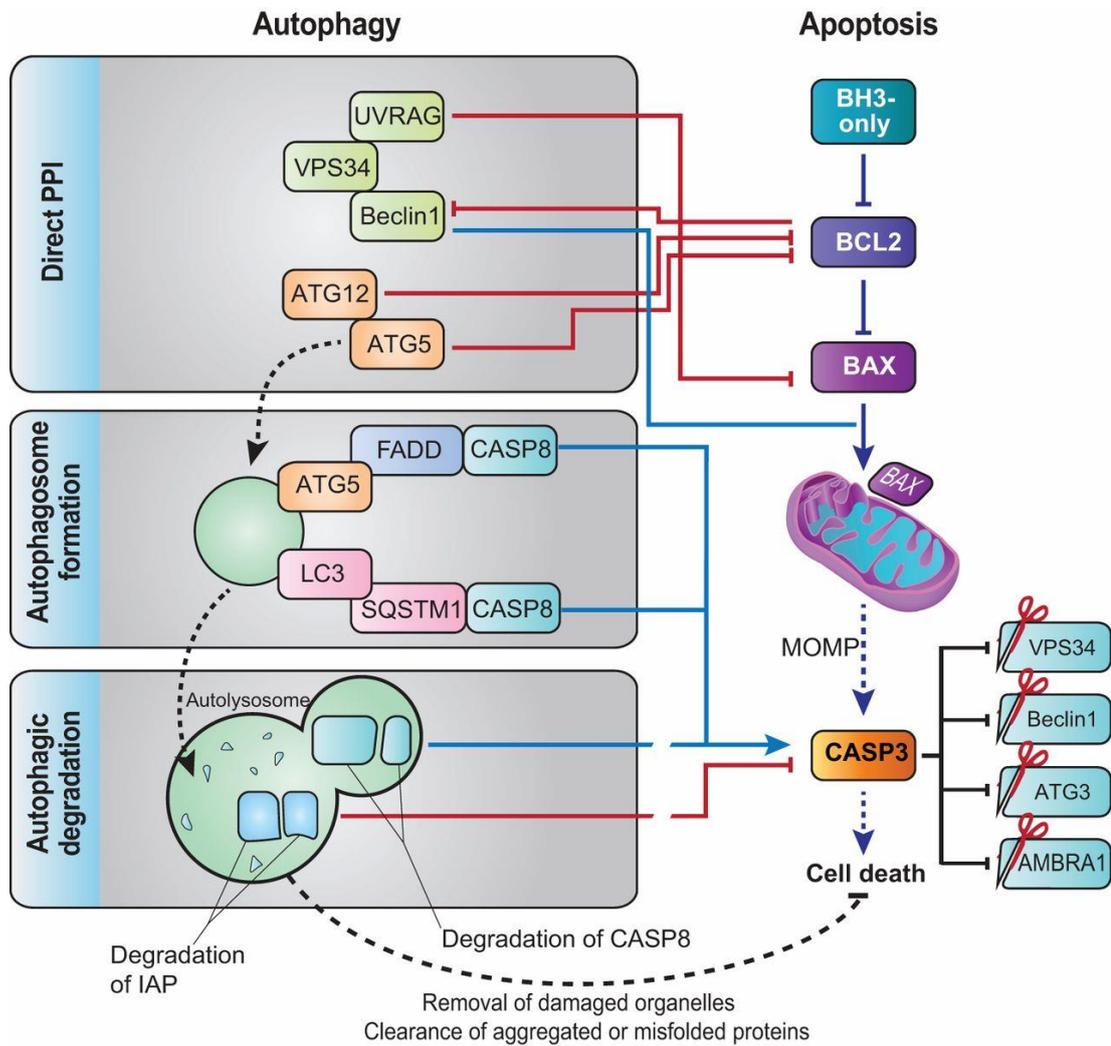


Figure 28. Principaux points de convergence entre protéines de l'autophagie et de l'apoptose. PPI : interaction protéine-protéine ; MOMP : perméabilisation de la membrane externe mitochondriale. D'après Rubinstein et al. *J Cell Sci*, 2012³³⁸

Notons que les protéines Mcl-1 et Bcl-xL de la famille Bcl-2, fonctionnellement redondante avec cette dernière, sont également capables d'inhiber l'autophagie par le même mécanisme²⁷⁵. Bcl-2, Mcl-1 et Bcl-xL peuvent donc agir à la manière « d'interrupteurs moléculaires » : en absence de stimuli apoptotiques, Bcl-2 reste liée à Bax et Bak au niveau de la membrane mitochondriale, et Beclin 1 est donc libre d'induire de l'autophagie. En présence d'un stimulus apoptotique, Bcl-2 ne pouvant plus se lier à Bax et Bak, interagit d'avantage avec Beclin 1, ce qui bloque l'autophagie. Ce mécanisme de levier moléculaire a longtemps conduit à penser que les deux processus étaient mutuellement exclusifs, mais l'on sait à présent que, considérés dans leur globalité, apoptose et autophagie possèdent de nombreux autres points d'interconnexion qui permettent d'expliquer des cas de figures différents.

IV.C.2.a Régulation de l'apoptose par l'autophagie

Le processus autophagique peut jouer un rôle crucial dans la régulation de la mort par apoptose. L'un des mécanismes les mieux décrits à ce jour consiste en la dégradation sélective, par autophagie, de facteurs pro- ou anti-apoptotiques. Cependant, là encore, l'autophagie semble pouvoir avoir des effets contradictoires sur le destin cellulaire. Il a par exemple été rapporté que l'activation de l'autophagie permettait de protéger les cellules de la mort induite par TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand), en dégradant de façon spécifique le facteur pro-apoptotique PUMA, indirectement impliqué dans la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale²⁷⁸.

A l'inverse, une étude du même groupe a montré qu'une autophagie élevée sensibilisait les cellules à la mort induite par Fas-ligand, qui appartient pourtant comme TRAIL à la famille des tumor necrosis factors (TNF). Ceci s'explique par le fait que l'autophagie dégrade, là encore de manière sélective, la phosphatase FAP-1, qui régule négativement la signalisation en aval de Fas, sans affecter celle en aval de TRAIL²⁷⁹.

Ces deux exemples illustrent bien le fait que l'autophagie peut, dans un contexte cellulaire comparable, avoir des effets totalement opposés en réponse à des signaux de nature proche.

IV.C.2.b Régulation de l'autophagie par l'apoptose

Outre le cas du couple Bcl-2/Beclin 1 précédemment décrit, il existe d'autres exemples de protéines clés de la machinerie autophagique régulées par des acteurs de la voie apoptotique. On peut par exemple citer le cas de la protéine ATG3, impliquée dans la biogenèse des autophagosomes, qui est clivée par la caspase 8 suite à l'activation de la voie apoptotique extrinsèque²⁸⁰. Beclin 1 est elle-même un substrat de la caspase 3²⁸¹ et, enfin, la protéine AMBRA-1, une protéine régulant l'activation de Beclin 1, peut être clivée par les calpaïnes ainsi que les caspases. De manière intéressante, l'expression de mutants d'AMBRA-1 résistants au clivage par les caspases semble rendre les cellules résistantes à

l'apoptose, ce qui suggère que le maintien du processus autophagique interfère avec l'entrée en apoptose dans ce modèle²⁸².

IV.C.2.c La membrane autophagosomale : une plateforme de signalisation requise pour la mort cellulaire

Selon une étude menée en 2012 par Young et al., la membrane autophagosomale pourrait jouer le rôle de plateforme permettant aux voies de signalisation qui régulent la mort cellulaire de fonctionner correctement. Dans cette étude, ce groupe a montré que l'utilisation d'un inhibiteur de sphingosine kinase n'induisait une mort cellulaire caspase-dépendante qu'à condition que la machinerie autophagique soit intacte. Plus précisément, il est rapporté dans ce travail que cette molécule induit une relocalisation de l'homo-complexe caspase 8 et du Fas-Associated protein with Death Domain (FADD) au niveau de membranes autophagosomales ATG-5 positives pour induire la mort cellulaire, qui est supprimée lors quand ATG5 est perdue²⁸³. Il a ainsi été proposé que certains acteurs de la machinerie autophagique pourraient servir d'échafaudage permettant le recrutement, la formation ou l'activation de complexes impliqués dans les voies de mort.

IV.C.2.d Régulation de la nécroptose par l'autophagie

La nécroptose est une forme de mort cellulaire programmée par nécrose, partageant des similitudes et certains régulateurs avec l'apoptose. Des études ont indiqué que, pour être menée à bien, la mort par nécroptose nécessitait l'existence d'un processus autophagique fonctionnel, bien que les liens mécanistiques entre les deux processus ne soient pas encore clairement élucidés à ce jour. Une étude a par exemple montré que l'utilisation de l'obatoclox, un inhibiteur de Bcl-2, Mcl-1 et Bcl-xL, induisait simultanément un flux autophagique ainsi qu'une mort cellulaire non-apoptotique, mais que l'induction de cette mort cellulaire était inhibée lorsque ATG5 était perdue²⁸⁴. Comme évoqué plus haut, il a ainsi été proposé un rôle d'échafaudage moléculaire (« scaffolding ») pour ATG5, au niveau de la membrane autophagosomale.

IV.C.2.e Mort cellulaire par autophagie

Bien que cela constitue toujours un point de controverse, il a été proposé que l'autophagie pouvait constituer une voie de mort cellulaire à part entière. Les mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine de cette mort par auto-digestion ne sont toutefois pas clairement élucidés. L'autophagie cytotoxique serait ainsi un type de mort cellulaire programmée (type II), au même titre que l'apoptose (type I), la nécrose (type III) et la catastrophe mitochondriale (type IV). L'équipe du Dr. Patrice Codogno a proposé trois critères permettant de définir une mort cellulaire par autophagie²⁸⁵ : 1) la mort cellulaire observée est indépendante de l'apoptose, 2) la mort cellulaire est accompagnée d'une augmentation du flux autophagique, 3) l'inhibition pharmacologique ou génétique de l'autophagie

prévient la mort cellulaire. Ces trois critères, et en particulier le dernier, sont essentiels pour distinguer la mort cellulaire par autophagie d'une mort cellulaire « accompagnée » d'autophagie. Des exemples de mort cellulaire par autophagie ont été essentiellement observés en réponse aux traitements par des agents anti-cancéreux mais, bien qu'un nombre croissant d'études décrivent ce type d'autophagie, les contours conceptuels de cette mort par autophagie demeurent encore flous.

On peut néanmoins citer une forme de mort cellulaire par autophagie identifiée dans un modèle murin et baptisée « autosis », dépendante des pompes sodium-potassium, et qui serait activée par carences ou hypoxie-ischémies : ce type particulier de mort cellulaire se caractériserait d'un point de vue morphologique par un rétrécissement et un refaçonnage du noyau, des renflements périnucléaires et une augmentation substantielle du nombre d'autophagosomes²⁸⁶.

IV.D MODULATION DE L'AUTOPHAGIE A VISEE THERAPEUTIQUE

Comme cela vient d'être discuté dans la partie précédente, des variations infimes de contexte cellulaire peuvent conduire à des rôles très différents voire radicalement opposés de l'autophagie sur le destin cellulaire. Dans les cancers, différents types de traitements anti-cancéreux peuvent ainsi affecter le processus autophagique de manière très hétérogène : dans certains cas, la réponse autophagique constituera un frein au traitement tandis que dans d'autres situations, elle pourra en augmenter l'efficacité. Pour ces raisons, il est nécessaire d'établir avec précision le rôle du processus autophagique dans la réponse aux traitements anti-cancéreux, afin de déduire de quelle manière moduler l'autophagie (activation ou inhibition) pour qu'un bénéfice thérapeutique s'en dégage.

Ce questionnement et cet objectif ont été au cœur de mon travail de thèse dans le contexte du traitement des LAGC ALK+ par le crizotinib.

IV.D.1 Différentes autophagies pour différents traitements anticancéreux

Il n'existe actuellement aucun moyen morphologique, biochimique ou moléculaire qui permette de déterminer avec facilité le rôle de l'autophagie dans un type cellulaire donné et réponse à différents traitements. Il faut donc obligatoirement passer par des techniques empiriques permettant son activation ou, plus fréquemment, son inactivation à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques, ou génétiques.

IV.D.1.a Rôle cytoprotecteur

L'autophagie est dite « cytoprotectrice » lorsque son inhibition permet la sensibilisation des cellules tumorales au stress thérapeutique. Cette sensibilisation par perte d'autophagie se traduit

généralement par une augmentation de l'apoptose induite par le traitement^{287,288}. L'autophagie cytoprotectrice peut entraîner la résistance des cellules cancéreuses aux traitements : l'exemple le plus connu est probablement celui des leucémies myéloïdes chroniques (LMC) exprimant la tyrosine kinase BCR-ABL²⁸⁹. Ces cellules, lorsqu'elles sont traitées par l'imatinib, induisent un flux autophagique qui limite l'effet de la drogue. Des exemples similaires existent dans des cancers solides tels que le cancer du sein, du pancréas, de la prostate, des ovaires, du poumon, les glioblastomes, des cancers gastro-intestinaux et des cancers hématologiques tels que les leucémies aiguës myéloïdes²⁹⁰⁻²⁹⁸.

Ce même cas de figure est observé dans les LAGC ALK+ en réponse au traitement par le crizotinib, et ce dernier point constitue justement l'une des bases sur lesquelles repose mon travail de thèse. Il a en effet été montré que le traitement des LAGC ALK+ par le crizotinib induit un flux autophagique cytoprotecteur dont l'inhibition par un agent bloquant l'autophagie (la chloroquine, CQ) potentialise les effets de la drogue, en augmentant la mort par apoptose et en inhibant la croissance tumorale (*in vivo*)²⁹⁹.

IV.D.1.b Rôle cytotoxique

L'autophagie peut également jouer un rôle « cytotoxique », lorsque son activation par le traitement favorise la mort cellulaire. Dans ce cas, elle agit en synergie avec le traitement anti-cancéreux pour induire la mort cellulaire, soit par apoptose, soit par « mort autophagique » (avec les réserves préalablement mentionnées)^{287,300}. Une telle fonction peut être attribuée à l'autophagie induite suite à l'inhibition de Bcl-2 dans le cancer du sein car elle potentialise alors la mort cellulaire induite en réponse au traitement par la doxorubicine³⁰¹. Des cas similaires ont été rapportés dans le cancer du poumon, les glioblastomes ainsi que dans des cancers hématologiques.

IV.D.1.c Rôle cytotatique

Le rôle cytotatique de l'autophagie est moins décrit dans la littérature que les deux précédents. A l'instar de l'autophagie cytotoxique, l'autophagie cytotatique permet de sensibiliser les tumeurs aux traitements anti-cancéreux, à ceci près qu'elle n'entraîne pas une mort cellulaire accrue, mais potentialise plutôt l'arrêt de la prolifération et de la croissance tumorale. L'équipe du Dr. Gewirtz est la première à avoir décrit ce type d'autophagie dans les NSCLC ALK- après traitement par la vitamine D et par des analogues de celle-ci³⁰². Cette autophagie cytotatique semble également augmenter la sensibilité des tumeurs au traitement par radiothérapie.

IV.D.1.d Rôle non protecteur

Cette forme d'autophagie est encore moins décrite dans la littérature que la précédente. Elle semble être induite par de nombreux stress, mais sans qu'un réel impact sur l'effet des traitements cancéreux n'ait pu, à ce jour, être mis en évidence^{303,304}.

IV.D.2 Transition entre les différents rôles de l'autophagie

Si la multiplicité des rôles de l'autophagie en réponse aux traitements anticancéreux constitue déjà un élément de complexité, il est à la fois fascinant et potentiellement utile d'un point de vue thérapeutique de constater qu'il est possible de modifier ces rôles de l'autophagie. On peut alors parler de « transition (switch) autophagique ». Plusieurs études décrivant un switch de l'autophagie cytoprotectrice vers l'autophagie cytotoxique ont été publiées. La première d'entre elles, dans le cancer du sein, a montré que le traitement de cellules de carcinomes mammaires par radiothérapie induit de l'autophagie cytoprotectrice mais que, lorsque la radiothérapie est combinée avec un traitement à base d'analogues de la vitamine D, la mort cellulaire est potentialisée et les cellules meurent en partie par autophagie^{305,306}. L'addition de vitamine D dans ce système induit donc un switch entre un rôle cytoprotecteur et un rôle cytotoxique de l'autophagie.

Au cours de ma thèse, je me suis particulièrement intéressé à la protéine BCL-2 qui, de par son statut particulier, au carrefour entre apoptose et autophagie, paraît particulièrement à même de jouer le rôle de rhéostat moléculaire pour moduler l'autophagie en faveur de l'effet thérapeutique.

Comme précédemment décrit, l'interaction entre Bcl-2 et Beclin 1 permet en effet une modulation fine de l'induction du processus autophagique, et certains ont proposé que l'intensité du flux autophagique pourrait déterminer son rôle final sur le destin cellulaire : une autophagie contrôlée permettrait ainsi la survie cellulaire, en permettant le recyclage des nutriments, des macromolécules, et en fournissant de l'énergie ; à l'inverse, un flux autophagique trop intense s'avèrerait délétère et favoriserait la mort. Dans ce contexte, la capacité de Bcl-2 à moduler l'intensité du flux autophagique prend toute son importance^{276,277} : le groupe du Dr. Levine a ainsi démontré que la perte de l'interaction Bcl-2/Beclin 1 induisait une augmentation massive du flux autophagique, phénomène associé à la mort cellulaire. De plus, la mort cellulaire observée est apparue comme étant indépendante des caspases, et seule l'inhibition de l'autophagie a permis sa réversion. De façon similaire, il a été montré dans un modèle de neuroblastome qu'une forte carence en nutriments induisait simultanément l'expression de Bcl-2 et un fort flux autophagique ; toutefois, lorsque ces cellules étaient de surcroît traitées avec un inhibiteur de Bcl-2, l'ABT-737, le flux autophagique atteignait une intensité encore supérieure et s'accompagnait d'une mort cellulaire massive, ne pouvant être réversée que par des agents bloquant l'autophagie³⁰⁷. L'induction concomitante de l'expression de Bcl-2 et de flux autophagique met ainsi en lumière un rôle

de « verrou moléculaire » de la part de Bcl-2, empêchant un emballement du flux autophagique potentiellement délétère pour la cellule. Le travail de thèse présenté dans la partie résultat de ce manuscrit s'attache précisément à explorer cette hypothèse dans le cas des LAGC ALK+ soumis au traitement par le crizotinib.

IV.D.3 Des outils pour moduler l'autophagie dans les cancers

Si de nombreux essais cliniques combinant des traitements anti-cancéreux à des modulateurs de l'autophagie sont actuellement en cours, l'utilisation de ces derniers pose encore un certain nombre de problèmes non résolus à l'heure actuelle, et limite leur utilisation en clinique. Outre la difficulté de prédire la fonction du flux autophagique induit en réponse aux traitements chez les patients, l'obstacle majeur reste l'absence de méthodes fiables permettant de mesurer le flux autophagique au diagnostic.

Plusieurs stratégies sont toutefois à l'étude, qu'il s'agisse d'inhibiteurs ou d'activateurs de l'autophagie.

IV.D.3.a Les agents inhibiteurs de l'autophagie

L'autophagie cytoprotectrice, induite en réponse aux traitements tumoraux, reste le cas le plus abondamment décrit dans la littérature. Aussi, plusieurs inhibiteurs de l'autophagie potentiellement utilisables en cliniques sont d'ores et déjà testés. Le plus célèbre d'entre eux est la chloroquine ou l'hydroxychloroquine, une molécule déjà utilisée en clinique pour son activité anti-paludique, qui empêche l'acidification du lysosome et donc la dégradation du contenu de l'autophagosome¹⁹³. De nombreux essais cliniques combinant la chloroquine à des traitements anti cancéreux ont déjà été menés et sont également en cours. Son utilisation revêt cependant plusieurs inconvénients majeurs, dont en premier lieu une absence de spécificité vis-à-vis du processus. Il a ainsi été démontré que la chloroquine affectait, en plus de l'autophagie, l'apoptose ainsi que la vascularisation tumorale. Cette molécule possède par ailleurs un effet immuno-supresseur important qui peut contribuer à fragiliser l'état du patient. Autre obstacle d'envergure : la dose nécessaire pour une inhibition efficace de l'autophagie ne semble pas compatible avec une administration chez les patients³⁰⁸⁻³¹³.

Des inhibiteurs pan PI3Kinases tels que la 3-MéthylAdénine (3-MA) sont également couramment utilisés en laboratoire pour inhiber l'autophagie, mais leur utilisation ne paraît pas transposable à la clinique pour des raisons comparables à celles mentionnées pour la chloroquine³¹⁴. Plus récemment, des études ont permis d'identifier la PI3K de classe 3 Vps34 comme une cible thérapeutique prometteuse pour le ciblage de l'autophagie : plusieurs inhibiteurs spécifiques de cette molécule ont été développés, tels que la spautin-1 (specific and potent inhibitor of autophagy 1). Des études pré-cliniques ont déjà montré que cette molécule permet une potentialisation des effets de

l'imatinib dans les leucémies myéloïdes chroniques³¹⁵. D'autres inhibiteurs de Vps34 ont également été développées et paraissent eux-aussi prometteurs, tels que Vps34-IN1.

Enfin, des composés ciblant le complexe ULK1 ont été identifiés. Les plus récents sont le MRT68921 et le MRT67307, deux inhibiteurs compétitifs de l'ATP permettant l'inhibition de l'activité de ULK1 ainsi que ULK2. Leur effet dans le traitement des cancers reste toutefois à déterminer.

IV.D.3.b Les agents activateurs de l'autophagie

Plusieurs drogues ont également été développées, et testées pour leur capacité à activer le flux autophagique³¹⁶. Parmi ces composés activateurs de l'autophagie, on retrouve la rapamycine, connue pour inhiber mTOR et donc lever la répression sur l'initiation du processus autophagique. L'utilisation de cet agent est envisagée dans le traitement des LAGC ALK+, en raison de son puissant effet antiprolifératif sur les cellules tumorales exprimant l'oncogène ALK³¹⁷. On peut également mentionner certains inhibiteurs de tyrosine kinase qui possède la même capacité, notamment l'imatinib ainsi que, dans le cas des LAGC ALK+, le crizotinib²⁹⁹. On peut également citer le resvératrol ou la vitamine D, comme activateurs reconnus de l'autophagie.

Initialement développées en vue d'obtenir un effet cytotoxique en bloquant l'activité des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, les drogues « BH3-mimétiques » se sont également révélées être de puissants outils pour induire l'autophagie³¹⁸. Concernant cet aspect, ces drogues agissent en inhibant la formation du complexe Bcl-2/Beclin 1, ou du complexe Bcl-xL/Beclin 1. Parmi ces drogues, l'ABT-737, un inhibiteur de Bcl-2 et Bcl-XL, a été abondamment décrit dans la littérature pour sa faculté à induire un flux autophagique, en plus de son effet sur l'apoptose. Des essais cliniques ont cependant mis en lumière un effet secondaire délétère de cette drogue, qui induit l'apoptose des plaquettes et donc potentiellement de sévères thrombopénies. Cet échec a conduit à la mise au point de l'ABT-199 (venetoclax) qui cible de manière plus spécifique la protéine Bcl-2, et semble ainsi dépourvu d'effet négatif sur la survie des plaquettes³¹⁹.

Enfin, les miARN sont également envisagés dans des stratégies anticancéreuses, et pourraient servir d'outils pour moduler l'autophagie à des vues thérapeutiques. Pour certains d'entre eux, des études cliniques ont déjà été menées : c'est le cas du miR-34a, sous la forme d'un miARN « mimétique » nommé MRX34. miR-34a est en effet un miARN à l'effet suppresseur de tumeur puissant capable, de par sa faculté à cibler Bcl-2, d'activer le flux autophagique. L'un des avantages certain de l'utilisation des miARN en thérapie anticancéreuse réside dans leur faculté à cibler plusieurs transcrits participants généralement à un même processus biologique : l'utilisation de miARN (mimétiques ou, dans le cas

d'oncomiRs d'antimiRs) est donc, de fait, une piste particulièrement prometteuse pour l'avenir des thérapies anticancéreuses.

OBJECTIFS DE LA THESE

Mon travail de thèse part de l'observation réalisée par mon équipe d'accueil dès 2001⁷⁹, puis validée par d'autres^{76,80}, selon laquelle l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 semble spécifiquement réprimée dans les LAGC exprimant la tyrosine kinase oncogénique NPM-ALK. Cette observation était particulièrement surprenante car la protéine Bcl-2 est largement décrite comme un oncogène majeur, surexprimé dans la majorité des cancers et notamment les lymphomes. Parallèlement à cela, la mise en évidence dans les LAGC d'une modulation par NPM-ALK des fonctions de l'ARE-BP HuR, connue pour contrôler la stabilité et la traduction d'ARNm cibles, et justement décrite comme pouvant l'ARNm Bcl-2³²⁰, nous a amenés à formuler l'hypothèse suivante : dans les LAGC, la présence et l'activité de la tyrosine kinase oncogénique NPM-ALK pourrait être responsable de la sous-expression, au niveau post-transcriptionnel, de l'oncogène Bcl-2.

Cette hypothèse initiale prend un sens nouveau, une fois replacée dans le contexte des nouvelles thérapies actuellement développées pour le traitement des LAGC ALK+.

En effet, en raison de l'emphase particulière placée ces dernières années sur le développement d'inhibiteurs ciblant l'activité tyrosine-kinase ALK, dont le crizotinib, et de leur arrivée imminente en clinique pour le traitement des LAGC ALK+, nous nous sommes demandés si le fait d'inhiber l'activité de NPM-ALK pouvait induire une ré-expression du taux de protéine Bcl-2 dans les cellules malignes.

De plus, la récente mise en évidence par notre équipe de l'induction d'une autophagie cytoprotectrice dans les LAGC ALK+ en réponse au traitement par le crizotinib, limitant l'effet de la drogue, a particulièrement alimenté cette inquiétude²⁹⁹. Nous avons ainsi cherché à savoir si la protéine Bcl-2, connue pour contrôler le processus autophagique, et dont l'expression pourrait potentiellement être induite par cette même drogue, pourrait justement conférer son caractère cytoprotecteur à l'autophagie observée.

Dans ce contexte, mes travaux de thèse ont eu plusieurs objectifs :

- Déterminer si l'expression et l'activité de NPM-ALK étaient bel et bien responsables de l'inhibition de l'expression de Bcl-2 dans les LAGC ALK+
- Préciser au niveau cellulaire les conséquences d'une potentielle ré-expression de Bcl-2 dans ces cellules, en réponse au traitement par le crizotinib et déterminer si le blocage de ce mécanisme pouvait mener à d'éventuels bénéfices thérapeutiques
- Disséquer les mécanismes moléculaires gouvernant, au niveau post-transcriptionnel, la mise en silence de l'oncogène Bcl-2 dans les LAGC ALK+

Enfin, les résultats obtenus au cours de ma thèse m'ont également amené à m'intéresser à un rôle potentiellement plus large de l'ARE-BP HuR dans la régulation du processus autophagique.

RESULTATS

PARTIE I :

ARTICLE

L'inhibition de l'activité tyrosine kinase de ALK par le crizotinib est une stratégie d'ores et déjà utilisée en clinique, comme traitement de 1^{ère} ligne dans les NSCLC ALK+^{160,161}. En Europe, les premiers patients de LAGC ALK+ ont également pu bénéficier de ce traitement ; toutefois, les limites de cette stratégie thérapeutique sont rapidement devenues évidentes lorsqu'un phénomène de reprise de la croissance tumorale s'est systématiquement manifesté dès l'arrêt du traitement, entraînant la rechute des patients¹⁶⁶.

Notre équipe a récemment publié des données qui permettraient d'expliquer l'origine de ce phénomène. Dans cette étude, il a été démontré que l'utilisation du crizotinib dans les LAGC ALK+ entraînait l'induction d'un flux autophagique à l'effet cytoprotecteur vis-à-vis des cellules malignes. Cet effet cytoprotecteur se traduit notamment par une diminution de la faculté du crizotinib à induire la mort des cellules tumorales par apoptose²⁹⁹ ; aussi, même si l'utilisation d'un agent bloquant l'autophagie, la chloroquine ; permet de lever cette inhibition, l'utilisation de cet agent n'est pas envisageable en clinique en raison des points évoqués en introduction (effet immunosupresseur, dose requise pour l'inhibition efficace de l'autophagie...). Ainsi, l'induction de ce type de flux autophagique pourrait permettre à certaines cellules malignes de supporter le stress thérapeutique exercé par le crizotinib, pour ultérieurement permettre la reprise de la croissance tumorale dès l'arrêt du traitement, voire l'acquisition de mécanismes de résistances secondaires vis-à-vis de cette drogue.

Constater les limites des stratégies visant à cibler l'activité tyrosine kinase de ALK, notamment celle reposant sur l'utilisation du crizotinib, nous a conduit à établir un parallèle avec le statut d'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 dans les LAGC. En effet, comme précédemment mentionné^{79,80}, l'expression de cette protéine oncogénique demeure étrangement indétectable dans les LAGC ALK+, alors qu'elle paraît abondamment exprimée dans les LAGC n'exprimant pas ALK, selon plusieurs études dont une réalisée par notre équipe. Cette observation nous a conduits à formuler l'hypothèse selon laquelle ALK serait en réalité directement responsable de la répression de Bcl-2. La conséquence de cette hypothèse serait que l'inhibition de l'activité de NPM-ALK dans les LAGC, notamment lors d'un traitement par le crizotinib, pourrait abolir ce système de répression et conduire à une ré-expression de l'oncogène Bcl-2. Bcl-2 étant une protéine anti-apoptotique, cette ré-expression pourrait à son tour expliquer certaines des limites du crizotinib, notamment sa faculté limitée à induire la mort par apoptose. Elle pourrait également être liée à l'aspect cytoprotecteur de l'autophagie induite par la drogue, Bcl-2 étant également décrite pour exercer un contrôle du flux autophagique.

La majeure partie de ma thèse a donc consisté à vérifier cette hypothèse d'une expression mutuellement exclusive de ALK et Bcl-2 dans LAGC ALK+, et à en explorer les conséquences au niveau

cellulaire afin d'en extraire de nouvelles pistes permettant l'optimisation des stratégies thérapeutiques visant à cibler ALK.

Cette partie de mon travail de thèse fait l'objet d'un article actuellement en cours de révision dans le journal *Blood*. Dans cette étude, nous montrons que ALK est effectivement responsable de la répression de Bcl-2 dans les LAGC ALK+, et que toute stratégie visant à cibler l'activité (crizotinib) ou l'expression (interférence à l'ARN) de NPM-ALK se traduit par une ré-expression de cette protéine anti-apoptotique, dans toutes les lignées cellulaires de LAGC ALK+ que nous avons pu tester.

Nous montrons de plus que cette ré-expression est effectivement responsable de l'efficacité limitée du crizotinib, dans la mesure où bloquer cette ré-expression par interférence à l'ARN (siRNA dirigé contre Bcl-2, ou utilisation du miRNA mimétique miR-34a), en combinaison avec le crizotinib, conduit à une perte massive de la viabilité cellulaire. De manière cohérente avec les propriétés anti-apoptotiques de Bcl-2, nous mettons en évidence que cette perte accrue de viabilité cellulaire résulte, tout au moins en partie, à une sensibilisation des cellules vis-à-vis de l'apoptose induite par la drogue.

En outre, nous montrons que la ré-expression de Bcl-2 induite par le crizotinib participe au contrôle du flux autophagique qui est également induit par cette drogue. En effet, la perte de Bcl-2 se traduit une intensification du flux autophagique dans les cellules de LAGC traitées par le crizotinib. Nous avons pu corrélérer cette intensification du flux autophagique avec l'effet délétère précédemment observé sur la viabilité cellulaire et ainsi démontré que, de manière intéressante, le fait de cibler Bcl-2 permettait de faire muer l'autophagie cytoprotectrice induite par le crizotinib en une autophagie délétère pour les cellules : l'autophagie induite par un traitement combiné crizotinib/déplétion de Bcl-2 soutient ainsi l'effet anti-tumoral de la drogue plutôt que de protéger les cellules malignes vis-à-vis de celle-ci.

Enfin, nous avons réalisé des expériences de xénogreffes de cellules de LAGC ALK+ préalablement transfectées par un miRNA thérapeutique, le miR-34, ciblant Bcl-2, sur des souris immunodéprimées, traitées ou non par le crizotinib : ceci nous a permis de valider *in vivo* les principales conclusions de notre étude.

Article type: Regular article

Primary Scientific Category: LYMPHOID NEOPLASIA

Blockade of crizotinib-induced BCL-2 elevation in ALK-positive ALCL triggers autophagy associated with cell death

Avédis Torossian¹⁻³, Julie Frentzel¹⁻³, Camille Daugrois^{1-3,8}, Nicolas Broin¹, Sarah Gandarillas⁴, Talal Al Saati⁵, Laurence Lamant^{1-3,6-8}, Pierre Brousset^{1-3,6-8}, Sylvie Giuriato^{1-3,7,9} and Estelle Espinos^{1-3,7}

¹INSERM, UMR1037 CRCT, Toulouse, France ; ²Université Toulouse III-Paul Sabatier, UMR1037 CRCT, Toulouse, France ; ³CNRS, ERL5294 UMR1037 CRCT, Toulouse, France ; ⁴INSERM/UPS, US006/CREFRE, Toulouse, France ; ⁵INSERM/UPS, US006/CREFRE, Service d'Histopathologie, Toulouse, France ; ⁶Département de pathologie, IUCT, Toulouse, France ; ⁷European Research Initiative on ALK-related malignancies (ERIA) ; ⁸Laboratoire d'Excellence Toulouse Cancer-TOUCAN, Toulouse, France ; ⁹Transautophagy: European network for multidisciplinary research and translation of autophagy knowledge, COST Action CA15138

Note: S. Giuriato and E.E contributed equally to this work.

Text word count: 3864

Abstract word count: 194

Number of figures: 7

Number of references: 60

Key points

- Crizotinib-mediated inactivation of ALK in ALCL causes an increase in BCL-2 levels which restrains the cytotoxic effects of the drug
- Targeting BCL-2 in combination with crizotinib treatment enforces autophagy and leads to massive cell death

ABSTRACT

Anaplastic lymphoma kinase (ALK)-positive anaplastic large cell lymphoma (ALCL) are tumors that carry translocations involving the *ALK* gene at the 2p23 locus, leading to overexpression of ALK tyrosine kinase fusion oncoproteins. ALK-positive ALCL are particular among hematological malignancies in that they express very low levels of B-Cell Lymphoma 2 (BCL-2), the founding member of the BCL-2 family of apoptosis regulating proteins and a recognized inhibitor of Beclin1-dependent autophagy. We have previously shown that treatment of ALK-positive ALCL cells with the ALK tyrosine kinase inhibitor crizotinib induces autophagy as a pro-survival response. Here, we observed that crizotinib-mediated inactivation of ALK caused an increase in BCL-2 levels in ALK-positive ALCL that restrained the antitumoral effects of the drug. Blocking crizotinib-induced elevation of BCL-2 strongly impaired cell viability, through both an increase in apoptosis and enforced activation of autophagic flux. More importantly, blockade of BCL-2 re-expression enhanced crizotinib-triggered autophagic flux, which consequently reached levels usually associated with cell death rather than cell survival. This work suggests that BCL-2 molecular depletion combined with crizotinib treatment may represent a promising therapeutic addition to current treatments, and provides new insight into the cross-regulation between apoptosis and autophagy in ALK-positive ALCL.

INTRODUCTION

Anaplastic large cell lymphoma (ALCL) is an aggressive subtype of peripheral T-cell non-Hodgkin lymphoma that accounts for 10 to 20% of childhood lymphoma¹. Two systemic forms of ALCL are defined in the current WHO classification, according to the presence or absence of chromosomal translocations involving the anaplastic lymphoma kinase (*ALK*) gene at the 2p23 locus^{2,3}. Such translocations occur in about 85% of childhood cases and result in the expression of a variety of ALK fusion proteins^{4,5}. The t(2;5)(p23,q35) is the most common translocation in ALK-positive ALCL, and leads to the constitutive expression of the nucleophosmin (NPM)-ALK fusion protein. Aberrant activation of the ALK kinase domain through the oligomerization of NPM is responsible for the tyrosine phosphorylation and activation of various downstream signaling pathways essential for cell survival⁶⁻⁸. Since the initial discovery of NPM-ALK by Morris et al. in ALCL, growing evidence have firmly established ALK and other ALK-fusion proteins as prevalent oncogenes, abnormally expressed in various cancers including diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), a proportion of non-small cell lung carcinoma (NSCLC) and inflammatory myofibroblastic tumors (IMT)^{4,9,10}.

Patients with ALK-positive ALCL have a better outcome than those with ALK-negative ALCL, with a 5-year overall survival (OS) rate of 70% for adults and >90% for children^{3,11}. However, treatment failures and tumor relapses are observed in approximately 30% of patients and are associated with a poor prognosis^{11,12}. Targeted inhibition of ALK activity by the dual ALK/MET inhibitor crizotinib is already proving effective in the clinic for the treatment of late stage and metastatic cases of ALK-positive NSCLC, and this drug is also currently undergoing clinical trials for use in other ALK-related diseases, including ALK-positive ALCL¹³⁻¹⁵. However, as reported for other tyrosine kinase inhibitors, escape

mechanisms which allow cancer cells to overcome the effects of crizotinib have already been described in ALK-positive NSCLC, IMT and ALCL patients^{16,17}. These phenomena are mainly due to punctual mutations located in the ALK tyrosine kinase domain, *ALK* gene amplification and/or activation of compensatory signaling pathways¹⁸⁻²⁰.

Recently, our group and others demonstrated that macro-autophagy (hereafter referred to as “autophagy”) is induced in response to ALK inactivation in different ALK-dependent cancers²¹⁻²³. These results propose a model whereby autophagy acts as a cell survival-promoting mechanism, and is therefore potentially involved in the acquisition of resistance to tyrosine kinase inhibitors^{22,24}. Autophagy is a highly-conserved catabolic pathway in which cytoplasmic components are sequestered within double membrane autophagosomes and delivered to lysosomes for degradation and recycling²⁵. It includes a dynamic process (autophagic flux) that is responsible for autophagosome synthesis, delivery of autophagic substrates to the lysosomes, and degradation of autophagic substrates inside lysosomes²⁶. Each of these steps is tightly regulated by different protein complexes, which were initially discovered in yeast by the group of Prof Y. Oshumi²⁷. Despite the significant advances in understanding the molecular machinery of autophagy, its biological functions clearly appear to be highly tissue- and context-dependent. In cancer, autophagy is often described as a cell survival-promoting mechanism, however, cell death-promoting roles have also been reported according to the stage of cancer development and treatment administered²⁸⁻³⁰.

The complexity of cell death mechanisms and their finely-tuned regulation can be illustrated by the complex crosstalk that exists between apoptosis and autophagy, with these processes sharing key common regulators^{31,32}. B-Cell Lymphoma 2 (BCL-2), the founding member of the well-known BCL-2 family of apoptosis-regulating proteins,

exemplifies this intricate crosstalk. BCL-2 typically localizes to the outer mitochondrial membrane, where it plays an important role in promoting cell survival by inhibiting the action of pro-apoptotic proteins such as BAX and BAK. However, it can also localize to the endoplasmic reticulum membrane and interact with the evolutionarily conserved autophagy protein Beclin1, thereby inhibiting Beclin1-dependent autophagy^{33,34}. Overexpression of BCL-2 is a classical feature of cancers, including hematopoietic tumors. In addition, multiple studies have shown that high levels of BCL-2 expression correlate with more aggressive human tumors^{35,36}. In contrast, ALK-positive ALCL show characteristically low expression levels of the BCL-2 anti-apoptotic protein, suggesting a possible explanation for their relatively good prognosis³⁷⁻³⁹. It has been proposed that the oncogenic properties of BCL-2 could originate not only from its ability to block apoptosis but also from its capacity to inhibit autophagy, thus preventing autophagic-mediated cell death⁴⁰. This further supports BCL-2 as a critical target for cancer treatment, and numerous BCL-2 targeting strategies are being developed for therapeutic applications, including pharmacological inhibitors⁴¹ and more recently BCL-2 targeting microRNA mimics such as miR-34a mimics^{42,43}.

Here, we show for the first time that ALK inactivation in ALK-positive ALCL induces an increase in BCL-2 expression levels, and thereby might promote cancer cell survival and contribute to the therapeutic failures of the current ALK-targeted therapies. We found that BCL-2 downregulation strongly potentiates the antitumoral effects of crizotinib both *in vitro* and *in vivo*, by increasing apoptosis and reinforcing autophagy, ultimately leading to massive cell death. Our data strongly suggest that the BCL-2 protein, acting at the crossroads between apoptosis and autophagy, is the key-stone of an escape mechanism in therapeutically-challenged ALK-positive ALCL. Therefore, BCL-2 depletion in combination

with crizotinib treatment may offer significant promise for improving the clinical outcomes of ALK-positive ALCL patients.

MATERIALS AND METHODS

Tumor samples and human cell lines

Frozen samples from 48 ALK-positive ALCL tumors and 11 reactive lymph nodes were retrieved from our tumor tissue bank (CHU, Toulouse). ALCL diagnosis was based on morphological and immunophenotypical criteria, as described in the current 2008 WHO classification¹. Only cases with at least 50% lymph node involvement, assessed by ALK1 or CD30 staining of frozen biopsies, and good RNA integrity (≥ 7) were selected from our tumor bank. Antibody binding was detected with the Dako REAL Detection System (Code K5001). This study was carried out in accordance with the institutional review board–approved protocols, and the procedures followed were in accordance with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2000.

KARPAS-299, COST, and SU-DHL-1 ALK-positive ALCL cell lines bearing the t(2;5)(p23;q35) translocation were originally obtained from DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Culture) or established in our laboratory⁴⁴. The ALK-negative ALCL cell line FEPD was kindly gifted by Dr. K. Pulford (Oxford University, Oxford, United Kingdom). Cells were cultured as previously described²². The mRFP-EGFP-LC3 KARPAS-299 cell line was established in our laboratory (as described in the Supplemental Methods).

Chemicals

Crizotinib (also known as PF2341066 or Xalkori) was synthesized and purchased from @rtMolecule (France). NPM-ALK activity was inhibited using 62.5 to 500 nM crizotinib for 24 to 72 h.

Cell viability assays by MTS colorimetric measurements

Cells were counted and seeded in 96-well plates (5 000 cells/well, in 100 µl IMDM containing 20% FBS). They were incubated at 37°C in the presence of crizotinib (200 to 500 nM) and were then transfected by siRNAs or microRNA mimics 24 h prior to when necessary. Cell viability was assessed 72 h after crizotinib treatment, using the CellTiter 96 AQueous One Solution cell proliferation assay (Promega, Fitchburg, Wisconsin USA).

Apoptosis measurements

Analysis of apoptosis was carried out using annexin V (AnnexinV-Pacific Blue) and propidium iodide (PI) (BD Bioscience #559763) staining, according to standard protocols. This was followed by flow cytometry using a MACSQUANT MQ10 (Miltenyi Biotec, Santa Barbara, USA). Results were analyzed using FlowJo software (v.10).

Flow cytometric quantification of autophagic flux

mRFP-EGFP-LC3 KARPAS-299 cells were harvested, washed in PBS and resuspended in 1 mL PBS. To assess autophagic flux, the fluorescence RFP/EGFP ratio was measured using a BD LSR Fortessa™ flow cytometer. Analysis of results was performed using the FlowJo (v.10) or BD FACSDIVA software.

Confocal microscopy

Cells were fixated (20 min, 4% PFA) on polylysine-coated slides (0.01%) and stained with DAPI using ProLong® Gold Antifade Mountant with DAPI (Thermofisher). Analysis by confocal microscopy (LSM-780, Zeiss) was performed in order to observe fluorescent signals in mRFP-EGFP-LC3-expressing KARPAS-299 cells following crizotinib treatment. Image analysis was performed using ImageJ software.

Statistics:

Differences between 2 groups were examined using 2-tailed Student's t-test. All analyses were performed using GraphPad Prism version 5.03 for Windows. $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

BCL-2 expression in ALK-positive ALCL

We first investigated BCL-2 expression in 48 tumor samples from ALK-positive ALCL patients, using RT-qPCR (Figure 1A). In keeping with previous work that reported very low levels of BCL-2 in primary tissue samples^{37-39,45}, our data showed that BCL-2 mRNA levels were significantly lower in ALK-positive samples compared to reactive lymph node samples which do not express ALK. To investigate whether there is a link between ALK and BCL-2 protein expression, we next checked their relative abundance in three ALK-positive and one ALK-negative cell lines (Figure 1B). BCL-2 protein levels were found to be very low in the three ALK-positive ALCL lines but were much more abundant in the ALK-negative FEPD cell line, suggesting an inverse correlation between the expression of ALK and BCL-2. We then monitored BCL-2 protein levels following treatment with the crizotinib compound for 24 h at the known plasmatic dose (500 nM) observed in patients^{46,47} (Figure 1C). Our data indicate that the abolition of ALK kinase activity (confirmed by the loss of NPM-ALK tyrosine phosphorylation) resulted in a consistent and highly reproducible increase in BCL-2 protein levels in ALK-positive cells, with no effect in ALK-negative cells. SiRNA-targeted silencing of ALK confirmed these results, producing the same ALK inhibition-dependent increase in BCL-2 levels (Figure S1). Altogether, these data support the existence of an ALK-dependent BCL-2 repression mechanism at work. Thus, treating ALK-positive ALCL with crizotinib impairs this mechanism and leads to the re-expression of the BCL-2 oncogene.

BCL-2 molecular depletion in addition to crizotinib treatment potentiates crizotinib-induced loss in cell viability without affecting the cell cycle

Next, we asked whether this crizotinib-mediated increase in BCL-2 expression could promote cancer cell survival despite treatment. We performed viability assays in control or BCL-2-depleted ALK-positive KARPAS-299 ALCL cells following crizotinib treatment. BCL-2 depletion (confirmed by western blotting; Figure S2) was achieved using either a targeted siRNA directed against BCL-2 mRNA, or miR-34a microRNA mimics, a well-established *BCL-2* gene silencing method and potential therapeutic tool^{42,43,48}. Of note, the silencing efficiency of miR-34a mimics was found to be significantly greater than that of siBCL-2 (Figure S2C). Viability assays showed that crizotinib treatment reduced viability by approximately 50% after 72 h of treatment (Figure 2A). However, although siRNA against BCL-2 had no effect on cell viability, combining it with crizotinib treatment significantly enhanced the effects of crizotinib, as only 20% cells remained viable after 72 h of combined treatment. More pronounced effects on cell viability were obtained with miR-34a mimics. Indeed, a sharp reduction in cell viability was observed even in the absence of crizotinib, but in combination with crizotinib only around 6% of cells were viable at the end of the treatment. Similar results were obtained using SU-DHL-1, another ALK-positive ALCL cell line (data not shown). We then explored whether the loss in cell viability involved a decrease in cellular growth, by analyzing the effects of BCL-2 silencing and/or crizotinib treatment on cell cycle regulation using flow cytometry (Figure 2B). A potent inhibition of cell proliferation was achieved after 24 h of 500 nM crizotinib treatment, as revealed by an increase in the number of cells in G1 phase (up to 75%) and a decrease in the number of cells in S phase (less than 9%) (Figure 2C). It is noteworthy that miR-34a mimics induced a significant inhibition of cell proliferation in untreated cells, mirroring what was observed in viability assays. However, in crizotinib-treated cells, neither siBCL-2 nor the miR-34a mimics had additional effects on proliferation, suggesting that the potentiating effects of siBCL-2 and miR-34a likely originate from a

cellular mechanism other than cell cycle arrest. Taken together, our data show that ALK-expressing ALCL cells are protected against the antitumoral effects of crizotinib through the induction of BCL-2 expression. Furthermore, they demonstrate that BCL-2 depletion in addition to crizotinib treatment potentiates the crizotinib-induced loss in cell viability by a cellular mechanism that is not linked to cell cycle arrest.

BCL-2 molecular depletion in addition to crizotinib treatment increases apoptotic cell death in ALK-positive ALCL

BCL-2 is mainly known for its anti-apoptotic functions, therefore we checked whether the decrease in cell viability in BCL-2-depleted cells following crizotinib treatment could be attributed to the induction of apoptotic cell death. We performed annexin V/propidium iodide staining and flow cytometry analysis to determine the proportion of cells undergoing apoptotic cell death in response to various treatments (Figure 3A). Our data show that crizotinib treatment (500 nM, 72 h) induced apoptosis, as reflected by a slight but significant increase in the number of annexin V-positive cells in cells that were transfected with scramble siRNA or negative control microRNA mimics (Figure 3B). The molecular depletion of BCL-2 triggered a marked induction of apoptotic cell death in crizotinib-treated cells (with ~34% and ~30% annexin V-positive cells in cells treated with crizotinib and siBCL-2 or miR34a mimics, respectively). Altogether, these data reveal that preventing BCL-2 re-expression upon crizotinib treatment consistently promoted apoptosis.

Molecular targeting of BCL-2 enhances crizotinib-triggered autophagic flux

Besides its role on apoptosis, BCL-2 is also a known inhibitor of autophagy, a process that had been described to promote cell death in many cancers following drug treatment^{28,49}. Since we recently showed that ALK inactivation induces autophagy in ALK-positive ALCL cell lines²², we investigated whether the autophagic flux induced in response to crizotinib treatment would be affected by blockade of crizotinib-triggered BCL-2 re-expression. To address this question, we generated a modified KARPAS-299 cell line stably transfected with a transgene encoding LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3), an early marker of autophagosomes^{26,50}, coupled to both mRFP and EGFP. The expression of this tandem fluorescently-tagged LC3 reporter protein enabled flow cytometric quantification or confocal microscopy-based analysis of autophagic flux (see Supplemental Methods and Figure S3). In accordance with our previous study²², we observed that crizotinib induced autophagic flux in a dose-dependent manner, as revealed by an increase in the number of cells that exhibited RFP/EGFP fluorescence ratios exceeding those corresponding to the reference “basal autophagy” state in untreated cells (Figure 4A). More importantly, and in keeping with the known function of BCL-2 in autophagy down-regulation³³, we observed that depleting BCL-2, using either siBCL-2 (Figure 4A and 4B) or miR-34a mimics (Figure 4A and 4C), strongly increased the percentage of cells with high RFP/EGFP ratios, indicative of a “high autophagy” state. We also noticed that even in the absence of crizotinib the molecular depletion of BCL-2 was sufficient to induce autophagic flux, indicating that the BCL-2 protein plays a critical role even in basal autophagy in ALK-positive ALCL. Altogether, these results highlight a key role for BCL-2 in restraining both basal and crizotinib-induced autophagic flux in ALK-positive ALCL.

The enhanced autophagic flux induced by BCL-2 molecular depletion and crizotinib treatment is associated with increased cell death

To elucidate whether this substantial increase in autophagic flux upon combined crizotinib treatment and BCL-2 depletion could be involved in the increased loss of viability observed under the same conditions, we followed the survival of cells in which the autophagic machinery was impaired through the molecular depletion of ULK1, a key initiator of the autophagic process. Similar to previous experiments, mRFP-EGFP-LC3 KARPAS-299 cells were transfected with siRNA directed against ULK1 mRNA (siULK1) and/or against BCL-2 mRNA (siBCL-2), in the presence or absence of crizotinib. We first verified that ULK1 molecular depletion had been effective at the protein level (Figure S4). Confocal microscopy analyses showed that strong red punctate pattern stainings were present in siBCL-2 panels (both in untreated and crizotinib-treated cells), reflecting a high autophagic flux (Figure 5A). It is noteworthy that yellow and red puncta were present under control conditions (untreated and siCTL), demonstrating the presence of basal autophagy in these cells. ULK1 depletion efficiently blocked the autophagic process, as revealed by a decrease in yellow and red punctate stainings (Figure 5A). Flow cytometry monitoring of autophagic flux confirmed these data, showing that the blockade of BCL-2 expression increased the number of cells exhibiting high autophagy in both untreated and crizotinib-treated cells (Figure 5B and Figure 5C). These flow cytometry data also confirmed that ULK1 depletion successfully blocked the autophagic machinery as it reduced basal autophagy levels (more than a 4-fold decrease) and restrained the crizotinib-triggered autophagic flux observed in BCL-2-depleted cells (2-fold decrease). Most interestingly, MTS viability assays showed that the effects of BCL-2 depletion in further reducing cell viability in crizotinib-treated cells was completely reversed by the molecular depletion of ULK1 (Figure 5D). These results strongly suggest that

BCL-2 depletion following crizotinib treatment reinforced autophagic flux, which turn to be deleterious for ALK-positive ALCL cells, and thereby led to a greater loss in viability under these conditions.

MiR-34a-mediated BCL-2 depletion potentiates the antitumoral effects of crizotinib in NOD/SCID mice xenografted with ALK-positive ALCL

Finally, we wondered whether the combination of BCL-2 molecular depletion and crizotinib treatment would have a significant therapeutic benefit *in vivo*. To address this question, NOD/SCID mice were xenografted with BCL-2-depleted or control KARPAS-299 cells. MiR-34a mimics were used for this depletion, since their ability to silence BCL-2 expression (Figure S2) and their potentiating effects on cell viability (Figure 2) had been found to be greater than those of siBCL-2 in our study. Crizotinib was administered per os for 22 days, during which time tumor growth was monitored (Figure 6A). On the day of sacrifice, tumors were weighed (Figure 6B) and samples were retrieved for immunohistochemistry analysis (Figure 6C). In accordance with the data collected *in vitro*, we observed that mice xenografted with BCL-2-depleted cells developed significantly smaller tumors than their BCL-2-expressing counterparts in the presence of crizotinib (Figure 6A and 6B). As seen in our *in vitro* viability assays, miR-34a-mediated BCL-2 depletion alone impaired tumor growth, albeit to a lesser extent than miR-34a/crizotinib in combination. Hematoxylin and eosin (HE) staining performed on samples excised from tumors treated with the miR-34a/crizotinib combination also exhibited hallmarks of higher cell fragility (Figure 6C). Immunohistochemistry analysis of the expression of the autophagy-related P62 protein showed a decrease in P62 staining in samples from tumors that had received either miR-34a mimics, crizotinib or a combination of the two, indicating higher autophagy in these cells. Immunohistochemistry analysis of LC3-B showed that whereas samples retrieved from miR-34a-transfected tumor cells or from

crizotinib-treated animals (single treatments) displayed a strong punctated LC3-B signal indicative of high autophagic activity, this was even greater following the miR-34a/crizotinib combination. This correlates with the *in vitro* observations of the higher levels and deleterious effects of autophagic flux in KARPAS-299 cells under equivalent conditions. In general, these data indicate that combining miR-34a-mediated BCL-2 depletion with crizotinib treatment results in a consistent potentiation of the drug's antitumoral efficiency *in vivo*, probably through the mechanisms previously identified *in vitro*, namely autophagic flux reinforcement.

DISCUSSION

Our study demonstrates that the expression of ALK and BCL-2, two major oncogenes, are inversely correlated in ALK-positive ALCL through an ALK-dependent BCL-2 repression mechanism. These data are consistent with and complete previous studies reporting a lack of BCL-2 protein expression in primary tissue samples of ALK-positive ALCL³⁷⁻³⁹ and low mRNA levels in the KARPAS-299 cell line⁴⁵. This observation in a cancerous environment seems paradoxical but is balanced by the fact that these tumor cells overexpress MCL-1, another oncogene of the BCL-2 family with anti-apoptotic functions similar to BCL-2^{38,39,45}. Unlike BCL-2, MCL-1 expression is positively regulated by NPM-ALK through a molecular mechanism that involves miR-29a, probably making the expression of BCL-2 redundant in ALK-positive ALCL cells⁵¹. In this context, the opposing regulation of MCL-1 and BCL-2 could be beneficial for ALK-positive cancer cells, since the re-expression of BCL-2 following targeted ALK inactivation should compensate for the loss of MCL-1 expression. Indeed, we demonstrate here that BCL-2 re-expression truly acts like an “oncogenic cut-out”, dampening the antitumoral efficiency of the crizotinib treatment.

Two molecular tools were used to reduce BCL-2 expression following crizotinib treatment: a specific BCL-2 siRNA and miR-34a mimics. Several studies have indeed reported BCL-2 to be a direct target of miR-34a, and functional analyses have indicated that an increased level of miR-34a reduces cell viability, induces apoptosis and potentiates antitumor drug-induced apoptosis and toxicity by inhibiting BCL-2 expression^{42,43}. We found that the use of miR-34a mimics potentiated crizotinib efficiency more than siBCL-2, perhaps due to a greater BCL-2 silencing effect. However this could also be connected to the intrinsic nature of miR-34a, which is known to be a key regulator of tumor suppression and is able to control the expression of multiple target genes such as *BCL-2*, *SIRT1*, *c-Myc*, *E2F*, *Cyclin D1* or

CDK6, which are involved in apoptosis, proliferation and the G1/S transition, respectively^{52,53}. This broad anti-oncogenic activity is a clear advantage for the treatment of multigenic diseases such as cancer and indeed miR-34a mimic delivery-based strategies are under development to combat cancer cells^{54,55}.

The strong loss in cell viability following the combined inactivation of ALK and BCL-2 was found to be not only due to an increase in apoptosis but also to a potent induction of autophagic flux. Thus, similar to what Xu et al. observed in a serum-starved neuroblastoma model⁵⁶, we show here that the pro-survival role of autophagy, previously described in crizotinib-treated ALK-positive cells, depends on BCL-2 expression status, and that a lack of BCL-2 enhances this flux to excessive levels, ultimately resulting in cell death. The contribution of this enhanced autophagy in potentiating cell death was evidenced by the fact that impairing the autophagic machinery (by the molecular targeting of ULK1) resulted in a complete reversal of the potent loss of cell viability in BCL2-depleted cells. Most importantly, our *in vivo* data further confirmed the strong autophagy induction in tumor tissues harvested from ALK-positive ALCL cells xenografted mice submitted to crizotinib and miR34a-mediated BCL2 depletion, which was associated with a remarkable impairment in subcutaneous tumors development. Altogether, our results highlight for the first time in ALK-positive ALCL that potentiating crizotinib-induced autophagy through BCL-2 depletion changes the function of autophagy, from a cell survival-promoting mechanism to a cell death-promoting process following the combined treatment of crizotinib and BCL-2 molecular targeting. It is noteworthy that some examples of switches from cytoprotective to cytotoxic autophagy have been reported in the literature for different cancers. Bristol et al. first demonstrated the switch from cytoprotective autophagy in breast tumor cells submitted to radiation alone, to cytotoxic autophagy in cells submitted to radiosensitization

and vitamin D3⁵⁷. However, other studies have shown that autophagy could rather prime tumoral cells for subsequent apoptosis or other forms of programmed cell death⁵⁸⁻⁶⁰. As an example, Laane et al. reported that glucocorticoid (GC)-induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells involved the initial activation of autophagy. They found that Beclin-1 knockdown inhibited both autophagy and subsequent apoptosis⁵⁸. In another study, Bonapace et al. also reported that autophagy-dependent necroptosis was able to overcome glucocorticoid resistance in T-ALL⁵⁹.

In ALK-positive ALCL, the question of whether the promotion of cell death upon ALK and BCL-2 downregulation involves cytotoxic autophagy or the activation of other cell death programs needs further investigation. Either way, our results provide strong evidence for a massive reduction in tumor cell viability following combined ALK and BCL-2 inactivation in ALK-positive ALCL, demonstrating that the molecular targeting of BCL-2 could widen the therapeutic options for these patients and potentially improve their outcomes by reducing the options for cancer cell escape routes.

Acknowledgments

This study was supported by grants from the INSERM and Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer (to S. Giuriato and E. Espinos), the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Program under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No 675712 (S. Giuriato and E. Espinos). A. Torossian was supported by a fellowship from the Université Paul Sabatier; J. Frentzel by the Ligue Nationale contre le Cancer; and C. Daugrois by the Labex TOUCAN/Laboratoire d'excellence Toulouse Cancer. The authors thank F. Capilla and C. Salon at the histology facility of INSERM/UPS-401 US006/CRFRE (Toulouse, France) and M. Farcé at the flow cytometry facility of CRCT/UMR1037/INSERM/Université Toulouse III-Paul Sabatier, ERL5294 CNRS (Toulouse, France) for their technical assistance. They also thank F. Meggetto (CRCT/INSERM/UMR1037) for helpful discussion concerning the *in vivo* part of the study, G. Mitou (CRCT/INSERM/UMR1037) for her help in the first steps of establishing the mRFP-EGFP-LC3 KARPAS cells, and C. Philippe (CRCT/INSERM/UMR1037/Université Toulouse III-Paul Sabatier) for her help with cell cycle flow cytometry analyses. English proofreading was performed by Scientific Scripts (<http://scientificscripts.com>).

Authorship

Contribution: S.Giuriato. and E.E. designed the study, analyzed the data and wrote the manuscript; A.T, J.F., C.D, N.B. and S.Gandarillas conducted experiments; T.A.S analyzed data; L.L and P.B. provided primary samples. All authors approved of the final manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Estelle Espinos, Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse (CRCT), 2 Avenue Hubert Curien, Oncopôle Entrée C, CS 53717, 31037 Toulouse CEDEX 1, France. Phone: +33(0)582741667 E-mail: Estelle.espinos@inserm.fr

REFERENCES

1. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, et al. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011;117(19):5019–32.
2. Falini B, Martelli MP. Anaplastic large cell lymphoma: changes in the World Health Organization classification and perspectives for targeted therapy. *Haematologica*. 2009;94(7):897–900.
3. Turner SD, Lamant L, Kenner L, Brugières L. Anaplastic large cell lymphoma in paediatric and young adult patients. *Br. J. Haematol*. 2016;173(4):560–572.
4. Hallberg B, Palmer RH. Mechanistic insight into ALK receptor tyrosine kinase in human cancer biology. *Nat. Rev. Cancer*. 2013;13(10):685–700.
5. Ferreri AJM, Govi S, Pileri SA, Savage KJ. Anaplastic large cell lymphoma, ALK-positive. *Crit. Rev. Oncol. Hematol*. 2012;83(2):293–302.
6. Pearson JD, Lee JKH, Bacani JTC, Lai R, Ingham RJ. NPM-ALK: The Prototypic Member of a Family of Oncogenic Fusion Tyrosine Kinases. *J. Signal Transduct*. 2012;2012:123253.
7. Lai R, Ingham RJ. The pathobiology of the oncogenic tyrosine kinase NPM-ALK: a brief update. *Ther. Adv. Hematol*. 2013;4(2):119–31.
8. Roskoski R. Anaplastic lymphoma kinase (ALK): Structure, oncogenic activation, and pharmacological inhibition. *Pharmacol. Res*. 2013;68(1):68–94.
9. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, et al. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*. 1994;263(5151):1281–4.
10. Gorczyński A, Prełowska M, Adam P, Czapiewski P, Biernat W. ALK-positive cancer: still a growing entity. *Future Oncol*. 2014;10(2):305–21.
11. Jacobsen E. Anaplastic Large-Cell Lymphoma, T-/Null-Cell Type. *Oncologist*. 2006;11(7):831–840.
12. Ferreri AJM, Govi S, Pileri SA, Savage KJ. Anaplastic large cell lymphoma, ALK-negative. *Crit. Rev. Oncol. Hematol*. 2013;85(2):206–15.
13. Christensen JG, Zou HY, Arango ME, et al. Cytoreductive antitumor activity of PF-2341066, a novel inhibitor of anaplastic lymphoma kinase and c-Met, in experimental models of anaplastic large-cell lymphoma. *Mol. Cancer Ther*. 2007;6(12):3314–3322.
14. Kruczynski A, Delsol G, Laurent C, Brousset P, Lamant L. Anaplastic lymphoma kinase as a therapeutic target. *Expert Opin. Ther. Targets*. 2012;16(11):1127–1138.
15. Camidge DR, Doebele RC. Treating ALK-positive lung cancer—early successes and future challenges. *Nat. Rev. Clin. Oncol*. 2012;9(5):268–277.
16. Mologni L. Inhibitors of the anaplastic lymphoma kinase. *Expert Opin. Investig. Drugs*. 2012;21(7):985–94.
17. Gambacorti Passerini C, Farina F, Stasia A, et al. Crizotinib in Advanced, Chemoresistant Anaplastic Lymphoma Kinase-Positive Lymphoma Patients. *JNCI J. Natl. Cancer Inst*. 2014;106(2):djt378-djt378.

18. Choi YL, Soda M, Yamashita Y, et al. EML4-ALK Mutations in Lung Cancer That Confer Resistance to ALK Inhibitors. *N. Engl. J. Med.* 2010;363(18):1734–1739.
19. Sahu A, Prabhash K, Noronha V, Joshi A, Desai S. Crizotinib: A comprehensive review. *South Asian J. cancer.* 2013;2(2):91–7.
20. Katayama R, Shaw AT, Khan TM, et al. Mechanisms of Acquired Crizotinib Resistance in ALK-Rearranged Lung Cancers. *Sci. Transl. Med.* 2012;4(120):120ra17-120ra17.
21. Ji C, Zhang L, Cheng Y, et al. Induction of autophagy contributes to crizotinib resistance in ALK-positive lung cancer. *Cancer Biol. Ther.* 2014;15(5):570–577.
22. Mitou G, Frentzel J, Desquesnes A, et al. Targeting autophagy enhances the anti-tumoral action of crizotinib in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Oncotarget.* 2015;6(30):30149–64.
23. Aveic S, Pantile M, Seydel A, et al. Combating autophagy is a strategy to increase cytotoxic effects of novel ALK inhibitor entrectinib in neuroblastoma cells. *Oncotarget.* 2016;7(5):5646–63.
24. Puissant A, Robert G, Auberger P. Targeting autophagy to fight hematopoietic malignancies. *Cell Cycle.* 2010;9(17):3470–3478.
25. Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev. Cell.* 2004;6(4):463–77.
26. Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy.* 2012;8(4):445.
27. Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2011;27(1):107–32.
28. White E, DiPaola RS. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin. Cancer Res.* 2009;15(17):5308–16.
29. Rosenfeldt MT, Ryan KM. The role of autophagy in tumour development and cancer therapy. *Expert Rev. Mol. Med.* 2009;11:e36.
30. Puissant A, Robert G, Fenouille N, et al. Resveratrol promotes autophagic cell death in chronic myelogenous leukemia cells via JNK-mediated p62/SQSTM1 expression and AMPK activation. *Cancer Res.* 2010;70(3):1042–52.
31. Giansanti V, Torriglia A, Scovassi AI. Conversation between apoptosis and autophagy: “Is it your turn or mine?”. *Apoptosis.* 2011;16(4):321–33.
32. Fitzwalter BE, Thorburn A. Recent insights into cell death and autophagy. *FEBS J.* 2015;282(22):4279–4288.
33. Pattingre S, Tassa A, Qu X, et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell.* 2005;122(6):927–39.
34. Marquez RT, Xu L. Bcl-2:Beclin 1 complex: multiple, mechanisms regulating autophagy/apoptosis toggle switch. *Am. J. Cancer Res.* 2012;2(2):214–21.
35. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene.* 2007;26(9):1324–37.
36. Yip KW, Reed JC. Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene.* 2008;27(50):6398–406.
37. Villalva C, Bougrine F, Delsol G, et al. Bcl-2 expression in anaplastic large cell

- lymphoma. *Am. J. Pathol.* 2001;158(5):1889–90.
38. Rassidakis GZ, Sarris AH, Herling M, et al. Differential Expression of BCL-2 Family Proteins in ALK-Positive and ALK-Negative Anaplastic Large Cell Lymphoma of T/Null-Cell Lineage. *Am. J. Pathol.* 2001;159(2):527–535.
 39. Rassidakis GZ, Jones D, Lai R, et al. BCL-2 family proteins in peripheral T-cell lymphomas: correlation with tumour apoptosis and proliferation. *J. Pathol.* 2003;200(2):240–248.
 40. Pattingre S, Levine B. Bcl-2 inhibition of autophagy: a new route to cancer? *Cancer Res.* 2006;66(6):2885–8.
 41. Cang S, Iragavarapu C, Savooji J, Song Y, Liu D. ABT-199 (venetoclax) and BCL-2 inhibitors in clinical development. *J. Hematol. Oncol.* 2015;8:129.
 42. Li L, Yuan L, Luo J, et al. MiR-34a inhibits proliferation and migration of breast cancer through down-regulation of Bcl-2 and SIRT1. *Clin. Exp. Med.* 2013;13(2):109–117.
 43. Yang F, Li Q, Gong Z, et al. MicroRNA-34a Targets Bcl-2 and Sensitizes Human Hepatocellular Carcinoma Cells to Sorafenib Treatment. *Technol. Cancer Res. Treat.* 2013;13(1):77–86.
 44. Lamant L, Espinos E, Duplantier M, et al. Establishment of a novel anaplastic large-cell lymphoma-cell line (COST) from a “small-cell variant” of ALCL. *Leukemia.* 2004;18(10):1693–8.
 45. Rust R. High expression of Mcl-1 in ALK positive and negative anaplastic large cell lymphoma. *J. Clin. Pathol.* 2005;58(5):520–524.
 46. Sang J, Acquaviva J, Friedland JC, et al. Targeted inhibition of the molecular chaperone Hsp90 overcomes ALK inhibitor resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer Discov.* 2013;3(4):430–43.
 47. Lovly CM, Heuckmann JM, de Stanchina E, et al. Insights into ALK-Driven Cancers Revealed through Development of Novel ALK Tyrosine Kinase Inhibitors. *Cancer Res.* 2011;71(14):4920–4931.
 48. Di Martino MT, Leone E, Amodio N, et al. Synthetic miR-34a Mimics as a Novel Therapeutic Agent for Multiple Myeloma: In Vitro and In Vivo Evidence. *Clin. Cancer Res.* 2012;18(22):6260–6270.
 49. Fulda S, Kögel D. Cell death by autophagy: emerging molecular mechanisms and implications for cancer therapy. *Oncogene.* 2015;34(40):5105–5113.
 50. Rubinsztein DC, Shpilka T, Elazar Z. Mechanisms of Autophagosome Biogenesis. *Curr. Biol.* 2012;22(1):R29–R34.
 51. Desjobert C, Renalier M-H, Bergalet J, et al. MiR-29a down-regulation in ALK-positive anaplastic large cell lymphomas contributes to apoptosis blockade through MCL-1 overexpression. *Blood.* 2011;117(24):6627–37.
 52. Hermeking H. The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death Differ.* 2010;17(2):193–199.
 53. Misso G, Di Martino MT, De Rosa G, et al. Mir-34: a new weapon against cancer? *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 2014;3(9):e194.

54. Craig VJ, Tzankov A, Flori M, et al. Systemic microRNA-34a delivery induces apoptosis and abrogates growth of diffuse large B-cell lymphoma in vivo. *Leukemia*. 2012;26(11):2421–2424.
55. Scognamiglio I, Di Martino MT, Campani V, et al. Transferrin-conjugated SNALPs encapsulating 2'-O-methylated miR-34a for the treatment of multiple myeloma. *Biomed Res. Int.* 2014;2014:217365.
56. Xu H-D, Wu D, Gu J-H, et al. The pro-survival role of autophagy depends on Bcl-2 under nutrition stress conditions. *PLoS One*. 2013;8(5):e63232.
57. Bristol ML, Di X, Beckman MJ, et al. Dual functions of autophagy in the response of breast tumor cells to radiation: cytoprotective autophagy with radiation alone and cytotoxic autophagy in radiosensitization by vitamin D 3. *Autophagy*. 2012;8(5):739–53.
58. Laane E, Tamm KP, Buentke E, et al. Cell death induced by dexamethasone in lymphoid leukemia is mediated through initiation of autophagy. *Cell Death Differ.* 2009;16(7):1018–29.
59. Bonapace L, Bornhauser BC, Schmitz M, et al. Induction of autophagy-dependent necroptosis is required for childhood acute lymphoblastic leukemia cells to overcome glucocorticoid resistance. *J. Clin. Invest.* 2010;120(4):1310–1323.
60. Ginet V, Puyal J, Rummel C, et al. A critical role of autophagy in antileukemia/lymphoma effects of APO866, an inhibitor of NAD biosynthesis. *Autophagy*. 2014;10(4):603–17.

Figure 1. BCL-2 expression correlates with ALK status. (A) RT-qPCR analysis of *BCL-2* mRNA levels in 48 samples from patients diagnosed with ALK-positive ALCL compared to *BCL-2* mRNA levels in 11 reactive lymph nodes (RLN). Expression is shown as $-\Delta Ct$ values, using *MLN51* and *TBP* mRNA as internal controls. Data represent the means \pm SEM (** $P < 0.001$, Wilcoxon test). (B) Western blot showing NPM-ALK and BCL-2 protein levels in ALK-positive and ALK-negative ALCL cell lines. β -actin served as the internal control to ensure equal loading. (C) Western blot showing phospho-NPM-ALK, total ALK and BCL-2 levels in ALK-positive and ALK-negative ALCL cells following 24 h treatment with crizotinib (500 nM). β -actin served as the internal control. BCL-2/ β -actin signal ratios were quantified using ImageJ; this ratio was set to 1 for the untreated condition for each cell line.

Figure 2. BCL-2 molecular depletion in addition to crizotinib treatment potentiates crizotinib-induced loss in cell viability without affecting the cell cycle. (A) MTS colorimetric measurement of cell viability. Twenty-four hours after the transfection of the BCL-2-targeting interfering RNAs siBCL-2 or microRNA miR-34a mimics, or their corresponding negative controls (siCTL or miR-Neg), ALK-positive ALCL cells were treated (or not) with crizotinib (500 nM) for 72 h and cell viability was assessed. Data represent the means \pm SEM of three independent experiments. Statistical analysis was performed by an unpaired 1-tailed Student's t test; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). (B) Flow cytometry analysis of the cell cycle in ALK-positive KARPAS-299 cells following the molecular depletion of BCL-2 and crizotinib treatment. ALK-positive ALCL cells were transfected with either negative controls (siCTL and miR-Neg) or with siBCL-2 or miR-34a microRNA mimics and then 24 h later were treated with crizotinib (500 nM) for 72 h. (C) Graph representing the mean percentage of

cells in sub-G1, G1, S and G2/M phases for the above-mentioned ALK-positive ALCL cells. Data represent means \pm SEM from 5 independent experiments. Statistical analysis was performed by a Student's t test; ***P<0.001.

Figure 3. BCL-2 molecular depletion in addition to crizotinib treatment increases apoptotic cell death in ALK-positive ALCL. (A) Flow cytometry analysis of annexin V-positive KARPAS-299 cells following the molecular depletion of BCL-2 and crizotinib treatment. ALK-positive ALCL cells were transfected with either negative controls (siCTL and miR-Neg) or with siBCL-2 or miR-34a mimics and then 24 h later were treated with crizotinib (500 nM) for 72 h. Apoptotic cell death was monitored by annexin V and propidium iodide (PI) staining at the end of the treatments. (B) Graphs representing the mean percentage of annexin V-positive cells from 6 independent experiments \pm SEM. Statistical analysis was performed by a Student's t test; *P<0.05; ***P<0.001.

Figure 4. Molecular targeting of BCL-2 enhances crizotinib-triggered autophagic flux. (A) Flow cytometry analysis of autophagic flux following the molecular depletion of BCL-2 and crizotinib treatment in KARPAS-299 cells expressing a tandem fluorescently-tagged LC3 reporter protein. mRFP-EGFP-LC3 KARPAS-299 cells (described in the Supplemental Methods) were transfected with either negative controls (siCTL and miR-Neg) or with siBCL-2 or miR-34a mimics. 48 h later, transfected cells were treated or not with 500 nM crizotinib for a further 24 h. Induction of autophagic flux was analyzed by monitoring the mRFP/EGFP fluorescence ratio in individual cells. Cells were sorted based on their relative mRFP and GFP fluorescence ratios into populations of high (induced) and low (basal) autophagic flux. Representative data are shown from n=5 (siBCL-2) or n=3 (miR-34a mimics) independent

experiments. (B) Histograms representing the mean percentage of cells with an mRFP/EGFP ratio reflective of high autophagy flux, from n=5 (siBCL-2) or n=3 (miR-34a microRNA mimics) independent experiments \pm SEM. Statistical analysis was performed by a Student's t test; *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

Figure 5. The enhanced autophagic flux induced by BCL-2 molecular depletion and crizotinib treatment is associated with increased cell death. (A) Confocal microscopy analysis of autophagic flux following the molecular depletion of ULK1 either alone or in combination with BCL-2, combined with crizotinib treatment. mRFP-EGFP-LC3 KARPAS-299 cells were transfected with either negative control (siCTL) or with siBCL-2 or siULK1. 48 h later, transfected cells were treated or not with crizotinib (200 nM) for a further 24 h. (B) Flow cytometry analysis of autophagic flux in the same above-mentioned cells. Data represent the mean percentage of cells with high autophagy \pm SEM, from 3 independent experiments. Statistical analysis was performed by a Student's t test; *P<0.05; **P<0.01. (C) MTS colorimetric measurements of cell viability. After transfection of cells with negative control siCTL, siULK1, siBCL-2 or siULK1 and siBCL-2 for 24 h, cells were treated (or not) with crizotinib (200 nM) for a further 72 h and cell viability was assessed. Data represent the means \pm SEM of three independent experiments (statistical comparisons were performed by a Student's t test; *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001).

Figure 6. Molecular BCL-2 depletion potentiates the crizotinib antitumoral effects in NOD/SCID mice xenografted with ALK-positive ALCL and is associated with cell fragility and high autophagy hallmarks. (A) ALK-positive KARPAS-299 cells were transfected either with miR-Neg or miR-34a. These were respectively injected subcutaneously into the left or right

flank of 16 NOD/SCID mice. 8 of these mice were orally treated with crizotinib (2.5 mg/kg) for 22 days, while the remaining 8 received vehicle (n=8). Tumor volume was evaluated over time by caliper measurements and is reported as means \pm SEM. Statistical analysis was performed by 2-way ANOVA with Bonferroni correction ; ****P<0.0001. (B) Tumor weight of representative tumors resected from mice xenografted with miR-Neg and miR-34a cells that received either vehicle or crizotinib treatment (scale is in cm). (C) Micrographs showing hematoxylin and eosin (HE), anti-LC3 and anti-P62 staining of excised tumors from NOD-SCID mice xenografted with Karpas-299 cells transfected with miR-Neg or miR-34a microRNA mimics, that additionally received either vehicle or crizotinib treatment (scale bars: 5000 μ m, inset 50 μ m). Arrows indicate cells with phenotypic hallmarks of nuclear piknosis and general cellular fragility.

Figure 7. Proposed model of the crizotinib/NPM-ALK/BCL-2 escape loop in ALK-positive ALCL. (A) In ALK-positive ALCL, ALK activity is responsible for silencing BCL-2 expression. (B) Strategies based on the inhibition of ALK activity, such as crizotinib treatment, impair this silencing mechanism. This leads to an elevation of BCL-2 protein expression which, in turn, limits apoptotic cell death induction and affords cytoprotective properties of the autophagic response triggered by the drug. (C) Blocking crizotinib-induced BCL-2 elevation results in a potentiation of the drug's antitumoral efficiency through both the induction of apoptotic cell-death and the reinforcement of the autophagic flux, ultimately leading to massive cell death.

FIGURE 1

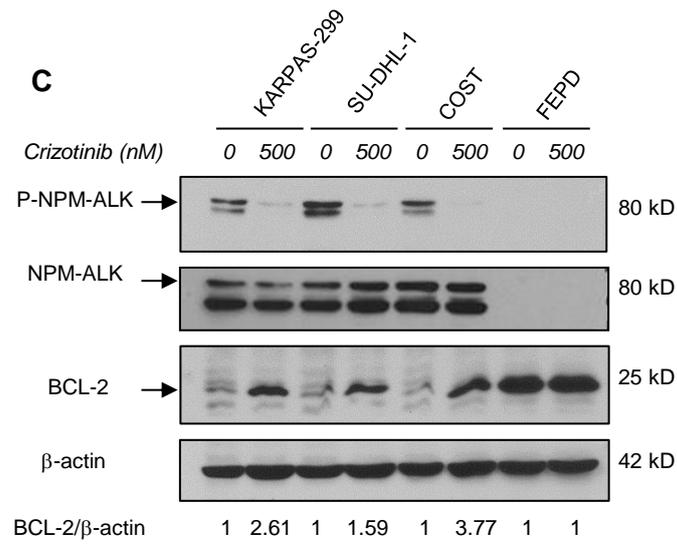
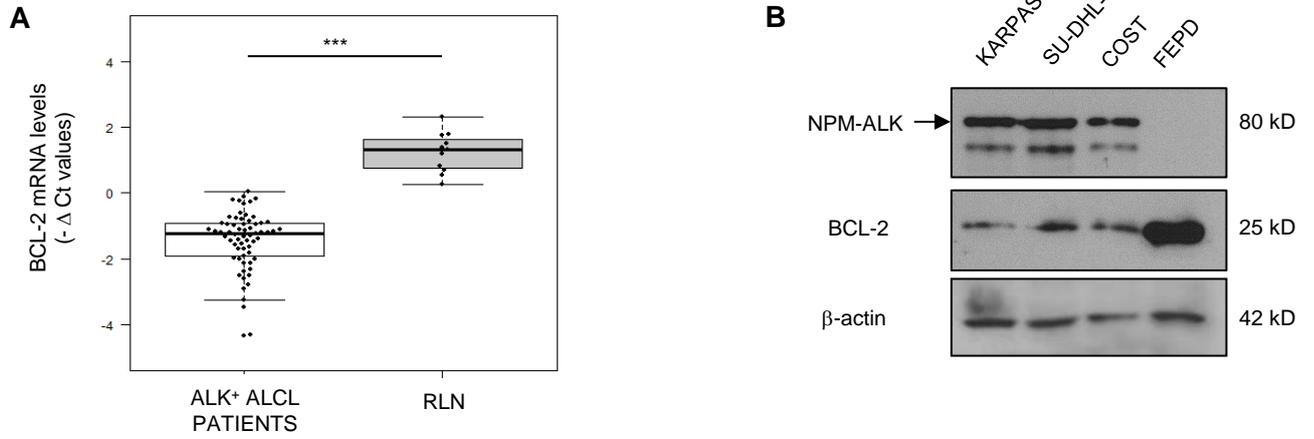


FIGURE 2

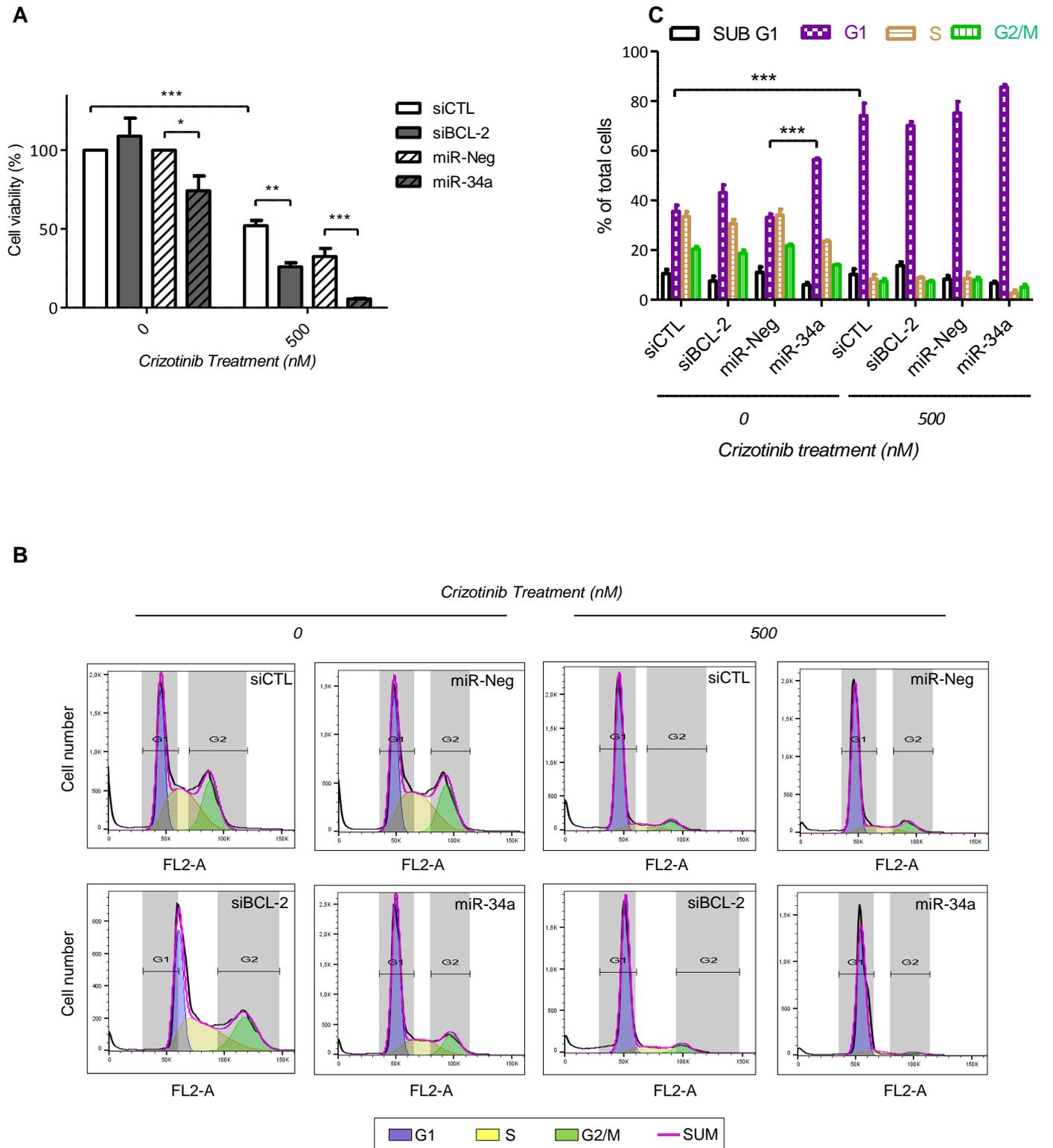
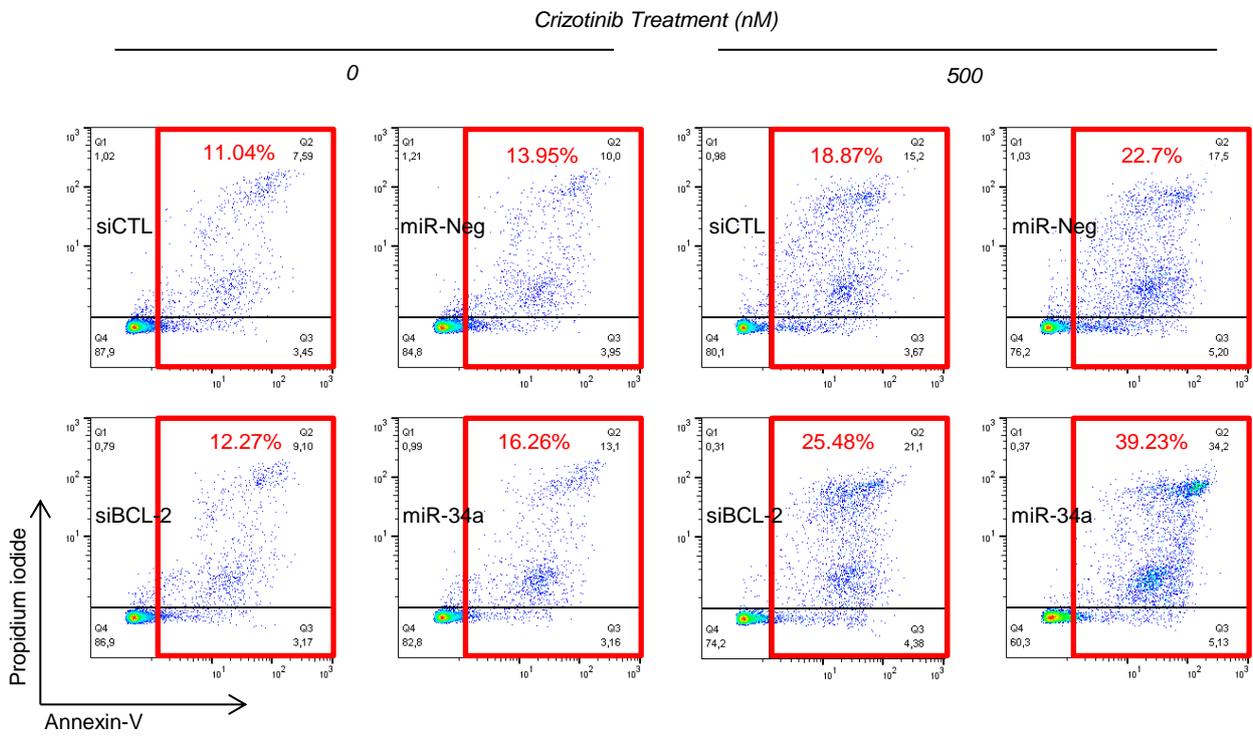


FIGURE 3

A



B

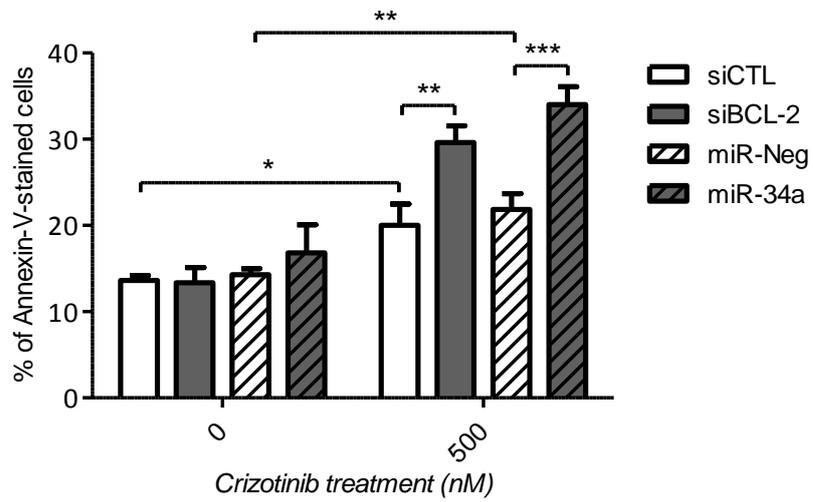
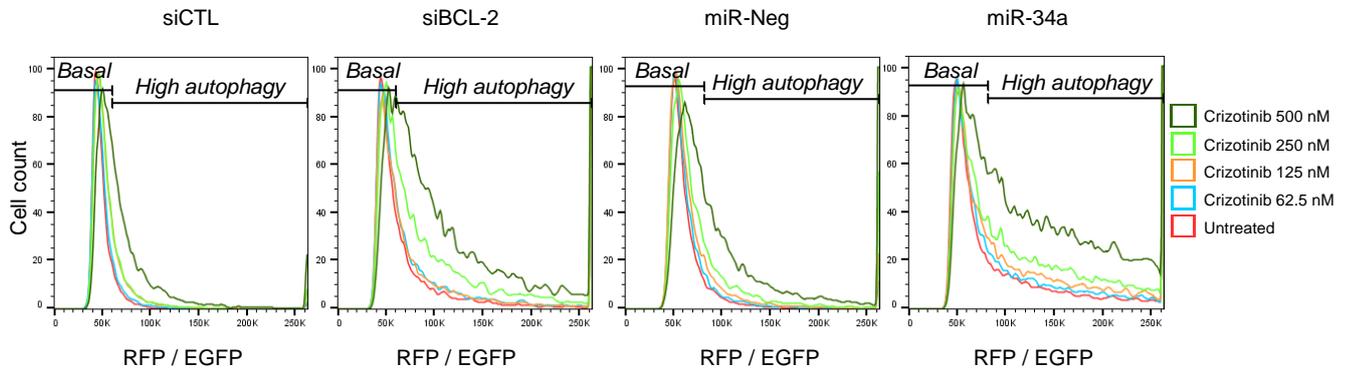
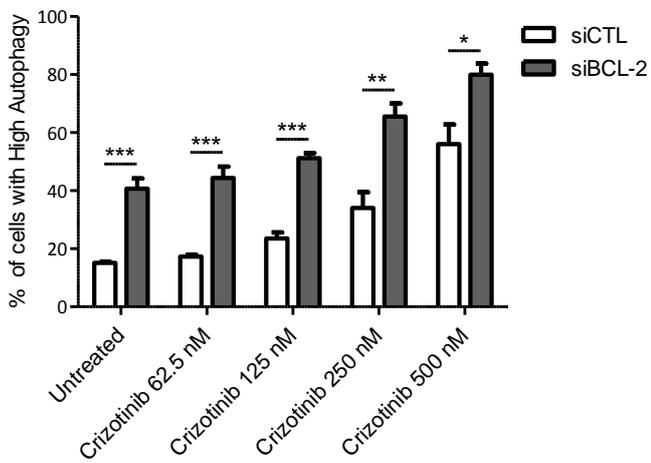


FIGURE 4

A



B



C

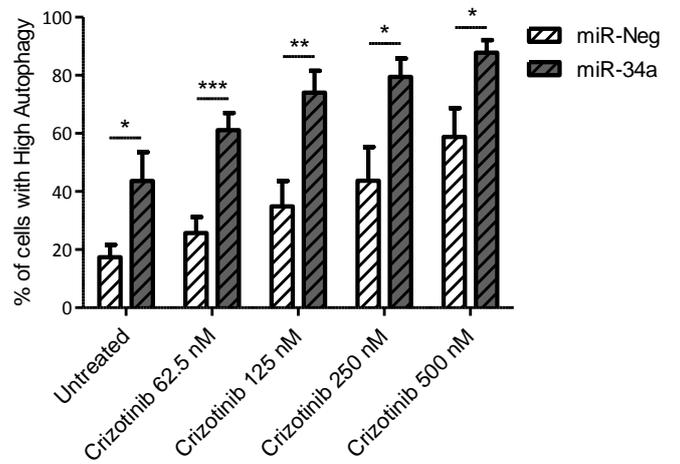
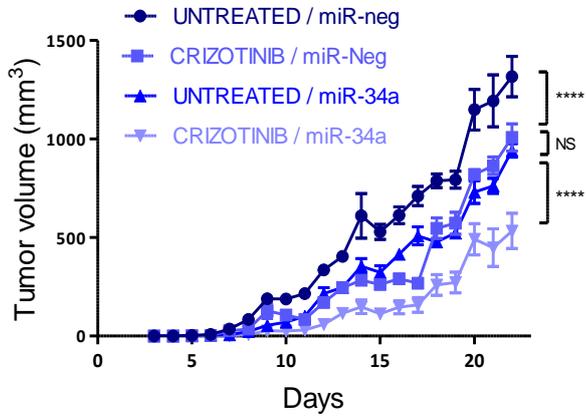
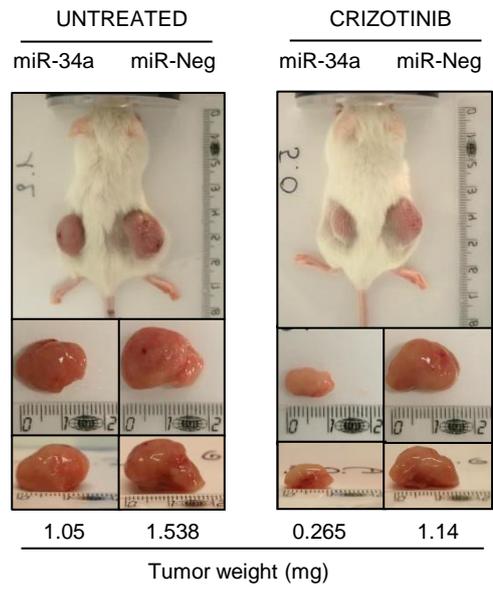


FIGURE 6

A



B



C

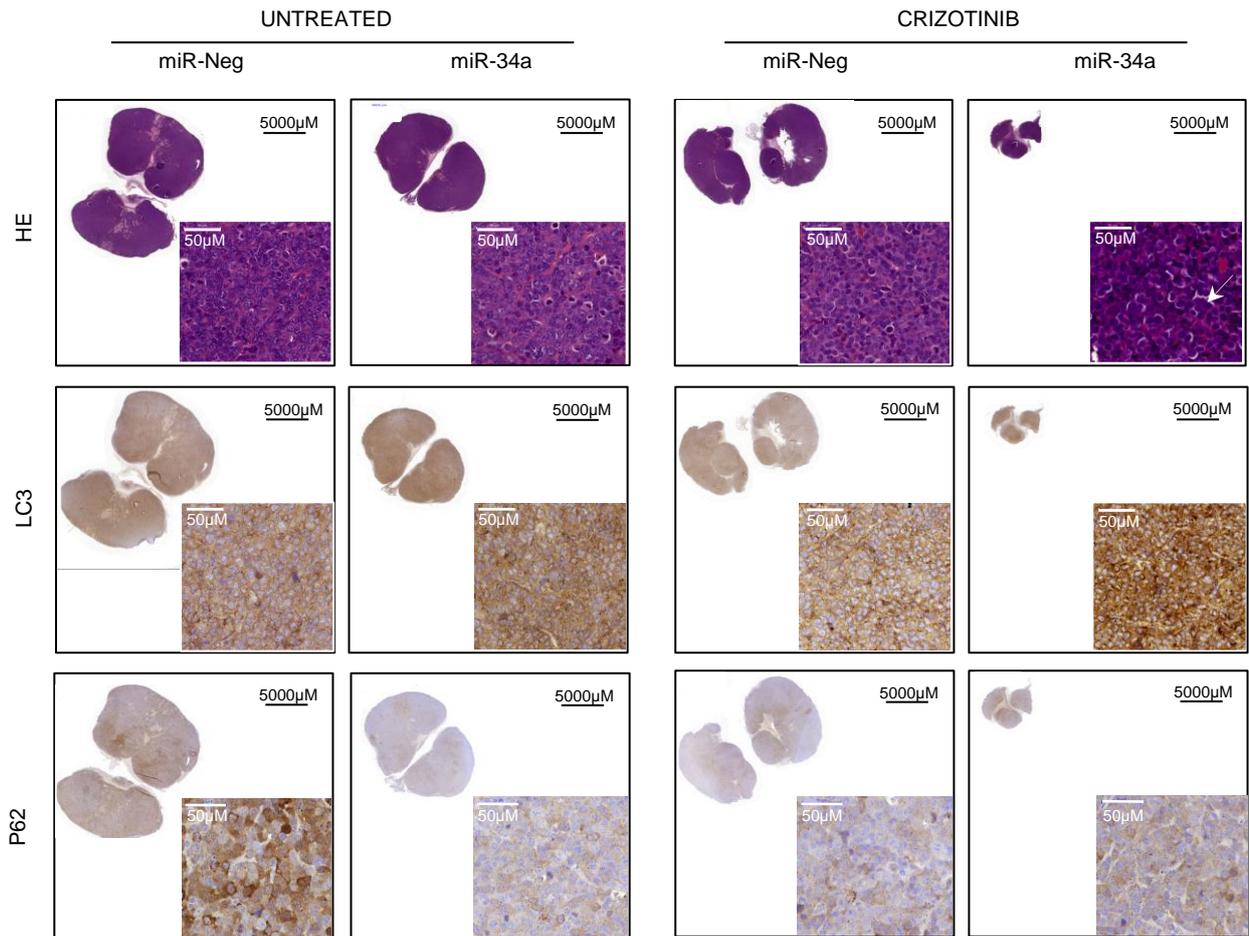
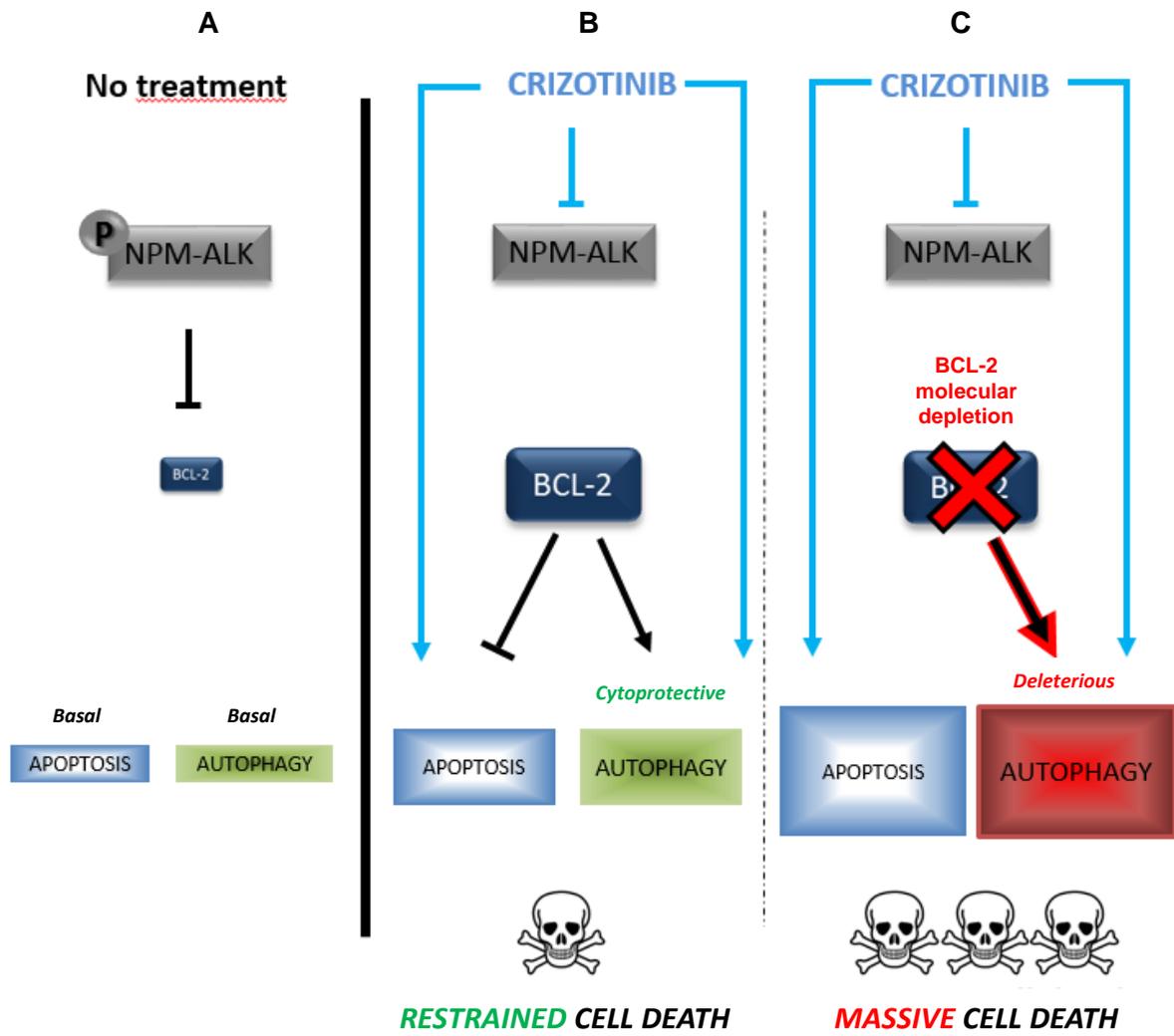


FIGURE 7



Blockade of crizotinib-induced BCL-2 elevation in ALK-positive ALCL triggers autophagy associated with cell death

Avédis Torossian¹⁻³, Julie Frentzel¹⁻³, Camille Daugrois^{1-3,8}, Nicolas Broin¹, Sarah Gandarillas⁴, Talal Al Saati⁵, Laurence Lamant^{1-3,6-8}, Pierre Brousset^{1-3,6-8}, Sylvie Giuriato^{1-3,7,9} and Estelle Espinos^{1-3,7}

Supplemental Data

Supplemental Methods

RNA purification

Total RNA extraction was performed from 40 frozen sections of tumor biopsies using the TRIzol® total RNA isolation reagent (Invitrogen, San Diego, USA), following the manufacturer's protocol. RNA integrity was evaluated using an RNA 6000 Nano Chip kit (Agilent 2100 Bioanalyzer). RNA concentration was quantified using a NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA).

cDNA synthesis

One µg of total RNA was reverse transcribed in 20 µl using the Superscript II reverse transcription kit (Invitrogen) and random hexamers (Roche), according to the manufacturer's protocol. Reverse transcription (RT) reactions were diluted 10-fold prior to qPCR.

Quantitative PCR (qPCR)

qPCR amplifications were performed using the StepOne Plus devices (Applied Biosystems, Life Technologies), according to the manufacturer's instructions. All qPCR assays were performed

in duplicate. Data analysis was performed with the StepOne Software (v2.2.2). The mean expression of *MLN51* and *TBP*, selected as the best housekeeping genes using Genorm[®] and Normfinder[®] with the R package *NormqPCR*, were used as normalization factors to calculate the ΔCq values as follows: [$\Delta Cq_{BCL-2} = \text{mean duplicate } Cq_{BCL-2} - \text{mean duplicate } (Cq_{MLN51}, Cq_{TBP})$]. The $-\Delta Cq$ values were used for boxplot (*Beeswarm* package³⁸) generation using the R software (version 3.1.2).

miRNA and siRNA transfections

Transfections were performed by electroporation using Gene Pulser Xcell Electroporation Systems (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Briefly $5 \cdot 10^6$ cells were electroporated at 950 μF and 250 V in 400 μl serum-free IMDM medium with 100 nM siRNA or miRNA-mimics from a 100 μM stock solution or with the same quantity of negative controls (the siRNA negative control was purchased from Eurogentec and miR-CTL/4464058 was purchased from Ambion, ThermoFisher). The siRNA sequences used were 5'-GGGCGAGCUACUAUAGAAATT-3' for ALK, 5'-GCUGCACCUGACGCCCUUCTT-3' for BCL-2 and the siGENOME ULK1 siRNA (D-005049-01-0005, Dharmacon) for ULK1. The miRNA mimic used was mirVana miRNA mimic hsa-miR-34a-5p (MC22030) for miR-34a (Ambion, ThermoFisher). Following shock, cells were rapidly resuspended in 5 ml IMDM supplemented with 15% FCS, before being used for protein extraction, flow cytometry and viability/proliferation assays.

Protein extraction and western blot analysis

Cells were incubated for 10 min on ice in RIPA-buffer (20 mM Tris HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 4 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, and 0.2% SDS) supplemented with protease and phosphatase

inhibitors (2 mM Na₃VO₄, 20 mM NaF and 1 mM PMSF, purchased from Sigma-Aldrich; complete protease inhibitor cocktail tablets were purchased from Roche Applied Science). The cells were then subjected to 2 pulses of sonication (10 s each separated by a 30 s incubation on ice) using a Bioblock Vibra-cell 72446 apparatus at 40% of its power (Bioblock, San Diego, California). Insoluble material was eliminated by centrifugation (10 min at 10 000 g, 4°C). The total protein concentration of cell lysates was determined using a Bradford assay. Protein lysates (30 µg) were then fractionated by SDS-PAGE (10%), and transferred to a nitrocellulose membrane (Whatman) (GE Healthcare, Little Chalfont, England). Western-blotting was performed using antibodies against BCL-2 (Santa-Cruz, C2, sc-7382), ALK (D5F3 XP, Cell Signaling Technology #3633), P-ALK (Y1604, Cell Signaling Technology, cs3341), β-actin (Santa Cruz #7210) and ULK1 (Cell Signaling Technology, R600, #4773). Proteins were visualized using the Chemiluminescent Peroxidase Substrate-3 Kit (Sigma-Aldrich, France) or the ECL™ Clarity (Bio-Rad).

Cell cycle analysis using propidium iodide incorporation and flow cytometry

150 000 cells (per condition) were washed twice with PBS and fixed overnight at -20°C in 70% ethanol. Cells were then washed twice with PBS (0.1% BSA) and once with PBS only, before a 30 min incubation with 30 µg/ml propidium iodide (Invitrogen, ThermoFisher) and 500 µg/ml RNase A (Sigma-Aldrich). Thereafter, cells were analyzed with a flow cytometer MACSQuant VYB (Miltenyi Biotec, Santa Barbara, USA). Cell cycle analysis was performed with the FlowJo software (v.10), using the Dean Jett Fox model.

Generation of KARPAS-299 cells expressing a tandem fluorescent-tagged LC3 reporter protein

To generate stable mRFP-EGFP-LC3-expressing KARPAS-299 cells, 5×10^6 exponentially growing cells were transfected with 5 μ g of mRFP-EGFP-LC3 plasmid (kindly provided by Prof Tamotsu Yoshimori, Ozaka, Japan) by electroporation at 250 V and 950 μ F using the Gene Pulser II Electroporation System (BioRad, Hercules, California). Stable transformants were selected in complete medium containing increasing concentrations of G418 (Sigma Aldrich), from 0.5 mg/mL to 1.2 mg/mL. For sensitivity and consistency, single cell sorting for RFP and EGFP double-positive cells was performed to isolate individual clones. The use of this RFP-EGFP tandem fluorescent-tagged LC3 reporter protein for autophagic flux quantification (dynamics of autophagosome-lysosome fusion) takes advantage of the higher sensitivity of EGFP fluorescence to the acidic environment of the autolysosome relative to that of RFP. Autophagosomes labeled by this reporter protein exhibit both RFP and EGFP signals (yellow puncta in confocal analysis). However, after fusion with lysosomes, their EGFP signals are attenuated whereas the RFP signals remain, producing red puncta¹. Thus, cells with higher flux are less green due to the fusion of autophagosomes with lysosomes, increasing the RFP/EGFP ratio as measured by flow cytometry quantification². One clone, called mRFP-EGFP-LC3 KARPAS-299, was selected and further tested for its ability to detect and quantify the crizotinib-induced autophagic process that was previously described in KARPAS-299 ALK-positive ALCL³. In keeping with these former data that reported an accumulation of the LC3-II form following a kinetics of crizotinib treatment (see Figure 2E in Mitou et al. ³), we observed here an increase in the number of cells that exhibited high RFP/EGFP fluorescence ratios over time (Figure S3A). Moreover, we also noticed that both yellow (autophagosome) and red (autolysosome) puncta were present in the upper left panel (untreated cells that exhibited basal autophagy) whereas most puncta in the lower and right panels (cells that exhibited crizotinib-induced autophagic flux) were red (Figure S3B).

Murine xenograft model

Mice were housed under specific pathogen-free conditions in an animal room at a constant temperature (20–22°C), with a 12 h/12 h light/dark cycle and free access to food and water. All animal procedures were performed following the principle guidelines of INSERM, and our protocol was approved by the Midi-Pyrénées Ethics Committee on Animal Experimentation. A total of $4 \cdot 10^6$ KARPAS-299 cells were injected subcutaneously into both flanks of 6-week old female non-obese diabetic-severe combined immunodeficient (NOD-SCID) mice (Janvier Labs (Laval, France). Mouse body weight and tumor volumes were measured every day with calipers, using the formula “length \times width² \times $\pi/6$ ”. Mice were treated 5 times per week (Monday through Friday) once the tumor volume reached 100 mm³, by receiving crizotinib (2.5 mg/kg) or H₂O orally. At the end of the experiment, mice were humanely sacrificed. Subcutaneous tumors and adjacent inguinal lymph nodes were harvested and sections were fixed in 10% neutral buffered formalin for immunohistochemical analysis.

Immunohistochemistry

Sections from formalin-fixed and paraffin-embedded xenografted tumors were stained with hematoxylin and eosin. Immunohistochemical analysis was performed using antibodies directed against BCL-2 (mouse mAb, M0887, dilution 1/100, DAKO) and LC3b (mouse mAb, 0231-100/LC3-5F10, dilution 1/100, Nanotools). Antibody binding was detected with the streptavidin-biotin-peroxidase complex method (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Pictures were taken using either a Leica DM4000B microscope (Wetzlar, Germany) or a Panoramic 250 device (3DHISTECH, Budapest, Hungary).

REFERENCES

- 1 Kimura S, Noda T, Yoshimori T. Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. *Autophagy* 2007; **3**.<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17534139> (accessed 21 Mar2017).
- 2 Gump JM, Thorburn A. Sorting cells for basal and induced autophagic flux by quantitative ratiometric flow cytometry. *Autophagy* 2014; **10**: 1327–34.
- 3 Mitou G, Frenzel J, Desquesnes A, Le Gonidec S, AlSaati T, Beau I *et al.* Targeting autophagy enhances the anti-tumoral action of crizotinib in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Oncotarget* 2015; **6**: 30149–64.

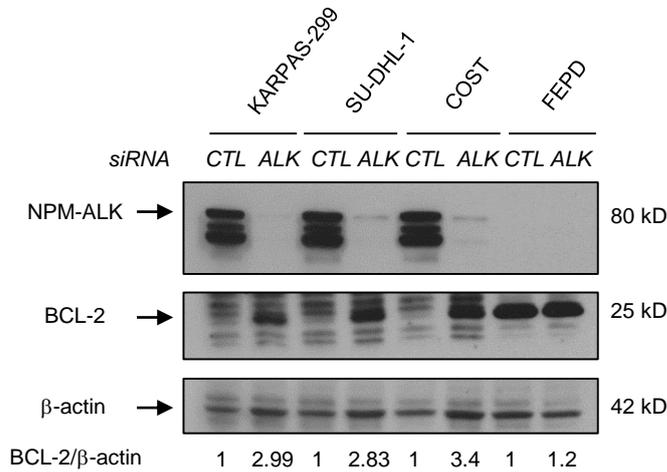
FIGURE S1

Figure S1. BCL-2 expression correlates with ALK status. Western blot analysis of BCL-2 and NPM-ALK protein levels in ALK-positive and ALK-negative ALCL cells transfected with either a negative control siRNA (CTL) or siRNA targeting ALK mRNA (ALK) for 72 h. β -actin served as the internal control to ensure equal loading. BCL-2/ β -actin signal ratios were quantified using ImageJ; this ratio was set to 1 for the untreated condition for each cell line.

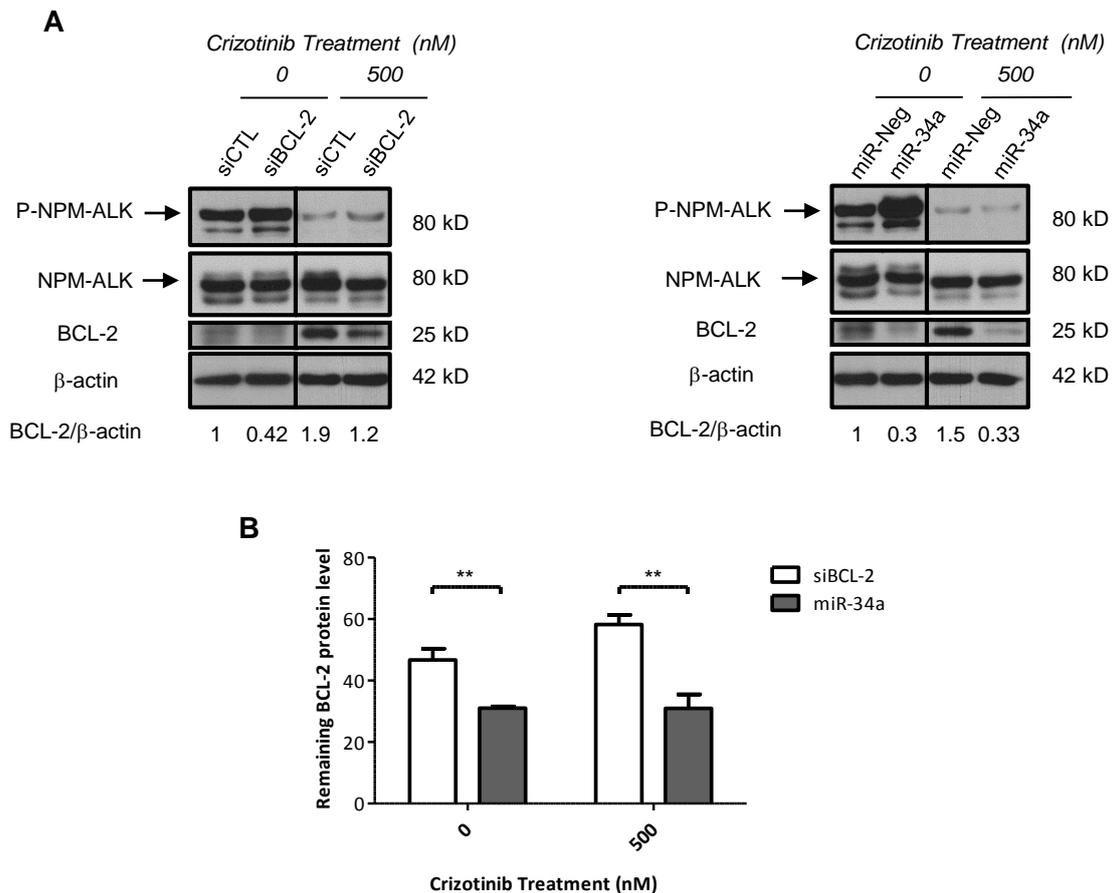
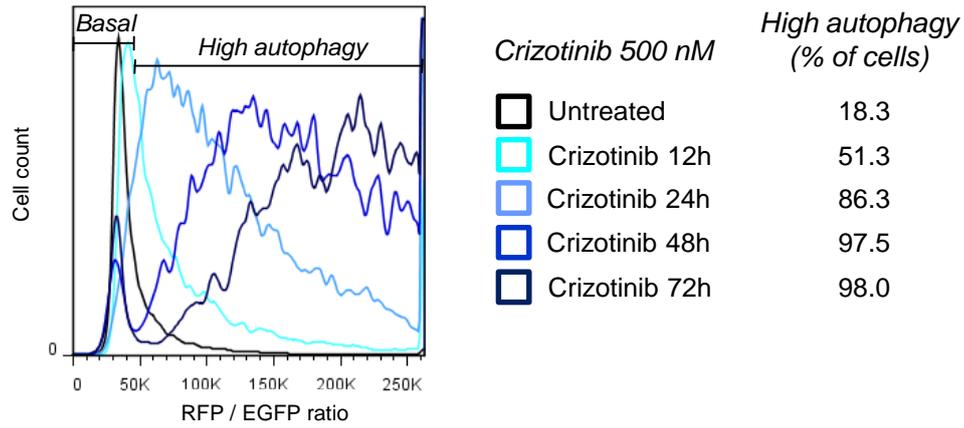
FIGURE S2

Figure S2. Efficiency of BCL-2 molecular depletion on BCL-2 protein levels. (A) Western blot analysis of BCL-2 protein expression following BCL-2 molecular depletion. Twenty-four hours after transfection with siBCL-2 (left panel), miR-34a microRNA mimics (right panel), or their corresponding negative controls (siCTL or miRNeg), ALK-positive ALCL cells were treated (or not) with crizotinib (500 nM) for a further 72 h and BCL-2 protein levels were then assessed by western blotting. β -actin served as the internal control to ensure equal loading. BCL-2/ β -actin signal ratios were quantified using ImageJ; this ratio was set to 1 for the untreated condition. (B) Histogram representation of remaining BCL-2 protein levels following BCL-2 molecular depletion. Remaining BCL-2 protein levels were determined by establishing the ratios between the BCL-2 signal in BCL-2-knockdown cells versus that in control transfected cells. Data represent the means \pm SEM of three independent experiments. Statistical comparisons were performed with a Student's t test (** $P < 0.01$).

FIGURE S3

A



B

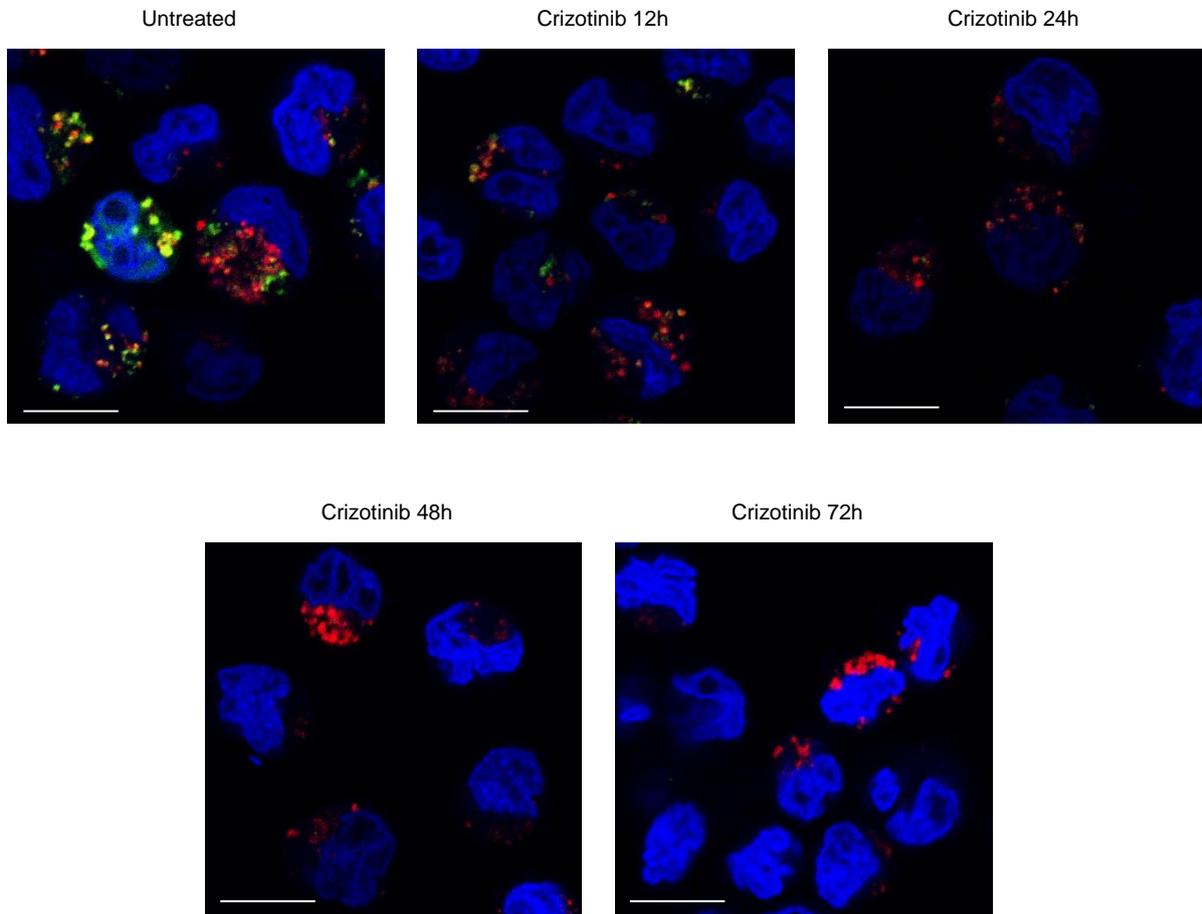


Figure S3. Validation of the use of tandem fluorescent-tagged LC3 reporter cells for autophagic flux monitoring. (A) Induction of autophagic flux was analyzed by monitoring the RFP/EGFP fluorescence ratios using flow cytometry in mRFP-EGFP-LC3 KARPAS-299 cells that had been treated with crizotinib (500 nM) for 0, 12, 24, 48 or 72 hours. (B) Confocal microscopy analysis of the above-mentioned cells. Scale bars represent 10µm.

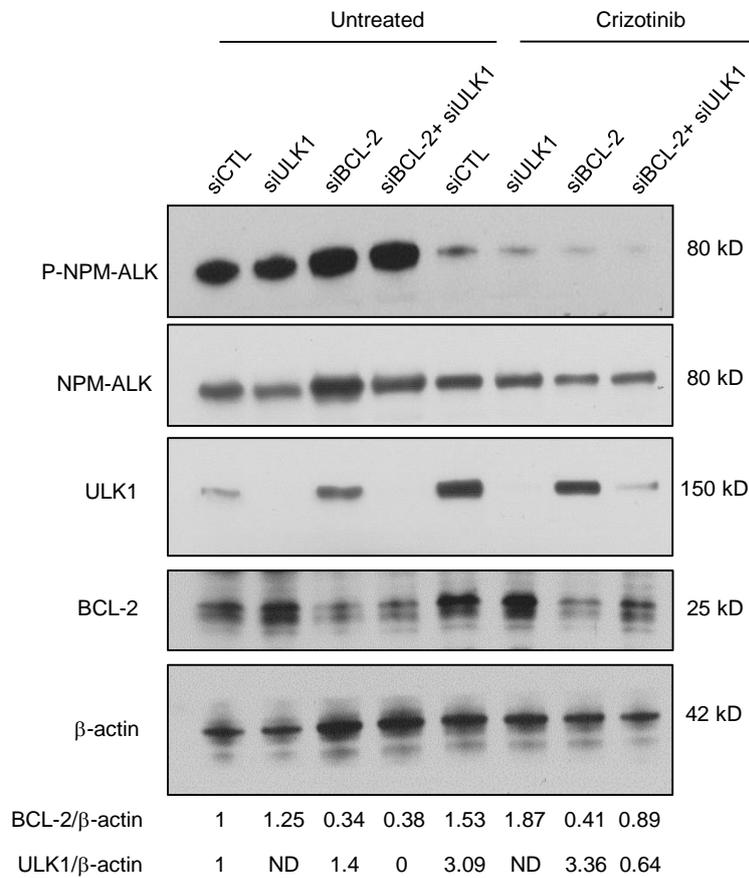
FIGURE S4

Figure S4. Efficient BCL-2 or/and ULK1 molecular depletion in ALK-positive ALCL cells. ULK1 and BCL-2 protein levels following their molecular depletion by RNA interference, using siRNA targeting either ULK1 mRNA (siULK1) or BCL-2 mRNA (siBCL-2). mRFP-EGFP-LC3 KARPAS-299 cells were transfected with either negative control siCTL, or siULK1, siBCL-2 or both, then 24 h later they were treated with crizotinib (200 nM) for a further 72 h. Equal quantities of siRNA were delivered in each condition. β -actin served as the internal control to ensure equal loading. BCL-2/ β -actin and ULK1/ β -actin signal ratios were quantified using ImageJ; these ratios were set to 1 for the untreated condition. The data shown are representative of three independent experiments that gave similar results.

PARTIE II :

**ROLE DE HUR DANS LA REGULATION POST-
TRANSCRIPTIONNELLE DE L'EXPRESSION DE BCL-2 ET DE
L'AUTOPHAGIE DANS LES LAGC ALK+**

De façon parallèle à l'étude dont les résultats sont présentés dans la partie I, nous avons souhaité élucider le mécanisme par lequel Bcl-2 était réprimé dans les LAGC ALK+. Plusieurs éléments nous ont initialement amenés à considérer un mécanisme intervenant au niveau post-transcriptionnel : tout d'abord, la différence observée lors de la comparaison des taux d'ARNm Bcl-2 entre LAGC ALK+ et LAGC ALK- ne paraissait pas refléter celle observée au niveau protéique, suggérant un contrôle post-transcriptionnel, voire traductionnel. En outre, une étude précédemment menée par notre équipe a montré que NPM-ALK pouvait moduler l'affinité et l'activité de l'ARE-BP HuR vis-à-vis de ses ARNm cibles¹³⁹. De manière intéressante, HuR a été décrite dans d'autres modèles comme pouvant cibler l'ARNm Bcl-2 (Figure 29). Enfin, l'ARNm messager Bcl-2 a la particularité de posséder une très longue extrémité 3' non traduite (5,1 kb) portant, outre plusieurs motifs ARE, de nombreux sites de liaison pour des miRNA dont certains sont exprimés dans les LAGC ALK+²⁴⁸. Nous avons ainsi formulé l'hypothèse selon laquelle la régulation de l'expression de Bcl-2 dans les LAGC ALK+ dépendait de l'activité kinase de NPM-ALK et qu'elle reposait, tout au moins en partie, sur un dialogue entre HuR et des miARNs, dont nous devons déterminer l'identité.

I. RÔLE DE HUR DANS LA MISE EN SILENCE ALK-DEPENDANTE DE BCL-2 DANS LES LAGC ALK+

Mise en évidence du rôle de HuR dans la répression de Bcl-2 dans les LAGC ALK+

Afin d'étudier l'influence de HuR sur la régulation de l'expression de Bcl-2, nous avons choisi d'utiliser comme modèles cellulaires deux lignées humaines de LAGC ALK+, COST et Karpas-299.

Nous avons tout d'abord cherché à démontrer l'implication de HuR dans l'inhibition de l'expression de Bcl-2 dans les LAGC ALK+, en réprimant l'expression de cette protéine par interférence à l'ARN.

Nos données montrent que l'extinction de l'expression de HuR par interférence ARN dans des lignées de LAGC ALK+ conduit à une augmentation concomitante du niveau protéique de Bcl-2, de façon similaire à ce qui est observée après l'extinction de NPM-ALK (Figure 30). Ces résultats suggèrent fortement que le mécanisme d'inhibition de l'expression de Bcl-2, dépendant de NPM-ALK, implique également HuR.

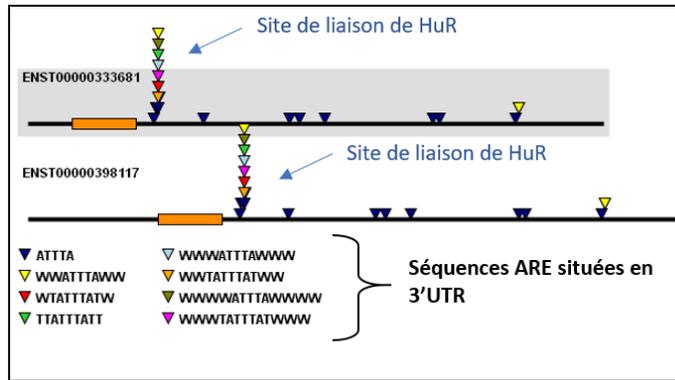


Figure 29. Présence de motifs ARE sur l'ARNm Bcl-2. Le transcrit Bcl-2 possède une longue extrémité 3' non traduite (~ 5000 nt) portant des motifs ARE, pouvant constituer des sites de liaison de HuR. Les flèches bleues indiquent les sites de liaison de HuR préalablement caractérisés dans d'autres modèles. D'après AREsite, <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/AREsite.cgi>

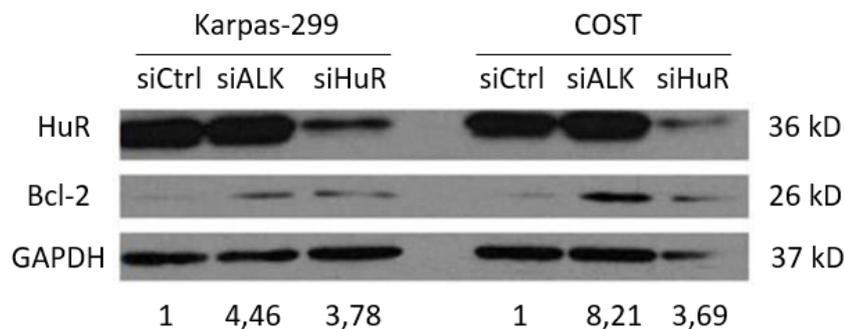


Figure 30. Effet d'une extinction de l'expression de NPM-ALK ou de HuR sur le taux de protéines Bcl-2 dans les LAGC. Après introduction de petits ARN interférents (siALK, siHuR ou siCtrl) dans les différentes lignées de LAGC, 60µg de protéines ont été déposées sur un gel dénaturant (SDS-PAGE, 10%). Les niveaux de protéines HuR, Bcl-2 et GAPDH (contrôle de charge) ont été déterminés en utilisant les anticorps adéquats. L'intensité des bandes correspondant à Bcl-2 a été quantifiée et normalisée par rapport à GAPDH à l'aide du logiciel ImageJ. La quantité de Bcl-2 dans les échantillons contrôles de chaque lignée (siCtrl) a été prise comme référence et ramenée à 1. Ce Western Blot est représentatif de 3 expériences indépendantes.

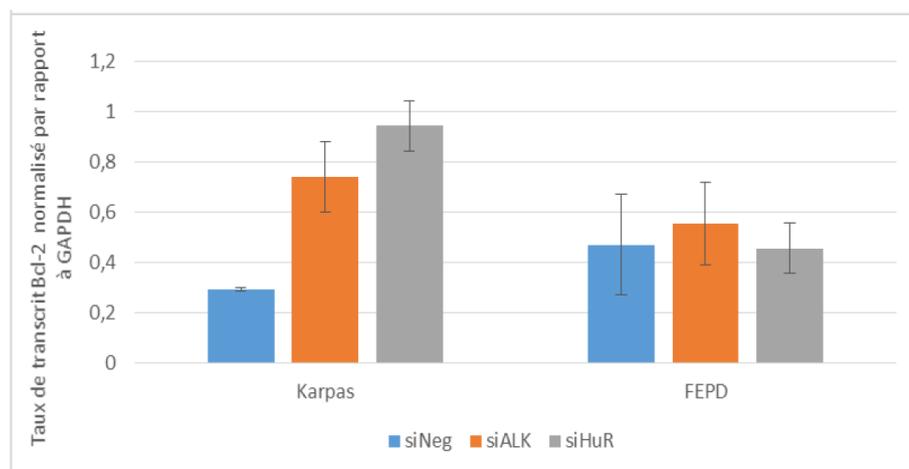


Figure 31. Quantité d'ARNm Bcl-2 dans deux lignées humaines de LAGC (ALK+ et ALK-) et effet d'une extinction de l'expression de NPM-ALK et de HuR sur ces niveaux de transcrits. Après introduction de petits ARN interférents (siNeg (Contrôle), siALK, siHuR) dans les lignées de LAGC, une RT-qPCR a été réalisée à partir de 1µg d'ARN total et les quantités d'ARNm Bcl-2 ont été mesurées, puis normalisées par rapport aux taux d'ARNm GAPDH (n=2).

Effets respectifs des pertes de NPM-ALK et de HuR sur les taux de transcrits Bcl-2

Parallèlement à la mesure des taux protéiques de Bcl-2, nous avons réalisé des mesures des taux d'ARNm Bcl-2 par RT-qPCR dans deux lignées de LAGC, Karpas-299 (ALK+) et FEPD (ALK-), en réponse à une extinction de l'expression de NPM-ALK, ou de HuR.

Nos données montrent que dans la lignée Karpas-299 (LAGC ALK+), les taux d'ARNm Bcl2 augmentent en réponse à une extinction de l'expression de ALK (siALK) ou de HuR (siHuR) par interférence ARN (Figure 31). Ces résultats font ainsi écho à la hausse du taux de protéine Bcl-2 observée pour cette même lignée dans des conditions équivalentes (Figures 28, pistes siALK et siHuR). La lignée de LAGC ALK- FEPD ne montre quant à elle aucune variation du niveau de transcrits Bcl2, quel que soit le petit ARN interférent utilisé. En revanche, il est intéressant de noter que les taux basaux de transcrits Bcl-2 dans les deux lignées (conditions siNeg) sont du même ordre de grandeur alors que les quantités de protéines sont environ 10 fois plus élevées dans la lignée ALK- FEPD par rapport à la lignée ALK+ Karpas-299, ce qui suggère que le mécanisme de mise en silence de Bcl-2 exercée par HuR sous la dépendance de ALK comporte *a priori* bien une composante post-transcriptionnelle.

Implication du complexe RISC (RNA-mediated silencing complex) dans l'inhibition de l'expression de Bcl-2 dans les LAGC ALK+

Afin de mettre en évidence l'implication de miARN, et donc du complexe RISC dans la mise en silence de Bcl-2, nous avons cherché à savoir quelles seraient les conséquences d'une « neutralisation » de ce complexe sur l'expression de Bcl-2 dans les lignées de LAGC ALK+. Pour cela, nous avons réprimé par interférence à l'ARN l'expression de la protéine Ago2 (Argonaute2), l'une des protéines clé du complexe RISC (Figure 32).

Nos résultats montrent que l'extinction d'Ago2 induit, dans les cellules de LAGC ALK+, une augmentation du taux de protéine Bcl-2, ce qui suggère fortement l'implication du complexe RISC, donc de la machinerie d'interférence ARN, dans la mise en silence de Bcl-2.

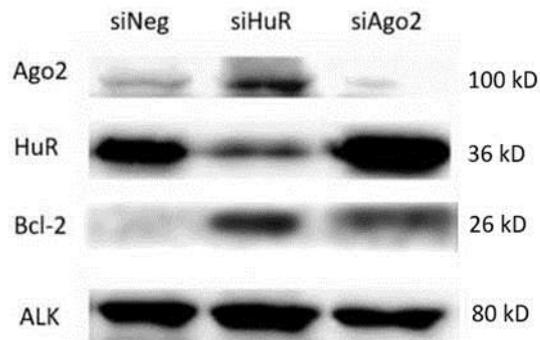


Figure 32. Effet d'une extinction de l'expression d'Ago2 sur le taux de protéines Bcl-2 dans la lignée Karpas-299 (LAGC ALK+ de type commun).Après introduction de petits ARN interférents (siNeg (contrôle), siHuR ou siAgo2) dans la lignée Karpas-299, 60µg de protéines ont été déposées sur un gel dénaturant (SDS-PAGE, 10%). Les niveaux de protéines HuR, Bcl-2, Ago2 et ALK ont été déterminés en utilisant les anticorps adéquats (n=3).

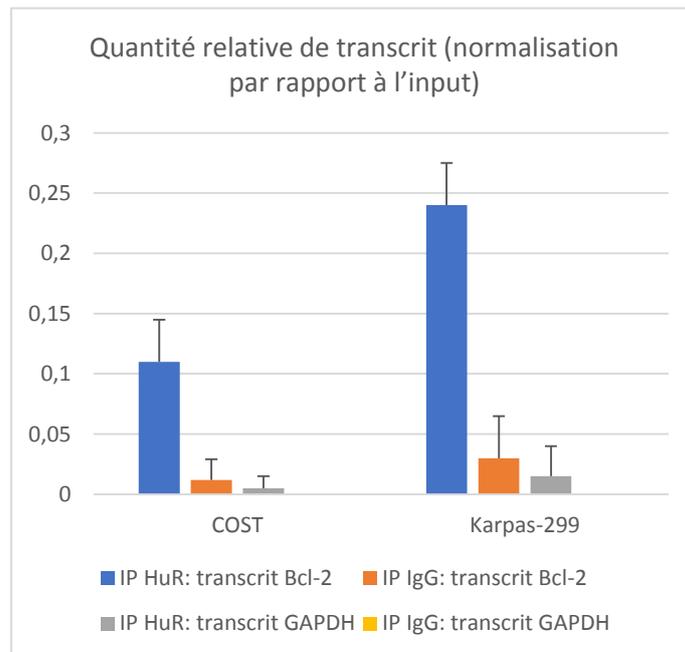


Figure 33. Quantification des ARNm Bcl-2 liés à HuR. Mesure des quantités de transcrits *Bcl-2* et *GAPDH* (contrôle négatif car *GAPDH* n'est pas une cible connue de HuR) par RT-qPCR. Les données sont exprimées en % de l'Input). IgG= anticorps "irrelevant" (contrôle de spécificité de l'IP) (n=3).

Immunoprécipitation des complexes ribonucléoprotéiques impliquant HuR et Ago2

➤ Interaction HuR/ARNm Bcl2 : quantification des ARNm Bcl-2 liés à HuR

Pour valider notre hypothèse de travail, selon laquelle la fixation de HuR sur l'ARNm Bcl-2 pourrait favoriser le recrutement d'un complexe miRISC (microRNA-mediated silencing complex) à l'origine de la mise en silence de Bcl-2, nous avons tout d'abord souhaité montrer que HuR interagissait bien avec l'ARNm Bcl-2 dans le contexte des lignées cellulaires de LAGC ALK+. Pour cela, nous avons réalisé une IP à l'aide d'un anticorps dirigé contre HuR, et analysé, par RT-qPCR la quantité de messenger Bcl-2 retrouvée dans les complexes immunoprécipités (Figure 33).

Nos résultats montrent que les ARNm Bcl-2 sont effectivement retrouvés de manière spécifique dans les IP réalisées à l'aide d'un anticorps dirigé contre HuR (IP HuR) : ceci suggère fortement l'existence d'une interaction entre HuR et le messenger Bcl-2, ou tout au moins, leur appartenance à un même complexe ribonucléoprotéique, et suggère également que c'est par le biais d'une interaction moléculaire directe que HuR exerce son effet répresseur sur Bcl-2.

➤ Interaction Ago2/ARNm Bcl-2 : quantification des ARNm Bcl-2 liés à Ago2

Selon notre hypothèse, la mise en silence de Bcl-2 dans les LAGC pourrait reposer sur le recrutement par la protéine HuR de la machinerie d'interférence ARN (complexe RISC) au niveau du transcrit Bcl2. Afin de valider cette hypothèse, nous avons également cherché à savoir si, dans les LAGC ALK+, il était possible de détecter une interaction entre le transcrit Bcl-2 et la machinerie d'interférence ARN (notamment la protéine Ago2 du complexe RISC), et si cette interaction dépendait effectivement de la présence de HuR. Pour cela nous avons réalisé, sur des lysats issus de cellules de lignées ALK+ préalablement traitées (ou non) par un siRNA dirigé contre HuR, une immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps anti Ago2, et analysé par RT-qPCR la quantité de messenger Bcl-2 retrouvée dans les complexes immunoprécipités.

Nous ne sommes malheureusement pas parvenus à détecter Bcl-2 dans nos immunoprécipitats, vraisemblablement en raison d'un rendement insuffisant des immunoprécipitations. Cette expérience reste donc à réitérer.

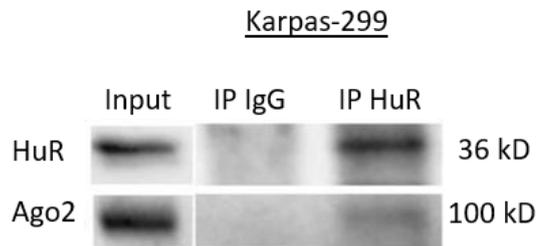


Figure 34. Co-IP de HuR et Ago2 dans la lignée Karpas-299. Des lysats protéiques issus de la lignée Karpas-299 ont été incubés à 4°C toute la nuit sur roue en présence d'anticorps anti-HuR, anti-Ago2, ou anti-IgG avec des billes de protéines G-sépharose. Après lavage, les billes ont été reprises dans 20µl de tampon NT2 et la moitié des immunoprécipitats a été déposée sur gel dénaturant (SDS-PAGE, 10%). Les niveaux de protéines Ago2 et HuR ont été déterminés à l'aide des anticorps adéquats. Ce résultat est représentatif de 3 expériences indépendantes.

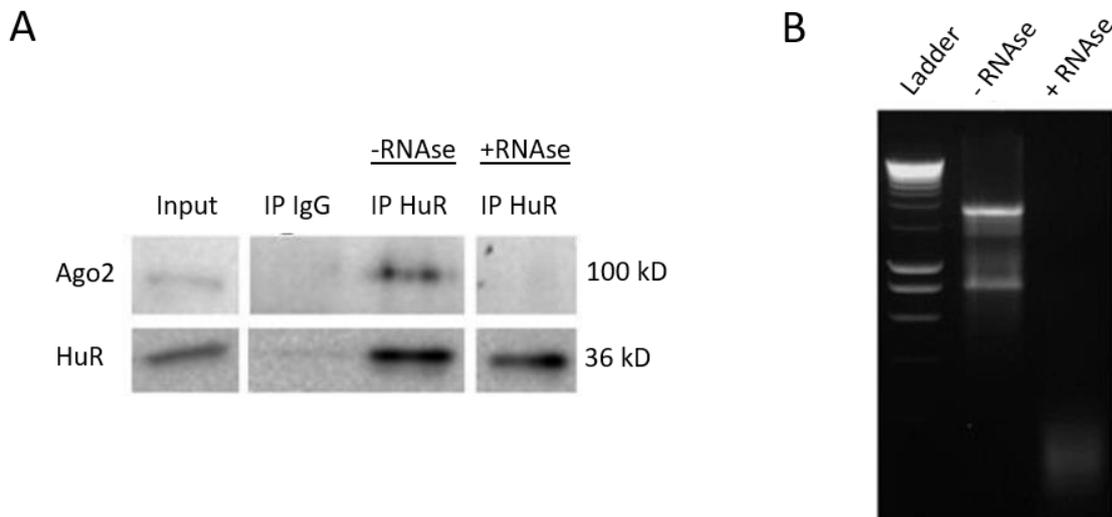


Figure 35. A-Dépendance à l'ARN de l'interaction HuR/Ago2. Après 30 minutes de traitement à la RNase A, des lysats protéiques issus de la lignée Karpas-299 ont été incubés à 4°C durant 16h sur roue en présence d'anticorps anti-HuR, anti-Ago2, ou anti-IgG avec des billes de protéines G-sépharose. Après lavage, les billes ont été reprises dans 20µl de tampon NT2 et la moitié des immunoprécipitats ainsi obtenus ont été déposés sur gel dénaturant (SDS-PAGE, 10%). La détection des protéines Ago2 et HuR a été réalisée à l'aide des anticorps adéquats (n=3). **B-Effet du traitement à la RNase A.** Après traitement (ou non) à la RNase A, les ARN extraits des lysats cellulaires ont été déposés sur gel d'agarose (0.8%) et révélés par coloration au BET.

Interaction entre HuR et le complexe RISC

➤ Co-Immunoprécipitation (Co-IP) HuR/Ago2

Afin de mettre en évidence, dans les LAGC ALK+, une modulation conjointe par HuR et des miARN du devenir de transcrits cibles commun (en particulier le transcrit Bcl-2), il nous a semblé intéressant de rechercher si, dans ces cellules, HuR avait la capacité d'interagir avec le complexe RISC, comme certains travaux l'ont déjà démontré dans d'autres modèles cellulaires.

Nous avons ainsi réalisé des IP à l'aide d'anticorps dirigés soit contre HuR, soit contre Ago2, afin de vérifier si ces 2 protéines pouvaient bel et bien être retrouvées au sein d'un complexe commun (Figure 34).

Nos résultats montrent bien que la protéine Ago2 co-immunoprécipite de manière spécifique avec la protéine HuR. Nous n'avons malheureusement pas obtenu de résultats exploitables concernant l'expérience inverse (recherche de la protéine HuR dans des IP réalisées à l'aide d'anticorps anti-Ago2), à nouveau probablement en raison du rendement très faible de cette IP. Ces premiers résultats suggèrent toutefois que HuR possède bel et bien la capacité de contacter ou du moins d'interagir avec le complexe RISC et donc la machinerie d'interférence ARN. Ils indiquent ainsi que cette ARE-BP est potentiellement capable, dans les LAGC ALK+, d'établir des dialogues et possiblement une synergie avec les miARN du complexe miRISC.

➤ Dépendance à l'ARN de l'interaction HuR/Ago2

Nous avons souhaité préciser le rôle de l'ARN dans la formation du complexe HuR/Ago2 dans les LAGC ALK+, une dépendance vis-à-vis de l'ARN ayant été observée dans le cas du dialogue de nature coopérative entre HuR et Let7 au niveau de l'ARNm c-Myc. Nous avons donc réalisé des IP à l'aide d'anticorps dirigés soit contre HuR, soit contre Ago2, mais cette fois après avoir préalablement traité (ou non) les lysats protéiques de LAGC ALK+ à la RNase A (une ribonucléase dégradant tous les ARN) (Figure 35-A). L'efficacité du traitement à la RNase a été vérifiée après extraction des ARNs et dépôt de ces derniers sur gel d'agarose puis révélation par coloration du gel au BET. Les ARNs semblent bien avoir été dégradés comme le témoigne en particulier la perte totale de la bande de plus grande taille, qui correspond à l'ARNr 28S (Figure 35-B).

L'interaction HuR/Ago2 est perdue après traitement à la RNase (Figure 35-A). Ce résultat démontre que la présence d'ARN est nécessaire à la formation d'un complexe entre HuR et le complexe RISC,

microARN	Facteur d'induction : tumeurs ALK+ /Ganglions sains	p-Value	Facteur d'induction : lignées ALK+ /Lymphocytes T sains	Prédiction Bio-informatique
hsa-miR-34a-5p	6,03	1,00E-14	ND	6/7
Hsa-miR-21-5p	3,43	2,48E-13	ND	6/7
hsa-miR-424-5p	3,32	6,87E-05	ND	4/7
hsa-miR-34b-3p	2,24	1,72E-07	ND	4/7
hsa-miR1915-3p	2,1	2,00E-02	ND	4/7
hsa-miR-195-5p	2,1	5,24E-03	ND	6/7
hsa-miR-20a-5p	ND	ND	2,37	4/7
Hsa-miR17-5p	ND	ND	2,16	4/7

Tableau 6. Identification in silico, de "miARN candidats" ciblant l'ARNm Bcl-2. 2^{ème} colonne : Facteur d'induction = niveaux d'expression des miARN chez les patients atteints de LAGC ALK+ (tumeurs) comparés à ceux mesurés dans des ganglions sains (n=25). 4^{ème} colonne : Facteur d'induction = niveaux d'expression des miARN dans les lignées cellulaires de LAGC ALK+ (Karpas-299, SU-DHL1 et SR 786) comparés à ceux mesurés dans des lymphocytes T sains (23). 5^{ème} colonne : nombre de prédictions correctes sur la totalité des logiciels d'analyse bio-informatiques utilisés (7 logiciels : "27-UTR", "MicroCosm v5", "miRanda aug2010", "miRTarBase v2.5", "PicTar", "TargetScan cons. v6.0", "TargetScan v6.0"). ND= non disponible

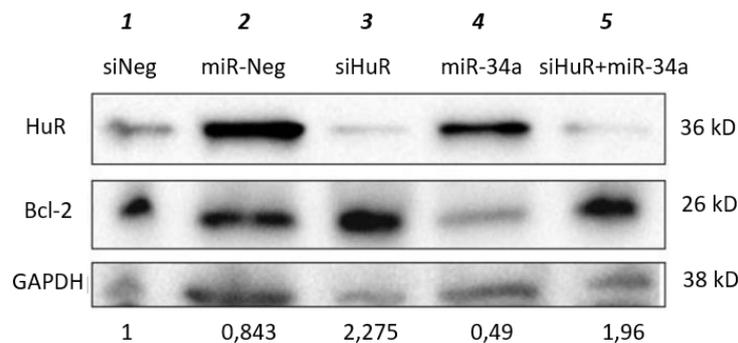


Figure 36. Effet d'une surexpression du miR-34a sur l'expression de Bcl-2, en présence ou en absence de HuR. Après introduction de petits ARN interférents (siNeg, siHuR) ou de mimétiques de miARN (miR-Neg, miR-34a) dans la lignée Karpas-299, 80µg de protéines ont été déposés sur gel dénaturant (SDS-PAGE, 10%). Les niveaux de protéines HuR, Bcl-2, GAPDH ont été visualisés à l'aide des anticorps adéquats. L'intensité des bandes correspondant à la protéine Bcl-2 a été normalisée par rapport à GAPDH à l'aide du logiciel ImageLab. La quantité de Bcl-2 dans la condition siNeg a été prise comme référence et ramenée à 1. Ce Western Blot est représentatif de 3 expériences indépendantes.

ce qui pourrait suggérer que ces 2 partenaires nécessitent, pour leur interaction, des « plateformes communes » de nature ribonucléique, potentiellement représentées par les ARNm cibles communs.

Mise en évidence d'un dialogue de nature coopérative entre HuR et miR-34a sur le transcrit Bcl-2

Dans la dernière partie de ce travail, nous nous sommes attachés à démontrer que le transcrit Bcl-2 constituait une plateforme de rencontre entre HuR et un/des miARN, que nous avons cherché à identifier.

- Identification de "microARNs candidats" ciblant l'ARNmBcl-2

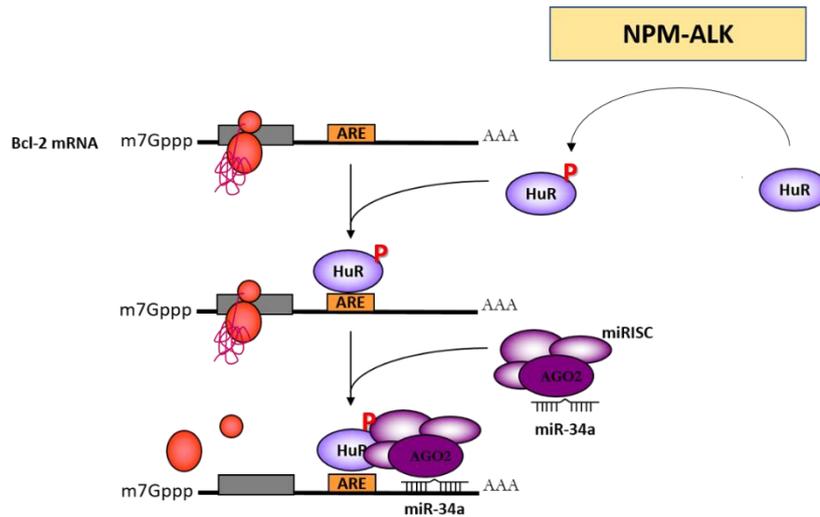
Nous avons tout d'abord établi une liste de "miARN candidats" pouvant potentiellement cibler le transcrit Bcl-2 en nous basant sur une analyse *in silico*, et menée en utilisant différents outils bio-informatiques de prédiction. Parmi cette liste, seuls les miRNA significativement surexprimés dans les cellules de LAGC ALK+ par rapport aux ganglions non tumoraux ont été conservés (données de miRNome de l'équipe, non publiées). Nous avons ainsi retenu 3 miRNA candidats : miR-34a-5p, miR-21-5p et miR-195-5p (Tableau 6).

Les rôles répresseurs de miR-34a et miR-195 sur l'ARNm Bcl-2 sont bien décrits dans la bibliographie ; en revanche, l'effet du miR-21 paraît plus ambigu. Nous nous sommes ainsi concentrés sur le rôle potentiel du miR-34a, ce miRNA ayant la particularité d'être décrit comme un puissant suppresseur de tumeur, et ayant été proposé comme potentiel outil thérapeutique : nous avons ainsi choisi de tester son implication, en coopération avec la protéine HuR, dans la répression de l'expression de Bcl-2 dans les LAGC ALK+. Ces résultats, obtenus parallèlement à ceux présentés dans la partie I (Article), ont constitué un argument supplémentaire en faveur de l'utilisation de miR-34a comme outil pour le ciblage de Bcl-2 dans les LAGC ALK+ (voir partie I – Article).

- Validation fonctionnelle du rôle de miR-34a dans la répression de l'expression de Bcl-2, et mise en évidence de la dépendance de ce mécanisme vis-à-vis de HuR

Afin de valider le rôle fonctionnel de miR-34a dans la répression de Bcl-2 dans les LAGC ALK+ et de démontrer sa dépendance vis-à-vis de HuR, nous avons introduit des ARN interférents mimétiques de ce miRNA (« miR-34a ») et/ou de petits ARN interférents dirigés contre HuR (« siHuR ») dans la

A. Répression de Bcl-2 dans les LAGC ALK+



B. Ré-expression de Bcl-2 après inactivation de ALK

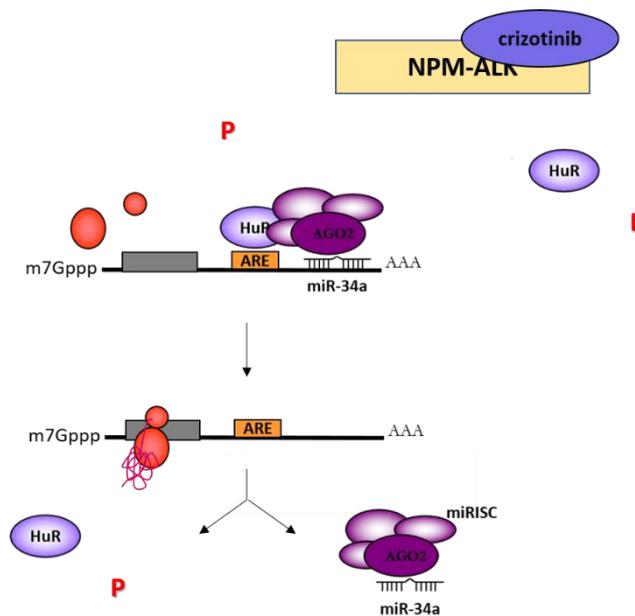


Figure 37. Modèle proposé pour la régulation post-transcriptionnelle de l'expression de Bcl-2 dans les LAGC ALK+.

A. Dans les LAGC ALK+, l'activité tyrosine kinase de ALK favorise l'interaction entre HuR et l'ARNm Bcl-2. La fixation de HuR sur ce transcrite permet alors le recrutement de miR-34a et du complexe RISC sur ce transcrite, ce qui conduit à une mise en silence de l'expression de Bcl-2 dans ces lymphomes, à la fois ALK et HuR dépendante. **B.** Après inhibition de l'activité tyrosine kinase de ALK, comme un traitement par le crizotinib, Bcl-2 est moins affiné pour le transcrite BCL-2, ce qui se traduit par une perte du recrutement de miR-34 sur cet ARNm, et par la ré-expression de Bcl-2.

lignée de LAGC ALK+ Karpas-299, puis avons analysé par Western Blot le taux de protéine Bcl-2 dans ces différentes conditions (Figure 36).

L'analyse par western-blot montre, de manière cohérente avec les prédictions bio-informatiques et les données de la littérature, que l'introduction de miR-34a mimétiques (facteur d'induction d'environ 4000 par rapport au niveau basal, selon nos mesures de RT-qPCR, données non montrées) permet de réprimer l'expression de Bcl-2 (piste 4 : condition miR-34a,). Cette répression se traduit par une diminution du taux de Bcl-2 par rapport à la condition contrôle (piste 2 : miR-Neg). Nos résultats indiquent surtout que la déplétion en protéine HuR lève l'effet répresseur opéré par le miR-34a sur Bcl-2 (piste 5 : condition siHuR + miR-34a). Ces résultats montrent ainsi que ce miARN nécessite la présence de HuR pour exercer son effet inhibiteur sur Bcl-2 dans les LAGC ALK+ : ce dernier point constitue un argument solide en faveur du modèle selon lequel la mise en silence de l'oncogène Bcl-2 résulte, dans ces cellules, d'une coopération entre HuR et le miR-34a.

Notons que la quantification par RT-qPCR du taux de miR-34 nous a révélé que la déplétion en HuR (condition « siHuR + miR-34a ») ne modulait pas la quantité de miR-34a dans les cellules de LAGC ALK+. Ceci nous a donc permis de rejeter l'hypothèse alternative selon laquelle HuR réprimerait « indirectement » l'expression de Bcl-2 en stabilisant le miR-34a, et donc en augmentant son taux.

Conclusion

En conclusion, et à l'instar de ce qui a été démontré pour le transcrite Myc en présence du miARN Let7, nous proposons un modèle (Figure 37-A) selon lequel dans les LAGC ALK+, l'ARE-BP HuR, dont les fonctions et l'affinité pour ses cibles est augmentée par NPM-ALK, est capable d'interagir avec le transcrite Bcl-2. En se liant avec ce dernier, la protéine HuR favoriserait le recrutement du complexe mi34a/RISC, qui exercerait un effet déstabilisateur et/ou participerait à l'inhibition de la traduction de cette ARNm cible commun.

Lors d'un traitement par le crizotinib, la perte de la phosphorylation sur tyrosine de HuR, qui réduit son affinité pour le transcrite Bcl-2, affecterait *in fine* sa capacité à recruter le complexe miR-34a/RISC sur ce transcrite : le transcrite Bcl2 ne serait pas dégradé et sa traduction ne serait pas affectée : ceci se traduirait par la hausse une ré-expression de Bcl-2 dans les cellules (Figure 37-B).

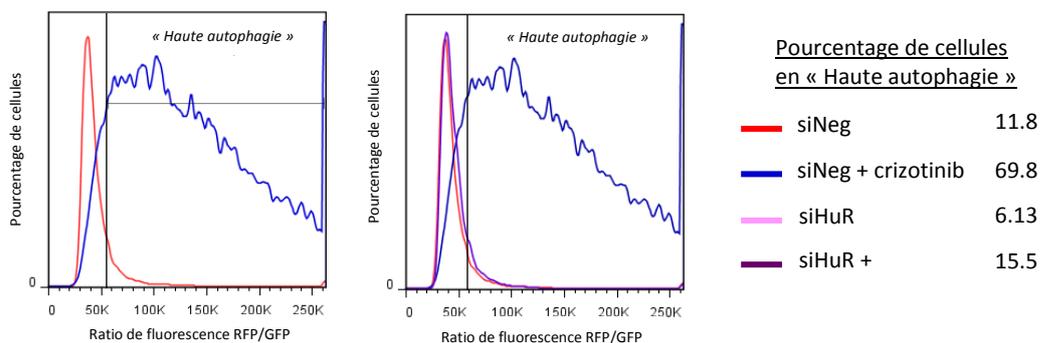


Figure 38. La déplétion moléculaire de HuR inhibe l'induction de flux autophagique généré par le crizotinib. Mesure du flux autophagique suite à une déplétion moléculaire de HuR et/ou traitement par le crizotinib dans des cellules Karpas-299 exprimant la protéine LC3 marquée par la mRFP et l'EGFP. 48h après transfection par de petits ARN interférents « irrelevants » (siNeg) ou dirigés contre HuR (siHuR), les cellules ont un traitement de 500 nM de crizotinib durant 24h, puis l'analyse du flux autophagique a été réalisée par analyse en cytométrie de flux du ratio de fluorescence mRFP/EGFP dans chaque cellule (voir Méthodes supplémentaire, Article - Résultats Partie I).

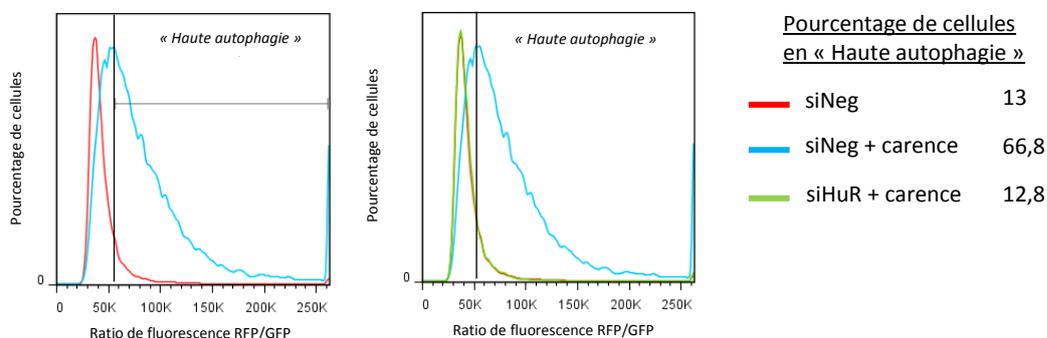


Figure 39. La déplétion moléculaire de HuR inhibe l'induction de flux autophagique généré par la carence en nutriments. Mesure du flux autophagique suite à une déplétion moléculaire de HuR et/ou traitement par le crizotinib dans des cellules Karpas-299 exprimant la protéine LC3 marquée par la mRFP et l'EGFP. 48h après transfection par de petits ARN interférents « irrelevants » (siNeg) ou dirigés contre HuR (siHuR), les cellules ont été carencées en nutriments (mais cultivées en présence de serum) durant 24h, puis l'analyse du flux autophagique a été réalisée par analyse en cytométrie de flux du ratio de fluorescence mRFP/EGFP dans chaque cellule (voir Méthodes supplémentaire, Article - Résultats Partie I).

II. Rôle de HuR dans la régulation du processus autophagique dans les LAGC ALK+

Durant ma thèse, nous nous sommes finalement interrogés sur l'existence d'un rôle plus large de HuR dans la régulation post-transcriptionnelle du processus autophagique. Plus précisément, nous nous sommes demandés si cette ARE-BP pouvait favoriser l'expression de certaines protéines clés de la machinerie autophagique, voire jouer un rôle de « cargo » pour permettre une dégradation sélective de complexes ribonucléoprotéiques par autophagie.

La réponse semble être affirmative, même si les données présentées ci-dessous restent extrêmement préliminaires.

➤ Régulation de la mise en place du processus autophagique par HuR

L'hypothèse d'une implication de HuR dans la régulation du processus autophagique trouve son origine dans une observation réalisée lors de l'étude de la régulation post-transcriptionnelle de Bcl-2 par HuR.

Nous avons effectivement observé à cette occasion que la perte de HuR (par interférence à l'ARN, siHuR) inhibait la capacité des cellules de LAGC ALK+ (lignée Karpas-299) à répondre au traitement par le crizotinib par l'induction de flux autophagique (Figure 38). De manière intéressante, il est également ressorti que la perte de HuR semblait diminuer le flux autophagique basal dans les cellules, indépendamment de tout type de traitement.

Nous nous sommes donc demandé si, dans les LAGC ALK+, HuR était impliquée dans la régulation du processus autophagique, que ce soit au niveau basal ou en réponse à un stress. Nous avons ainsi testé les conséquences d'une extinction moléculaire de HuR sur des cellules soumises à une carence en nutriment, un stimulus classiquement utilisé pour induire l'autophagie (Figure 39). De manière cohérente avec ce que nous avons observé avec le traitement par le crizotinib, nous avons mis en évidence que la perte de HuR inhibait la capacité des cellules à générer un flux autophagique, y compris en situation de carence en nutriments.

Dans le but de préciser le mécanisme par lequel HuR était impliquée dans la mise en place de l'autophagie, nous avons examiné des données de transcriptomes disponibles dans l'équipe, indiquant les taux d'ARNm de gènes codant des acteurs clés de l'autophagie en conditions normales ou en réponse à un traitement par le crizotinib. Nous nous sommes focalisés sur les ARNm dont les taux

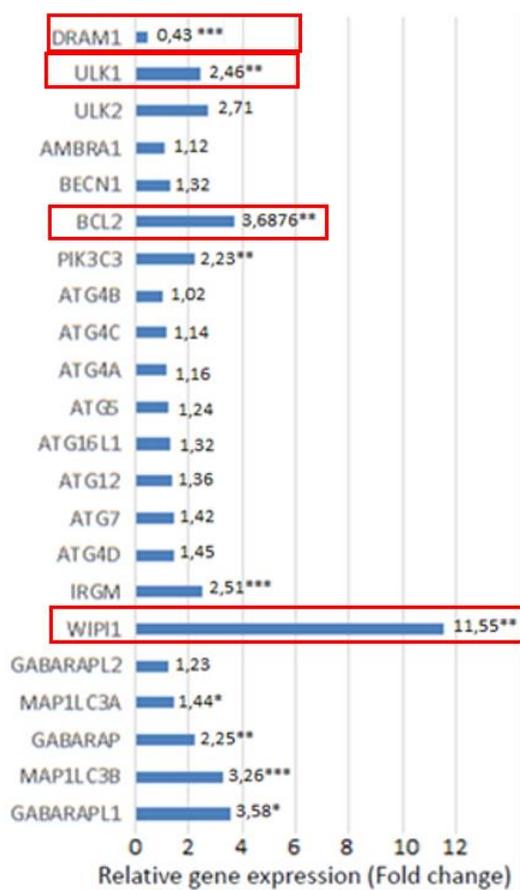


Figure 40. Données transcriptomiques (puce autophagie). Expression relative de gènes impliqués dans l'autophagie dans la lignée Karpas-299, en réponse à un traitement par le crizotinib. Les cadres rouges indiquent les transcrits porteurs de motifs ARE pouvant potentiellement interagir avec HuR. D'après Frenzel*, Mitou* et al., *oncotarget*, 2015

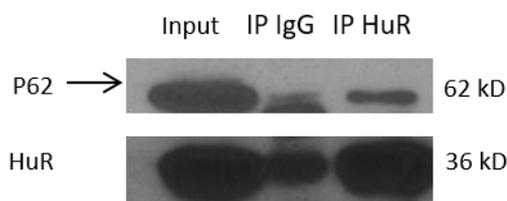


Figure 41. Interaction de HuR et P62 dans la lignée Karpas-299. Des lysats protéiques issus de la lignée Karpas-299 ont été incubés à 4°C toute la nuit sur roue en présence d'anticorps anti-HuR, anti-p62, ou anti-IgG avec des billes de protéines G-sépharose. Après lavage, les billes ont été reprises dans 20µl de tampon NT2 et la moitié des immunoprécipitats a été déposée sur gel dénaturant (SDS-PAGE, 10%). Les niveaux de protéines P62 et HuR ont été déterminés à l'aide des anticorps adéquats.

étaient le plus fortement et significativement augmenté, et avons recherché la présence de motifs de type ARE au niveau de leurs séquences (analyses « in silico »), ces motifs constituant des sites de liaison potentiels pour HuR : nous avons ainsi dégagé trois gènes candidats ULK1, WIPI1 et DRAM1, des acteurs clés du processus autophagique pouvant potentiellement interagir et être stabilisés par HuR, ce qui expliquerait le phénotype précédemment observé (Figure 40). Un examen de la bibliographie nous a en outre permis d'identifier un quatrième candidat potentiel, l'ARNm Atg5.

Néanmoins, malgré l'intérêt et l'originalité que représentait la mise en évidence d'un contrôle du processus autophagique par l'ARE-BP HuR, nous n'avons pas pu, faute de temps, pousser plus loin nos investigations et regrettons de ne pas avoir eu l'occasion de réaliser la validation fonctionnelle du rôle de HuR vis-à-vis des candidats mentionnés ci-dessus.

- Potentiel implication de HuR dans la sélectivité du processus autophagique vis-à-vis de cargos de nature ribonucléoprotéique

Pour finir, à la lumière des résultats précédemment mentionnés, nous avons souhaité tester une dernière hypothèse, selon laquelle HuR pourrait être impliquée dans la sélectivité du processus autophagique.

Cette hypothèse se base sur plusieurs observations. En premier lieu, des travaux très récents ont démontré que le processus autophagique participait à la dégradation sélective de certains ARN (on parle de RNAAutophagie) par un mécanisme encore mal élucidé mais nécessitant la protéine adaptatrice P62, qui est connue comme pouvant interagir avec des cargos polyubiquitylés. HuR fait justement l'objet de nombreuses modifications post-traductionnelles, et peut précisément être régulée par polyubiquitylation : nous nous sommes ainsi demandés si cette ARE-BP pourrait participer au processus décrit ci-dessus, en favorisant la dégradation sélective de certains de ses ARNm cibles par autophagie.

Nos investigations dans ce domaine demeurent tout à fait « embryonnaires », cependant nous avons obtenu un premier résultat préliminaire compatible avec cette observation. Nous avons effectivement souhaité vérifier si, dans les LAGC ALK+, l'ARE-BP HuR pouvait bel et bien interagir avec la protéine P62 (Figure 41). Nous avons pour cela réalisé une co-immunoprécipitation des deux partenaires potentiels, et nos résultats sembleraient indiquer que ces deux protéines puissent être retrouvées dans un même complexe.

La piste d'une dégradation de transcrits HuR-dépendante par autophagie constitue donc à l'heure actuelle une hypothèse tout à fait pertinente qui nécessite une exploration plus poussée.

DISCUSSION GENERALE

L'équipe dans laquelle j'ai réalisé ma thèse porte un intérêt historique aux Lymphomes Anaplasiques à Grandes Cellules exprimant l'oncogène ALK (LAGC ALK+). Ces lymphomes de type T, rares, agressifs et principalement pédiatriques, sont encore à l'heure actuelle majoritairement traités par chimiothérapie. Toutefois, grâce à l'essor récent des thérapies ciblées, plusieurs inhibiteurs pharmacologiques ciblant l'activité tyrosine kinase de ALK, principal moteur de la tumorigénèse, ont pu voir le jour et sont actuellement en cours de développement. Le premier d'entre eux à avoir été mis au point, le crizotinib, est d'ores et déjà utilisé en clinique dans le traitement des cancers du poumon non à petites cellules ALK+ (NSCLC), et s'est jusqu'à présent montré prometteur au cours des différents essais cliniques auxquels il a été soumis pour le traitement des LAGC ALK+. Cette molécule devrait donc très prochainement rejoindre l'arsenal thérapeutique à disposition des cliniciens pour la prise en charge des patients atteints de LAGC ALK+.

Cependant, dans ces deux pathologies, des cas de résistance ont déjà été rapportés. Concernant les LAGC ALK+, mon équipe d'accueil a mis en évidence que le traitement par le crizotinib induisait un fort flux autophagique à l'effet cytoprotecteur, limitant l'effet de la drogue, et qui pourrait potentiellement permettre aux cellules malignes de supporter le traitement jusqu'à la mise en place de mécanismes de résistance secondaires, telles que des mutations de la tyrosine kinase.

La première partie de mon projet de thèse s'inscrit dans la continuité de ces travaux, puisque mes données permettent d'établir un lien entre la fonction de l'autophagie induite en réponse au crizotinib dans les LAGC ALK+ et le niveau d'expression de Bcl-2, véritable verrou moléculaire du flux autophagique.

En effet, partant d'une constatation réalisée dès 2001 par mon équipe selon laquelle les LAGC exprimant l'oncogène ALK semblaient spécifiquement être dépourvues de l'expression de l'oncogène Bcl-2, je me suis dans un premier temps attaché à démontrer les points suivants :

- L'expression de l'oncogène Bcl-2 est inhibée par l'activité tyrosine kinase de ALK
- Lors d'un traitement par le crizotinib, la perte de cette activité restaure l'expression de l'oncogène Bcl-2
- La ré-expression de Bcl-2 limite l'efficacité anti-tumorale de la drogue, en limitant l'induction d'apoptose et en conférant un caractère cytoprotecteur au flux autophagique induit

Parallèlement, j'ai tenté d'identifier les mécanismes moléculaires gouvernant la mise en silence de Bcl-2 dans les LAGC exprimant ALK. Les résultats que j'ai obtenus suggèrent les points suivants :

- Le mécanisme de mise en silence de l'expression de Bcl-2 dans les LAGC ALK+ semble s'opérer, tout au moins en partie, au niveau post-transcriptionnel
- Ce mécanisme fait intervenir la protéine de liaison aux ARNm HuR, en coopération avec un ou plusieurs miARN, notamment miR-34a

Enfin, des données particulièrement originales et intéressantes obtenues au cours de ma thèse m'ont amené à m'intéresser au rôle potentiel de HuR dans la régulation du processus autophagique, que ce soit au niveau basal ou bien en réponse à différents traitements (carence en nutriments, chimiothérapie et traitement ciblé). Mes résultats indiquent que :

- L'expression de HuR joue un rôle majeur dans le processus autophagique des LAGC ALK+, puisqu'une déplétion en cette protéine de liaison aux ARNm dans ces lymphomes bloque tout flux autophagique, qu'il soit basal, ou bien induit par un stress
- HuR pourrait être impliquée dans le phénomène récemment décrit de « RNautophagy »

Rôle de Bcl-2 dans les LAGC ALK+ et sur la fonction de l'autophagie induite par le crizotinib

J'ai démontré au cours de ma thèse que l'expression de NPM-ALK induisait une inhibition de l'expression de Bcl-2, ce mécanisme de répression dépendant de l'activité tyrosine-kinase de ce puissant oncogène. Si cette corrélation inverse entre l'expression de deux oncogènes forts, ALK et Bcl-2, paraît surprenante, elle est à replacer dans le contexte d'une surexpression ALK-dépendante de la protéine anti-apoptotique Mcl-1, fonctionnellement redondante avec Bcl-2, négligeant potentiellement tout avantage apporté par l'expression de Bcl-2 en conditions normales dans les cellules de LAGC ALK+. En revanche, l'exclusion mutuelle entre ALK et Bcl-2 s'avère finalement « bénéfique » pour la cellule maligne puisque mes données montrent que l'inactivation de ALK (par exemple lors d'un traitement par le crizotinib) s'accompagne d'une induction de l'expression de Bcl-2, qui joue donc un rôle de « disjoncteur pro-oncogénique » en compensant la perte de l'expression de Mcl-1.

Nous pouvons également relever ici que, selon des données préliminaires que j'ai obtenues (données non montrées), les taux de Bcl-xL, protéine qui présente des fonctions similaires à Bcl-2 dans les processus apoptotiques et autophagiques, ne semblent pas varier en réponse au traitement par le crizotinib (données non montrées), ce qui place véritablement Bcl-2 au cœur du mécanisme que nous décrivont.

Cette exclusion mutuelle entre ALK et Bcl-2, au bénéfice de la cellule, apparaît de plus comme un point capital vis-à-vis des stratégies actuellement envisagées pour contourner les mutations rendant ALK insensible au crizotinib. En effet, l'espoir est actuellement placé dans le développement d'inhibiteurs

de ALK dits « de seconde génération » tels que le brigatinib, l'alectinib ou le ceritinib, brièvement évoqués en introduction. Ces inhibiteurs ont, pour la plupart, été spécialement mis au point afin d'outrepasser de telles mutations de ALK ; néanmoins, les données que j'ai obtenues au cours de la thèse montrent que garantir l'inhibition de ALK ne permettra pas de résoudre le problème posé par la mise en place d'un mécanisme de résistance adaptative, à savoir la ré-expression de Bcl-2. Ce constat est étayé par mes expériences d'extinction de ALK par interférence à l'ARN, qui se traduisent également par une hausse du taux de Bcl-2, et qui soulignent la nécessité d'adjoindre à toute thérapie ciblant ALK une stratégie d'inhibition de Bcl-2 pour garantir un effet thérapeutique maximal.

Comme mentionné en introduction, il existe à l'heure actuelle différentes stratégies d'inhibition de Bcl2 : l'utilisation de peptides «BH3-mimétiques », cette approche pharmacologique rencontrant fréquemment des problèmes de toxicité³²¹, ou bien l'utilisation de petits ARN ciblant l'ARNm Bcl2 (siARNs ou miARNs), ce ciblage moléculaire reposant sur le mécanisme physiologique d'ARN interférence. C'est ce type d'approche que nous avons préféré utiliser dans le cadre de ce travail de thèse, pour les raisons décrites en fin d'introduction.

Dans les LAGC ALK+, l'inhibition de Bcl-2 couplée au traitement par le crizotinib s'accompagne d'une perte massive de la viabilité cellulaire, bien supérieure à celle observée en réponse au traitement par le crizotinib seul. Cette perte de viabilité repose non seulement sur une augmentation de l'apoptose en réponse au crizotinib, mais également sur une intensification du flux autophagique. L'analyse plus fine de ce flux démontre que cette intensification du flux se traduit par une modification de sa fonction : de cytoprotectrice, cette autophagie devient délétère pour les cellules.

L'augmentation de la mort par apoptose ne nous a effectivement pas semblé pouvoir expliquer intégralement la perte massive de viabilité observée lors de l'utilisation de cette combinaison; une perte ne pouvant pas non plus être attribuée à un effet sur la prolifération. En revanche, lorsque nous avons réitéré les mesures de viabilité cellulaire en inhibant de surcroît l'autophagie, nous avons mis en évidence une totale réversion de l'effet potentialisateur initialement induit par la combinaison « perte de Bcl-2/crizotinib ». Cet effet potentialisateur requiert donc une machinerie autophagique fonctionnelle pour être généré.

Deux points importants ressortent de ces résultats :

- 1) l'inhibition de l'autophagie réverse intégralement l'effet potentialisateur généré par la perte de Bcl-2 ce qui implique *de facto* que l'apoptose accrue observée suite à la perte de Bcl-2 requiert un processus autophagique fonctionnel pour sa mise en place ;

- 2) la perte de viabilité ne pouvant être attribuée ni à une augmentation de l'apoptose, ni à un arrêt plus marqué de la prolifération, relève d'un mécanisme de mort « dépendant de l'autophagie » autre que l'apoptose.

Ces deux points sont particulièrement intéressants et ouvrent plusieurs possibilités.

Le point 1) suggère que l'autophagie préalablement cytoprotectrice (induite par le crizotinib), qui limitait l'induction d'apoptose par la drogue, se place au service de celle-ci lorsqu'elle est accrue suite à la perte de Bcl-2. Cela pourrait s'expliquer par le fait que cette autophagie accrue dégraderait de manière plus importante certains facteurs anti-apoptotiques, sensibilisant ainsi les cellules à l'apoptose induite par la drogue. Un tel mécanisme a déjà été décrit par le groupe du Pr Thorburn, avec la dégradation du facteur anti-apoptotique FAP-1 sensibilisant les cellules à l'apoptose induite par Fas. Le point 1) pourrait aussi s'expliquer par le fait que les autophagosomes pourraient servir de plateforme de signalisation facilitant le déroulement de l'apoptose, comme rapporté dans la littérature, un rôle pro-apoptotique de l'autophagie qui serait masqué lorsque le taux de protéine anti-apoptotique Bcl-2 serait trop élevé lors d'un traitement par le crizotinib.

Le point 2) pourrait suggérer que, similairement, l'autophagie suite à l'inhibition de Bcl-2 pourrait se placer au service d'un mécanisme de mort cellulaire autre que l'apoptose. Il pourrait s'agir d'une mort par nécroptose, comme proposé dans certaines études, qui nécessiterait elle aussi une machinerie autophagique fonctionnelle afin de générer les membranes autophagosomales indispensables à la signalisation de ce type de mort.

Une explication alternative au point 2) pourrait également résider dans une intensification du flux autophagique telle, qu'elle aboutirait à la mort par autodigestion, lorsque Bcl-2 n'est plus présent pour « limiter » l'autophagie à un processus de réponse au stress favorisant la survie des cellules en réponse à des stress notamment thérapeutiques.

De manière générale, et dans la continuité des travaux précédemment menés dans mon équipe, ces résultats soulignent le bénéfice crucial que pourrait apporter la modulation de l'autophagie dans le traitement des LAGC ALK+ en soutenant l'effet thérapeutique d'inhibiteurs de l'activité tyrosine-kinase de ALK, à la manière de ce qui a été décrit dans les leucémies myéloïdes chroniques avec l'imatinib.

II. Mécanisme de répression de l'expression de Bcl-2 au niveau post-transcriptionnel dans les LAGC ALK+

La perspective principale de ce travail était, outre une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires à l'œuvre dans notre modèle d'étude, les LAGC ALK+, celle d'une potentielle transposition de ce mécanisme dans d'autres cancers hématologiques surexprimant Bcl-2, tels que les lymphomes B diffus à grandes cellules par exemple.

Le mécanisme de répression de Bcl-2 que nous avons commencé à mettre en évidence dans les LAGC ALK+ semble opérer, du moins en partie, au niveau post-transcriptionnel, et reposer sur une action synergique de l'ARE-BP HuR et du miR-34a sur le transcrit Bcl-2.

Le constat de l'implication de HuR dans la répression de Bcl-2 est particulièrement intéressant pour deux raisons. En premier lieu, car HuR est décrite dans d'autres modèles, notamment le cancer de la prostate, comme protégeant le transcrit Bcl-2 de l'effet répresseur du miR-34a. La mise en évidence d'un effet inverse dans les LAGC ALK+ nous amène donc à formuler l'hypothèse selon laquelle dans ces cellules, la phosphorylation de HuR sur tyrosine induit une modulation radicale de sa fonction vis-à-vis du transcrit Bcl-2. En second lieu, l'implication de HuR paraît avantageuse, car cette ARE-BP est exprimée de façon ubiquitaire par les cellules de l'organisme, et une modulation de son activité (si elle est délivrée de manière sélective) pourrait ainsi potentiellement permettre de mimer le mécanisme de répression de Bcl-2 observé dans les LAGC ALK+ dans d'autres types de cellules malignes.

Toutefois, il faut relever ici les limites du travail réalisé au cours de ma thèse quant à cette dissection moléculaire du mécanisme réprimant l'expression de Bcl-2 dans les LAGC ALK+. En effet, il est nécessaire de rappeler que la démonstration du mécanisme de coopération entre l'ARE-BP HuR et le miR-34a pour réprimer l'ARNm Bcl-2 demeure à ce jour incomplète. Si nous sommes parvenus à montrer que le miR-34a nécessitait la présence de l'ARE-BP HuR pour exercer son rôle de régulateur négatif sur le transcrit Bcl-2, nous n'avons pas encore mis en évidence l'existence d'un complexe ternaire composé de HuR/miR-34/ARNm Bcl-2, ce qui permettrait de formellement valider le modèle que nous proposons. La mise en évidence d'un tel complexe devra passer par la réalisation d'expériences de co-immunoprécipitation de complexes ribonucléoprotéiques, avec des étapes de purification successives des trois partenaires cités plus haut.

De plus, nous ne pouvons exclure l'implication de miARN ainsi que d'ARE-BP autres que HuR dans la mise en place de la répression de Bcl-2. Concernant d'autres miARN, notons par exemple que de récentes données obtenues dans l'équipe indiquent que le miR-7 pourrait également participer à la répression de Bcl-2 dans les LAGC ALK+ bien que de façon indirecte, aucune interaction moléculaire entre le miARN et le transcrit Bcl-2 n'ayant pu être démontré dans les LAGC ALK+. Concernant d'autres

ARE-BP potentiellement impliquées, il pourrait s'agir d'AUF1, qui est exprimée dans les LAGC ALK+, et qui est décrite à la fois comme pouvant déstabiliser le transcrit Bcl-2, et agir en synergie avec l'ARE-BP HuR pour déstabiliser des transcrits cibles communs tels que le transcrit p16 dans des cellules HeLa³²².

Enfin, bien qu'à ce stade de la démonstration l'interaction entre HuR et le transcrit Bcl-2 soit avérée dans les LAGC ALK+, on ne peut pas non plus exclure un rôle indirect de cette ARE-BP. Un tel rôle pourrait par exemple passer par une stabilisation du transcrit DNMT3b, une ADN méthyl transférase, décrite comme cible de HuR. DNMT3b, responsable de la répression de l'expression des gènes au niveau épigénétique, pourrait ainsi contribuer à la mise en silence de Bcl-2 mais au niveau transcriptionnel cette-fois.

II. L'ARE-BP HuR : un nouveau régulateur clé de l'autophagie ?

L'implication de HuR dans la régulation de l'expression de Bcl-2 m'a amené à m'intéresser à un rôle potentiellement plus large de cette ARE-BP dans la régulation de l'autophagie.

Les données préliminaires que j'ai obtenues au cours de ma thèse m'ont permis de mettre à jours une fonction de HuR qui n'avait encore jamais été décrite auparavant : l'expression de cette ARE-BP est en effet requise, à la fois pour que le processus autophagique basal puisse avoir lieu de manière physiologique, mais aussi pour la mise en place d'un flux autophagique en réponse à des stress nutritionnels et thérapeutiques (crizotinib) ; Si pour l'instant nos données se limitent à notre modèle d'étude, une lignée de LAGC ALK+, le caractère ubiquitaire de l'expression de HuR, ainsi que du processus autophagique, offrent des perspectives de recherche plus larges dans une grande variété d'autres modèles physiopathologiques.

Une analyse *in silico* préliminaire ainsi qu'un examen minutieux de la bibliographie m'ont permis de dégager plusieurs cibles potentielles de HuR qui pourraient expliquer l'effet observé. HuR pourrait ainsi éventuellement se lier et stabiliser les transcrits ULK1, WIPI1, AMBRA1 et Atg5, des acteurs clés de la machinerie autophagique intervenant à différents stades du processus, et donc permettre le bon déroulement de ce dernier, au niveau basal comme en conditions de stress.

Notons également que l'observation de ce rôle de régulateur positif de HuR vis-à-vis du processus autophagique apparaît finalement cohérent, si l'on considère plusieurs études pionnières qui décrivent une surexpression et/ou une relocalisation de HuR vers le cytoplasme suite à l'hypoxie ou la carence en nutriments³²³.

Malgré ces observations relativement anciennes, le seul lien préalablement établis entre HuR et processus autophagique concerne la faculté de cette ARE-BP à lier et stabiliser l'ARNm P62, n'affectant en cela que la sélectivité du processus vis-à-vis de certains cargos.

Concernant ce dernier point, il est fascinant de constater que, dans les LAGC, l'ARE-BP HuR semble pouvoir interagir avec **la protéine** P62. Les fonctions cytoplasmiques de HuR consistant principalement en la régulation de la demi-vie des ARNm, cette observation réalisée pendant ma thèse nous amène à nous interroger sur le fait que cette ARE-BP pourrait également permettre la dégradation sélective par autophagie de complexes ribonucléoprotéiques, un mécanisme récemment décrit et évoqué en introduction : HuR participerait ainsi à une nouvelle voie récemment décrite du métabolisme des ARN, la RNAutophagy^{250,251}.

Conclusion

Pour conclure, mes travaux de thèse couvrent deux axes de recherche historiquement chers à mon équipe d'accueil: l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la tumorigenèse des LAGC ALK+, ainsi que l'optimisation thérapeutique de ces derniers. Ces résultats apportent une lumière nouvelle sur 1) la contribution, dans ces mécanismes, du dialogue entre protéines de liaison aux motifs ARE et les miARNs, deux acteurs majeurs du contrôle post-transcriptionnel de l'expression génique, et 2) le rôle du processus autophagique et les effets de sa modulation.

Sous-réserve d'approfondissements futurs et d'une validation du rôle de HuR dans les mécanismes de régulation de l'expression de Bcl-2, mais aussi du processus autophagique en général, mes travaux de thèse offrent des perspectives thérapeutiques concrètes pour l'amélioration de la prise en charge des LAGC ALK+, et ouvrent de nouvelles pistes de réflexion quant au rôle des protéines de liaison aux ARN et des miARN dans la régulation du processus autophagique.

MATERIEL ET METHODES

Culture cellulaire, réactifs et anticorps :

Les lignées humaines de LAGC (COST, Karpas-299: lignées ALK+ et FEPD: lignées ALK-), ont été cultivées dans du milieu Iscove Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (Gibco BRL, Carlsbad, CA), 15% SVF, Pénicilline (100U/mL), Streptavidine (100µg/mL), Glutamine (2mM), Pyruvate (1mM). Afin d'inhiber l'activité tyrosine kinase de ALK, les lignées ALK+ ont été cultivées pendant 15h en présence ou en absence d'un inhibiteur spécifique de ALK, le PF-234106(Crizotinib), à une concentration finale de 1µM.

Transfection de petits ARN interférents (siRNA) et de précurseurs de microARNs (pré-miR)

Les petits ARN interférents (siRNA) dirigés soit contre *HuR* (5'-AAGAGGCAATTACCAGTTTCA-3'), soit contre *ALK* (5'-GGGCGAGCTACTATAGAAA-3'), soit contre *Ago2* (5'-GGTCTAAAGGTGGAGATAA-3') ou le petit ARN interférent contrôle ("siRNA Validated Negative Control", Eurogentech) ont été utilisés à une concentration finale de 100nM. De même, des précurseurs de miARN tels que le miR-34a (hsa-miR-34a-5p, Ambion) ou un miARN contrôle (miR™ miRNA Precursor Negative Control, Ambion), ont été utilisés à cette même concentration. Ces siRNA/miARN ont été introduits dans les différentes lignées de LAGC ALK+ par électroporation. Après lavage des cellules dans du PBS, 5×10^6 cellules ont été reprises dans 400µL de milieu IMDM sans sérum ni antibiotiques, déposées dans une cuve d'électroporation en présence de 5µL de siRNA (100µM) ou de miARN puis soumises à un choc électrique (950µF-260V-200Ω). Les cellules ont ensuite rapidement été transvasées dans 5mL finaux de milieu complet avec sérum et antibiotiques. Après 48h, la moitié des cellules (i.e pour chaque condition) a été utilisée pour suivre l'effet de chaque siRNA ou miARN sur les quantités de protéines ALK, HuR, Ago2 et Bcl-2 par Western Blot, l'autre moitié pour extraire les ARN et quantifier les taux d'ARNm *ALK*, *HuR*, *Ago 2* et *Bcl-2* ou de miR-34a par RT-qPCR.

Western Blot:

Les culots cellulaires (1 à 10×10^6 cellules) ont été lysés dans 50 à 100µL de tampon RIPA (20mM Tris Base pH=7,5, 150mM NaCl, 4mM EDTA, 0,5% Triton X100, 0,2% SDS), auxquels ont été ajoutés extemporanément des inhibiteurs de protéases: "Cocktail d'Inhibiteur de Protéases" (Roche, Indianapolis, USA), Na₃VO₄ (1mM), NaF (20mM) et PMSF (1mM). Après sonication et centrifugation à 12000 rcf/g pendant 10 minutes à 4°C, la concentration protéique a été déterminée par la méthode de Bradford (voir plus bas).

Entre 50 et 60µg de protéines ont ensuite été déposés sur gel SDS-PAGE 10%, puis transférés sur membrane de nitrocellulose. La membrane a été saturée pendant 1h à température ambiante dans un tampon de blocage (PBS / 0.2% Tween, 1%BSA, 1% Lait). La membrane a été incubée une nuit à 4°C avec un anticorps primaire dirigé soit contre HuR (1/1000, 3A2, Santa Cruz), soit contre Bcl-2 (1/500, M0887, Dako), soit contre ALK (Sp8, Dako), soit contre ALK phosphorylée sur tyrosine (1/1000, anti-

phosphoALKY1604, Cell Signalling Technology), soit contre l'actine (1/1000, AC-40, Sigma Aldrich, France), soit contre GAPDH (1/1000, MAB374, Sigma), soit contre Ago2 (1/1000, C34C6, Cell Signalling Technology). Après 3 lavages de 10 minutes dans du PBS / 0.2% Tween (PBS-T), la membrane a été incubée 1 heure à température ambiante avec les anticorps secondaires adaptés couplés à la peroxydase (HRP). Après un nouveau cycle de 3 rinçages au PBS-T, la détection des protéines a été réalisée par chimioluminescence avec le système ECL (Amersham biosciences, Orsay, France).

Dosage protéique: "Biorad Protein Assay" basé sur la méthode de Bradford

Pour doser les concentrations en protéine de nos lysats cellulaires, nous avons déposé 190µL de réactif Biorad (Bradford) dilué au 1/5 dans le nombre adéquat de puits d'une plaque "96 puits". Nous avons ensuite ajouté un volume de 10µL, soit de BSA à partir d'une gamme étalon (0,1 à 1µg), soit de lysat protéique (dilué en général au 1/10 ou au 1/50), et avons enfin mesuré l'absorbance à 595nm de nos puits, à l'aide d'un spectrophotomètre (Mithras LB940, Berthold").

Co-Immunoprécipitations (Co-IP):

De 10 à 90x10⁶ cellules ont été lysées dans 100 à 900µL de tampon «Co-IP» (Tris HCl pH 7,5 20mM; NaCl 150mM, NP40 0,2%; Glycérol 10%) + inhibiteurs de protéases (voir Western Blot). Les lysats ont ensuite été soniqués (2 pulses de 10sec) et centrifugés pendant 15 minutes à 12000 rcf/g à 4°C puis, après dosage de la concentration en protéine des différents lysats, les surnageants ont été incubés en présence de 10µL de culot sec de billes de sépharose couplées à la protéine G ("G-Sépharose 4B-Fast Flow", Sigma Aldrich) pour l'étape de clarification. Parallèlement, 30µL de culot sec de billes de protéine G-Sépharose ont été incubées 1h à 4°C dans 500µL de tampon NT2 (50mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1mM MgCl₂, 0.05% nonidet-P40) en présence de BSA (100µg/mL final) pour l'étape de saturation des billes. Le surnageant clair (1mg protéines / Co-IP) a ensuite été incubé une nuit à 4°C sur une roue en présence de 30µL de billes saturées en BSA et de 5 à 10µg d'anticorps. Le lendemain matin, les billes ont été lavées 3 fois dans 500µL de tampon NT2. Après le dernier lavage, les billes ont été re-suspendues dans 40µL de tampon NT2 et un aliquot de 16µL a été déposé sur gel SDS-PAGE, ainsi qu'un volume de surnageant clair équivalent à 30µg de protéines («input»), afin d'analyser par western-blot les protéines (co)-immunoprécipitées.

Immunoprécipitation (IP) des complexes protéines-ARN (RNA-IP):

De 10 à 50x10⁶ cellules ont été lysées dans 100 à 500µL de tampon "CYTO" (10mM Hepes pH 7,6, 40mM KCl, 3mM MgCl₂, 2mM DTT, 5% Glycerol, 0,5% NP) + inhibiteurs de protéases (voir Western Blot) + RNase OUT, pendant 1 heure à -80°C. Le protocole suivi a ensuite été identique à celui des co-IP jusqu'à l'étape de lavage. Après le dernier lavage, les billes ont été re-suspendues dans 100µL de

tampon NT2: un aliquot (10 μ L) a été utilisé afin de vérifier l'efficacité de l'IP sur gel SDS-PAGE, et les 100 μ L restant ont été utilisés pour extraire les ARN (par la technique au TRIzol) afin d'analyser par RT-qPCR la nature et la quantité des ARN (messagers ou miRNA) liés aux protéines HuR immunoprécipitées.

Extraction d'ARN:

Les ARN totaux ont été extraits à partir de culots de 5x10⁶ cellules, en utilisant le réactif "TRIzol" (Invitrogen, France). La concentration des ARN a été déterminée par dosage spectrophotométrique (Appareil "Nanodrop").

RT-qPCR:

La synthèse d'ADNc a été réalisée à partir de 1 μ g d'ARN total en utilisant la SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen, France) ainsi qu'un mélange d'amorces oligo-dT et de random hexamères (Invitrogen, France). En fin de réaction, la RNase H a été ajoutée (1 μ L dans 20 μ L finaux) afin de digérer la matrice ARN initiale. L'absence de contamination par de l'ADN génomique a été vérifiée par PCR classique via des amorces RAF (5'-GATGCAATTCGAAGTCACAGCG-3' et 5'-TTTTCTCCTGGTCCCAGATA-3'). La qPCR a été réalisée à l'aide du Master mix 2X "PCR SyberGreen for light cyclor 480" (Roche) à partir de 2 μ L de cDNA dilués au 1/10 dans un volume final de 20 μ L sur le LightCycler 480 de Roche. Les amorces Bcl-2 (5'-CTGGTGGGAGCTTGCATCAC -3' et 5' -ACAGCCTGCAGCTTTGTTTC3'), GAPDH (5'-ACTGCCAACGTGTCAGTGG-3' et 5'-CACCTGTTGCTGTAGCCA-3'), Ago2 (5'-CCGCGTCTGCAATGTGACCC-3' et 5'-GGGGTAGCGCAGAACCAAC-3'), HuR (5'-CGTGACCGGAAGGATGCAG-3' et 5'-CGGGAGCCCGCTGATGTACA-3') ont été utilisées à une concentration finale de 200nM. La PCR a consisté en 45 cycles à 95°C 10sec -60°C 10sec, après une phase initiale d'incubation de 5min à 95°C (Hot start). La spécificité des produits a été évaluée en générant une courbe de dissociation. Toutes les amplifications ont été réalisées en duplicat. Le traitement des données de quantification a été effectué selon la « méthode des courbes standards » (détermination de l'efficacité des différents couples d'amorces)

Concernant les microARN, la synthèse d'ADNc «microARN spécifique» a été réalisée à partir de 10ng d'ARN total, en utilisant le kit «TaqMan® microRNA reverse transcription kit» (Applied Biosystems). Le miR-34a mature a premièrement été rétro-transcrit en ADNc puis la PCR quantitative a été réalisée à partir de 3 μ L d'ADNc (dilué au 1/2) dans un volume final de 15 μ L comprenant le couple d'amorces spécifique de l'ADNc d'intérêt, et 7.5 μ L du réactif Taqman® 2X Universal PCR master mix. Les données ont été normalisées par rapport à un petit ARN nucléolaire, RNU24. La PCR a consisté en 45 cycles à 95°C 15 sec, et 60°C 1 minute, après une phase initiale d'incubation de 10 min à 95°C. L'ensemble des RT-PCR quantitative ont été réalisées sur un appareil LightCycler 480 (Roche). Toutes les amplifications

ont été réalisées en duplicat. Les valeurs de Ct (threshold cycle) ont été déterminées par le logiciel du thermocycleur (LightCycler 480, Roche). Le traitement des données de quantification a été effectué selon la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

BIBLIOGRAPHIE

1. Stein H, Mason DY, Gerdes J, et al. The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood*. 1985;66(4):848–858.
2. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*. 1994;84(5):1361–1392.
3. Delsol G. [The 2008 WHO lymphoma classification]. *Ann. Pathol.* 2008;(1):S20–4.
4. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, et al. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011;117(19):5019–5032.
5. Lamant L, de Reyniès A, Duplantier M-M, et al. Gene-expression profiling of systemic anaplastic large-cell lymphoma reveals differences based on ALK status and two distinct morphologic ALK+ subtypes. *Blood*. 2007;109(5):2156–2164.
6. Savage KJ, Harris NL, Vose JM, et al. ALK- anaplastic large-cell lymphoma is clinically and immunophenotypically different from both ALK+ ALCL and peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified: report from the International Peripheral T-Cell Lymphoma Project. *Blood*. 2008;111(12):5496–5504.
7. Wright D, McKeever P, Carter R. Childhood non-Hodgkin lymphomas in the United Kingdom: findings from the UK Children's Cancer Study Group. *J. Clin. Pathol.* 1997;50(2):128–134.
8. Hochberg J, Waxman IM, Kelly KM, Morris E, Cairo MS. Adolescent non-Hodgkin lymphoma and Hodgkin lymphoma: state of the science. *Br. J. Haematol.* 2009;144(1):24–40.
9. Le Deley M-C, Reiter A, Williams D, et al. Prognostic factors in childhood anaplastic large cell lymphoma: results of a large European intergroup study. *Blood*. 2007;111(3):1560–1566.
10. Falini B, Pileri S, Zinzani PL, et al. ALK+ lymphoma: clinico-pathological findings and outcome. *Blood*. 1999;93(8):2697–2706.
11. Fraga M, Brousset P, Schlaifer D, et al. Bone marrow involvement in anaplastic large cell lymphoma. Immunohistochemical detection of minimal disease and its prognostic significance. *Am. J. Clin. Pathol.* 1995;103(1):82–89.
12. Bonzheim I, Steinhilber J, Fend F, Lamant L, Quintanilla-Martinez L. ALK-positive anaplastic large cell lymphoma: an evolving story. *Front. Biosci. (Schol. Ed)*. 2015;7:248–259.
13. Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer Res.* 1971;31(11):1860–1861.
14. Murphy SB. Classification, staging and end results of treatment of childhood non-Hodgkin's lymphomas: dissimilarities from lymphomas in adults. *Semin. Oncol.* 1980;7(3):332–339.
15. Stein H, Foss HD, Dürkop H, et al. CD30(+) anaplastic large cell lymphoma: a review of its histopathologic, genetic, and clinical features. *Blood*. 2000;96(12):3681–3695.
16. Benharroch D, Meguerian-Bedoyan Z, Lamant L, et al. ALK-positive lymphoma: a single disease with a broad spectrum of morphology. *Blood*. 1998;91(6):2076–2084.
17. Swerdlow SH, International Agency for Research on Cancer., World Health Organization. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. International Agency for Research on Cancer; 2008.
18. Lamant L, McCarthy K, D'Amore E, et al. Prognostic impact of morphologic and phenotypic features of childhood ALK-positive anaplastic large-cell lymphoma: results of the ALCL99 study. *J.*

- Clin. Oncol.* 2011;29(35):4669–4676.
19. Pileri S, Falini B, Delsol G, et al. Lymphohistiocytic T-cell lymphoma (anaplastic large cell lymphoma CD30+/Ki-1 + with a high content of reactive histiocytes). *Histopathology*. 1990;16(4):383–391.
 20. Kinney MC, Collins RD, Greer JP, et al. A small-cell-predominant variant of primary Ki-1 (CD30)+ T-cell lymphoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 1993;17(9):859–868.
 21. Matsuyama H, Suzuki HI, Nishimori H, et al. miR-135b mediates NPM-ALK-driven oncogenicity and renders IL-17-producing immunophenotype to anaplastic large cell lymphoma. *Blood*. 2011;118(26):6881–6892.
 22. Turner SD, Lamant L, Kenner L, Brugières L. Anaplastic large cell lymphoma in paediatric and young adult patients. *Br. J. Haematol.* 2016;173(4):560–572.
 23. ten Berge RL, Snijdwint FG, von Mensdorff-Pouilly S, et al. MUC1 (EMA) is preferentially expressed by ALK positive anaplastic large cell lymphoma, in the normally glycosylated or only partly hypoglycosylated form. *J. Clin. Pathol.* 2001;54(12):933–939.
 24. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, et al. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*. 1994;263(5151):1281–1284.
 25. Iwahara T, Fujimoto J, Wen D, et al. Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene*. 1997;14(4):439–449.
 26. Morris SW, Naeve C, Mathew P, et al. 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*. 1997;14(18):2175–2188.
 27. Roskoski R. Anaplastic lymphoma kinase (ALK): Structure, oncogenic activation, and pharmacological inhibition. *Pharmacol. Res.* 2013;68(1):68–94.
 28. Hallberg B, Palmer RH. Mechanistic insight into ALK receptor tyrosine kinase in human cancer biology. *Nat. Rev. Cancer*. 2013;13(10):685–700.
 29. Liao EH, Hung W, Abrams B, Zhen M. An SCF-like ubiquitin ligase complex that controls presynaptic differentiation. *Nature*. 2004;430(6997):345–350.
 30. Shen L-L, Wang Y, Wang D-Y. Involvement of genes required for synaptic function in aging control in *C. elegans*. *Neurosci. Bull.* 2007;23(1):21–29.
 31. Weiss JB, Suyama KL, Lee HH, Scott MP. Jelly belly: a *Drosophila* LDL receptor repeat-containing signal required for mesoderm migration and differentiation. *Cell*. 2001;107(3):387–398.
 32. Cheng LY, Bailey AP, Leever SJ, et al. Anaplastic lymphoma kinase spares organ growth during nutrient restriction in *Drosophila*. *Cell*. 2011;146(3):435–447.
 33. Guan J, Umapathy G, Yamazaki Y, et al. FAM150A and FAM150B are activating ligands for anaplastic lymphoma kinase. *Elife*. 2015;4:e09811.
 34. Zhang H, Pao LI, Zhou A, et al. Deorphanization of the human leukocyte tyrosine kinase (LTK) receptor by a signaling screen of the extracellular proteome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2014;111(44):15741–15745.
 35. Murray PB, Lax I, Reshetnyak A, et al. Heparin is an activating ligand of the orphan receptor tyrosine kinase ALK. *Sci. Signal*. 2015;8(360):ra6--ra6.
 36. Lemke G, Lew ED. A ligand for ALK. *Sci. Signal*. 2015;8(360):fs2--fs2.

37. Fujimoto J, Shiota M, Iwahara T, et al. 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.* 1996;93(9):4181–4186.
38. Okuwaki M. The Structure and Functions of NPM1/Nucleophosmin/B23, a Multifunctional Nucleolar Acidic Protein. *J. Biochem.* 2007;143(4):441–448.
39. Bischof D, Pulford K, Mason DY, Morris SW. Role of the nucleophosmin (NPM) portion of the non-Hodgkin's lymphoma-associated NPM-anaplastic lymphoma kinase fusion protein in oncogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 1997;17(4):2312–2325.
40. Duyster J, Bai R-Y, Morris SW. Translocations involving anaplastic lymphoma kinase (ALK). *Oncogene.* 2001;20(40):5623–5637.
41. Palmer RH, Vernersson E, Grabbe C, Hallberg B. Anaplastic lymphoma kinase: signalling in development and disease. *Biochem. J.* 2009;420(3):345–361.
42. Penzel R, Schirmacher P, Warth A. A Novel EML4-ALK Variant: Exon 6 of EML4 Fused to Exon 19 of ALK. *J. Thorac. Oncol.* 2012;7(7):1198–1199.
43. Tartari CJ, Gunby RH, Coluccia AML, et al. Characterization of Some Molecular Mechanisms Governing Autoactivation of the Catalytic Domain of the Anaplastic Lymphoma Kinase. *J. Biol. Chem.* 2008;283(7):3743–3750.
44. Shiota M, Fujimoto J, Semba T, et al. Hyperphosphorylation of a novel 80 kDa protein-tyrosine kinase similar to Ltk in a human Ki-1 lymphoma cell line, AMS3. *Oncogene.* 1994;9(6):1567–1574.
45. Chiarle R, Voena C, Ambrogio C, Piva R, Inghirami G. The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2008;8(1):11–23.
46. Zhang Q, Raghunath PN, Xue L, et al. Multilevel dysregulation of STAT3 activation in anaplastic lymphoma kinase-positive T/null-cell lymphoma. *J. Immunol.* 2002;168(1):466–474.
47. Zamo A, Chiarle R, Piva R, et al. Anaplastic lymphoma kinase (ALK) activates Stat3 and protects hematopoietic cells from cell death. *Oncogene.* 2002;21(7):1038–1047.
48. Khoury JD, Medeiros LJ, Rassidakis GZ, et al. Differential expression and clinical significance of tyrosine-phosphorylated STAT3 in ALK+ and ALK- anaplastic large cell lymphoma. *Clin. Cancer Res.* 2003;9(10 Pt 1):3692–3699.
49. Marzec M, Kasprzycka M, Ptasznik A, et al. Inhibition of ALK enzymatic activity in T-cell lymphoma cells induces apoptosis and suppresses proliferation and STAT3 phosphorylation independently of Jak3. *Lab. Invest.* 2005;85(12):1544–1554.
50. Amin HM, Medeiros LJ, Ma Y, et al. Inhibition of JAK3 induces apoptosis and decreases anaplastic lymphoma kinase activity in anaplastic large cell lymphoma. *Oncogene.* 2003;22(35):5399–5407.
51. LAI R, RASSIDAKIS G, LIN Q, et al. Jak3 activation is significantly associated with ALK expression in anaplastic large cell lymphoma. *Hum. Pathol.* 2005;36(9):939–944.
52. Bhattacharya S, Ray RM, Johnson LR. STAT3-mediated transcription of Bcl-2, Mcl-1 and c-IAP2 prevents apoptosis in polyamine-depleted cells. *Biochem. J.* 2005;392(2):335–344.
53. Pearson JD, Lee JKH, Bacani JTC, Lai R, Ingham RJ. NPM-ALK: The Prototypic Member of a Family of Oncogenic Fusion Tyrosine Kinases. *J. Signal Transduct.* 2012;2012:1–14.
54. Groner B, Lucks P, Borghouts C. The function of Stat3 in tumor cells and their microenvironment.

- Semin. Cell {&} Dev. Biol.* 2008;19(4):341–350.
55. Zhang Q, Wang HY, Woetmann A, et al. STAT3 induces transcription of the DNA methyltransferase 1 gene (DNMT1) in malignant T lymphocytes. *Blood.* 2006;108(3):1058–1064.
 56. Lee H, Zhang P, Herrmann A, et al. Acetylated STAT3 is crucial for methylation of tumor-suppressor gene promoters and inhibition by resveratrol results in demethylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012;109(20):7765–7769.
 57. Zhang Q, Wang HY, Liu X, Wasik MA. STAT5A is epigenetically silenced by the tyrosine kinase NPM1-ALK and acts as a tumor suppressor by reciprocally inhibiting NPM1-ALK expression. *Nat. Med.* 2007;13(11):1341–1348.
 58. Hoareau-Aveilla C, Valentin T, Daugrois C, et al. Reversal of microRNA-150 silencing disadvantages crizotinib-resistant NPM-ALK(+) cell growth. *J. Clin. Invest.* 2015;125(9):3505–3518.
 59. Watanabe M, Sasaki M, Itoh K, et al. JunB Induced by Constitutive CD30–Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Activates the CD30 Promoter in Anaplastic Large Cell Lymphoma and Reed-Sternberg Cells of Hodgkin Lymphoma. *Cancer Res.* 2005;65(17):7628–7634.
 60. Staber PB, Vesely P, Haq N, et al. The oncoprotein NPM-ALK of anaplastic large-cell lymphoma induces JUNB transcription via ERK1/2 and JunB translation via mTOR signaling. *Blood.* 2007;110(9):3374–3383.
 61. Kinney MC, Higgins RA, Medina EA. Anaplastic large cell lymphoma: twenty-five years of discovery. *Arch. Pathol. {&} Lab. Med.* 2011;135(1):19–43.
 62. Leventaki V, Drakos E, Medeiros LJ, et al. NPM-ALK oncogenic kinase promotes cell-cycle progression through activation of JNK/cJun signaling in anaplastic large-cell lymphoma. *Blood.* 2007;110(5):1621–1630.
 63. Pearson JD, Lee JKH, Bacani JTC, Lai R, Ingham RJ. NPM-ALK and the JunB transcription factor regulate the expression of cytotoxic molecules in ALK-positive, anaplastic large cell lymphoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2011;4(2):124–133.
 64. Mendoza MC, Er EE, Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem. Sci.* 2011;36(6):320–8.
 65. Wang J, Whiteman MW, Lian H, et al. A Non-canonical MEK/ERK Signaling Pathway Regulates Autophagy via Regulating Beclin 1. *J. Biol. Chem.* 2009;284(32):21412–21424.
 66. Noh DY, Shin SH, Rhee SG. Phosphoinositide-specific phospholipase C and mitogenic signaling. *Biochim. Biophys. Acta.* 1995;1242(2):99–113.
 67. Cussac D, Greenland C, Roche S, et al. Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase of anaplastic large-cell lymphoma recruits, activates, and uses pp60c-src to mediate its mitogenicity. *Blood.* 2003;103(4):1464–1471.
 68. Khwaja A. Akt is more than just a Bad kinase. *Nature.* 1999;401(6748):33–34.
 69. McDonnell SRP, Hwang SR, Basrur V, et al. NPM-ALK signals through glycogen synthase kinase 3 β to promote oncogenesis. *Oncogene.* 2012;31(32):3733–3740.
 70. Gu T-L, Tothova Z, Scheijen B, et al. NPM-ALK fusion kinase of anaplastic large-cell lymphoma regulates survival and proliferative signaling through modulation of FOXO3a. *Blood.* 2004;103(12):4622–4629.

71. Gruss HJ, Dower SK. Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood*. 1995;85(12):3378–3404.
72. Atsaves V, Lekakis L, Drakos E, et al. The oncogenic JUNB/CD30 axis contributes to cell cycle deregulation in ALK+ anaplastic large cell lymphoma. *Br. J. Haematol*. 2014;167(4):514–523.
73. Macalalad AR, McAuliffe M, Yang H, et al. The epidemiology and targeted therapies for relapsed and refractory CD30+ lymphomas. *Curr. Med. Res. Opin*. 2015;31(3):537–545.
74. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2013;15(1):49–63.
75. Yip KW, Reed JC. Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene*. 2008;27(50):6398–6406.
76. Rust R. High expression of Mcl-1 in ALK positive and negative anaplastic large cell lymphoma. *J. Clin. Pathol*. 2005;58(5):520–524.
77. Desjobert C, Renalier M-H, Bergalet J, et al. MiR-29a down-regulation in ALK-positive anaplastic large cell lymphomas contributes to apoptosis blockade through MCL-1 overexpression. *Blood*. 2011;117(24):6627–6637.
78. Rassidakis GZ, Sarris AH, Herling M, et al. Differential Expression of BCL-2 Family Proteins in ALK-Positive and ALK-Negative Anaplastic Large Cell Lymphoma of T/Null-Cell Lineage. *Am. J. Pathol*. 2001;159(2):527–535.
79. Villalva C, Bougrine F, Delsol G, et al. Bcl-2 expression in anaplastic large cell lymphoma. *Am. J. Pathol*. 2001;158(5):1889–1890.
80. Rassidakis GZ, Jones D, Lai R, et al. BCL-2 family proteins in peripheral T-cell lymphomas: correlation with tumour apoptosis and proliferation. *J. Pathol*. 2003;200(2):240–248.
81. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 2007;26(9):1324–1337.
82. López de Silanes I, Quesada MP, Esteller M. Aberrant regulation of messenger RNA 3'-untranslated region in human cancer. *Cell. Oncol*. 2007;29(1):1–17.
83. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843–854.
84. Lee Y, Kim M, Han J, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 2004;23(20):4051–4060.
85. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*. 2004;10(12):1957–1966.
86. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & Dev*. 2003;17(24):3011–3016.
87. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 2001;409(6818):363–366.
88. Braun JE, Huntzinger E, Izaurralde E. The Role of GW182 Proteins in miRNA-Mediated Gene Silencing. *Adv. Exp. Med. Biol*. 2013;768:147–163.
89. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2014;15(8):509–524.
90. Czech B, Hannon GJ. Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nat. Rev. Genet*. 2011;12(1):19–31.
91. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates

- that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005;120(1):15–20.
92. Valinezhad Orang A, Safaralizadeh R, Kazemzadeh-Bavili M. Mechanisms of miRNA-Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation. *Int. J. Genomics*. 2014;2014:970607.
 93. Lee I, Ajay SS, Yook JI, et al. New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites. *Genome Res*. 2009;19(7):1175–1183.
 94. Brümmer A, Hausser J. MicroRNA binding sites in the coding region of mRNAs: Extending the repertoire of post-transcriptional gene regulation. *BioEssays*. 2014;36(6):617–626.
 95. Wakiyama M, Takimoto K, Ohara O, Yokoyama S. Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. *Genes {&} Dev*. 2007;21(15):1857–1862.
 96. Chendrimada TP, Finn KJ, Ji X, et al. MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature*. 2007;447(7146):823–828.
 97. Mathonnet G, Fabian MR, Svitkin Y V, et al. MicroRNA Inhibition of Translation Initiation in Vitro by Targeting the Cap-Binding Complex eIF4F. *Science (80-.)*. 2007;317(5845):1764–1767.
 98. Olsen PH, Ambros V. The lin-4 Regulatory RNA Controls Developmental Timing in *Caenorhabditis elegans* by Blocking LIN-14 Protein Synthesis after the Initiation of Translation. *Dev. Biol*. 1999;216(2):671–680.
 99. Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, Parker R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes {&} Dev*. 2006;20(5):515–524.
 100. Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, et al. Human Argonaute2 Mediates RNA Cleavage Targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell*. 2004;15(2):185–197.
 101. Eystathioy T, Jakymiw A, Chan EKL, et al. The GW182 protein colocalizes with mRNA degradation associated proteins hDcp1 and hLSm4 in cytoplasmic GW bodies. *RNA*. 2003;9(10):1171–1173.
 102. Sen GL, Blau HM. Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat. Cell Biol*. 2005;7(6):633–636.
 103. Merkel O, Hamacher F, Laimer D, et al. Identification of differential and functionally active miRNAs in both anaplastic lymphoma kinase (ALK)+ and ALK- anaplastic large-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2010;107(37):16228–16233.
 104. Dejean E, Renalier MH, Foisseau M, et al. Hypoxia-microRNA-16 downregulation induces VEGF expression in anaplastic lymphoma kinase (ALK)-positive anaplastic large-cell lymphomas. *Leukemia*. 2011;25(12):1882–1890.
 105. Liu C, Iqbal J, Teruya-Feldstein J, et al. microRNA expression profiling identifies molecular signatures associated with anaplastic large cell lymphoma. *Blood*. 2013;122(12):2083–2092.
 106. Spaccarotella E, Pellegrino E, Ferracin M, et al. STAT3-mediated activation of microRNA cluster 17 92 promotes proliferation and survival of ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Haematologica*. 2014;99(1):116–124.
 107. Steinhilber J, Bonin M, Walter M, et al. Next-Generation Sequencing Identifies Deregulation of MicroRNAs Involved in Both Innate and Adaptive Immune Response in ALK+ ALCL. *PLoS One*. 2015;10(2):e0117780.
 108. Shaw G, Kamen R. A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell*. 1986;46(5):659–667.

109. Shyu AB, Belasco JG, Greenberg ME. Two distinct destabilizing elements in the c-fos message trigger deadenylation as a first step in rapid mRNA decay. *Genes & Dev.* 1991;5(2):221–231.
110. Gao M, Wilusz CJ, Peltz SW, Wilusz J. A novel mRNA-decapping activity in HeLa cytoplasmic extracts is regulated by AU-rich elements. *EMBO J.* 2001;20(5):1134–1143.
111. Lin W-J, Duffy A, Chen C-Y. Localization of AU-rich element-containing mRNA in cytoplasmic granules containing exosome subunits. *J. Biol. Chem.* 2007;282(27):19958–19968.
112. Barreau C, Paillard L, Osborne HB. AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res.* 2005;33(22):7138–7150.
113. Bakheet T, Williams BRG, Khabar KSA. ARED 2.0: an update of AU-rich element mRNA database. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(1):421–423.
114. Bakheet T, Williams BRG, Khabar KSA. ARED 3.0: the large and diverse AU-rich transcriptome. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(Database issue):D111–4.
115. Audic Y, Hartley RS. Post-transcriptional regulation in cancer. *Biol. Cell.* 2004;96(7):479–498.
116. Chen CY, Shyu AB. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem. Sci.* 1995;20(11):465–470.
117. Xu N, Chen CY, Shyu AB. Modulation of the fate of cytoplasmic mRNA by AU-rich elements: key sequence features controlling mRNA deadenylation and decay. *Mol. Cell. Biol.* 1997;17(8):4611–4621.
118. Gherzi R, Lee K-Y, Briata P, et al. A KH Domain RNA Binding Protein, KSRP, Promotes ARE-Directed mRNA Turnover by Recruiting the Degradation Machinery. *Mol. Cell.* 2004;14(5):571–583.
119. Lai WS, Carballo E, Strum JR, et al. Evidence that tristetraprolin binds to AU-rich elements and promotes the deadenylation and destabilization of tumor necrosis factor alpha mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 1999;19(6):4311–4323.
120. Stoecklin G, Colombi M, Raineri I, et al. Functional cloning of BRF1, a regulator of ARE-dependent mRNA turnover. *EMBO J.* 2002;21(17):4709–4718.
121. Xu YZ, Di Marco S, Gallouzi I, Rola-Pleszczynski M, Radzioch D. RNA-Binding Protein HuR Is Required for Stabilization of SLC11A1 mRNA and SLC11A1 Protein Expression. *Mol. Cell. Biol.* 2005;25(18):8139–8149.
122. Zhang W, Wagner BJ, Ehrenman K, et al. Purification, characterization, and cDNA cloning of an AU-rich element RNA-binding protein, AUF1. *Mol. Cell. Biol.* 1993;13(12):7652–7665.
123. Gratacós FM, Brewer G. The role of AUF1 in regulated mRNA decay. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* 2010;1(3):457–473.
124. Palanisamy V, Park NJ, Wang J, Wong DT. AUF1 and HuR Proteins Stabilize Interleukin-8 mRNA in Human Saliva. *J. Dent. Res.* 2008;87(8):772–776.
125. Fawal M, Armstrong F, Ollier S, et al. A “liaison dangereuse” between AUF1/hnRNPd and the oncogenic tyrosine kinase NPM-ALK. *Blood.* 2006;108(8):2780–2788.
126. Ishimaru D, Zuraw L, Ramalingam S, et al. Mechanism of Regulation of bcl-2 mRNA by Nucleolin and A+U-rich Element-binding Factor 1 (AUF1). *J. Biol. Chem.* 2010;285(35):27182–27191.
127. Keene JD. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat. Rev. Genet.* 2007;8(7):533–543.

128. Good PJ. A conserved family of elav-like genes in vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1995;92(10):4557–4561.
129. Abdelmohsen K, Gorospe M. Posttranscriptional regulation of cancer traits by HuR. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* 1(2):214–229.
130. Wang X, Tanaka Hall TM. Structural basis for recognition of AU-rich element RNA by the HuD protein. *Nat. Struct. Biol.* 2001;8(2):141–145.
131. Fialcowitz-White EJ, Brewer BY, Ballin JD, et al. Specific protein domains mediate cooperative assembly of HuR oligomers on AU-rich mRNA-destabilizing sequences. *J. Biol. Chem.* 2007;282(29):20948–20959.
132. Fan XC, Steitz JA. HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998;95(26):15293–15298.
133. Brennan CM, Steitz JA. HuR and mRNA stability. *Cell. Mol. Life Sci.* 2001;58(2):266–277.
134. Güttinger S, Mühlhäusser P, Koller-Eichhorn R, Brennecke J, Kutay U. Transportin2 functions as importin and mediates nuclear import of HuR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004;101(9):2918–2923.
135. Rebane A, Aab A, Steitz JA. Transportins 1 and 2 are redundant nuclear import factors for hnRNP A1 and HuR. *RNA.* 2004;10(4):590–599.
136. Srikantan S, Tominaga K, Gorospe M. Functional interplay between RNA-binding protein HuR and microRNAs. *Curr. protein {&} Pept. Sci.* 2012;13(4):372–379.
137. Meisner N-C, Filipowicz W. Properties of the Regulatory RNA-Binding Protein HuR and its Role in Controlling miRNA Repression. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2010;700:106–123.
138. Wang J, Guo Y, Chu H, et al. Multiple Functions of the RNA-Binding Protein HuR in Cancer Progression, Treatment Responses and Prognosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2013;14(5):10015–10041.
139. Bergalet J, Fawal M, Lopez C, et al. HuR-mediated control of C/EBPbeta mRNA stability and translation in ALK-positive anaplastic large cell lymphomas. *Mol. Cancer Res.* 2011;9(4):485–496.
140. Fisher RI, Gaynor ER, Dahlborg S, et al. Comparison of a Standard Regimen (CHOP) with Three Intensive Chemotherapy Regimens for Advanced Non-Hodgkin's Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 1993;328(14):1002–1006.
141. FMPMC-PS - Pharmacologie - Niveau DCEM1.
142. Schmitz N, Trumper L, Ziepert M, et al. Treatment and prognosis of mature T-cell and NK-cell lymphoma: an analysis of patients with T-cell lymphoma treated in studies of the German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group. *Blood.* 2010;116(18):3418–3425.
143. Brugières L, Le Deley M-C, Rosolen A, et al. Impact of the Methotrexate Administration Dose on the Need for Intrathecal Treatment in Children and Adolescents With Anaplastic Large-Cell Lymphoma: Results of a Randomized Trial of the EICNHL Group. *J. Clin. Oncol.* 2009;27(6):897–903.
144. Le Deley M-C, Rosolen A, Williams DM, et al. Vinblastine in children and adolescents with high-risk anaplastic large-cell lymphoma: results of the randomized ALCL99-vinblastine trial. *J. Clin. Oncol.* 2010;28(25):3987–3993.
145. Woessmann W, Zimmermann M, Lenhard M, et al. Relapsed or Refractory Anaplastic Large-Cell Lymphoma in Children and Adolescents After Berlin-Frankfurt-Muenster (BFM)-Type First-Line Therapy: A BFM-Group Study. *J. Clin. Oncol.* 2011;29(22):3065–3071.

146. Gkatzamanidou M, Papadimitriou CA. Peripheral T-cell lymphoma: The role of hematopoietic stem cell transplantation. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2014;89(2):248–261.
147. Smith SM, Burns LJ, van Besien K, et al. Hematopoietic Cell Transplantation for Systemic Mature T-Cell Non-Hodgkin Lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 2013;31(25):3100–3109.
148. Song KW, Mollee P, Keating A, Crump M. Autologous stem cell transplant for relapsed and refractory peripheral T-cell lymphoma: variable outcome according to pathological subtype. *Br. J. Haematol.* 2003;120(6):978–985.
149. Mak V, Hamm J, Chhanabhai M, et al. Survival of Patients With Peripheral T-Cell Lymphoma After First Relapse or Progression: Spectrum of Disease and Rare Long-Term Survivors. *J. Clin. Oncol.* 2013;31(16):1970–1976.
150. Zhang S, Wang F, Keats J, et al. Abstract LB-298: AP26113, a potent ALK inhibitor, overcomes mutations in EML4-ALK that confer resistance to PF-02341066 (PF1066): *Cancer Res.* 2010;70(8 Supplement):LB-298-LB-298.
151. Christensen JG, Zou HY, Arango ME, et al. Cyto-reductive antitumor activity of PF-2341066, a novel inhibitor of anaplastic lymphoma kinase and c-Met, in experimental models of anaplastic large-cell lymphoma. *Mol. Cancer Ther.* 2007;6(12):3314–3322.
152. Katz J, Janik JE, Younes A. Brentuximab Vedotin (SGN-35). *Clin. Cancer Res.* 2011;17(20):6428–6436.
153. Senter PD, Sievers EL. The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma. *Nat. Biotechnol.* 2012;30(7):631–637.
154. Francisco JA, Cerveny CG, Meyer DL, et al. cAC10-vcMMAE, an anti-CD30-monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity. *Blood.* 2003;102(4):1458–1465.
155. Hamblett KJ, Senter PD, Chace DF, et al. Effects of Drug Loading on the Antitumor Activity of a Monoclonal Antibody Drug Conjugate. *Clin. Cancer Res.* 2004;10(20):7063–7070.
156. Younes A, Bartlett NL, Leonard JP, et al. Brentuximab Vedotin (SGN-35) for Relapsed CD30-Positive Lymphomas. *N. Engl. J. Med.* 2010;363(19):1812–1821.
157. Pro B, Advani R, Brice P, et al. Brentuximab Vedotin (SGN-35) in Patients With Relapsed or Refractory Systemic Anaplastic Large-Cell Lymphoma: Results of a Phase II Study. *J. Clin. Oncol.* 2012;30(18):2190–2196.
158. Cui JJ, Tran-Dubé M, Shen H, et al. Structure Based Drug Design of Crizotinib (PF-02341066), a Potent and Selective Dual Inhibitor of Mesenchymal–Epithelial Transition Factor (c-MET) Kinase and Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK). *J. Med. Chem.* 2011;54(18):6342–6363.
159. McDermott U, Iafrate AJ, Gray NS, et al. Genomic Alterations of Anaplastic Lymphoma Kinase May Sensitize Tumors to Anaplastic Lymphoma Kinase Inhibitors. *Cancer Res.* 2008;68(9):3389–3395.
160. Solomon BJ, Mok T, Kim D-W, et al. First-Line Crizotinib versus Chemotherapy in ALK-Positive Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* 2014;371(23):2167–2177.
161. Reck M, Popat S, Reinmuth N, et al. Metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 2014;25(suppl 3):iii27–iii39.
162. Gambacorti-Passerini CB, Dilda I, Giudici G, et al. Clinical Activity of Crizotinib In Advanced, Chemoresistant ALK+ Lymphoma Patients. *Blood.* 2010;116(21):.

163. Cleary JM, Rodig S, Barr PM, et al. Crizotinib as salvage and maintenance with allogeneic stem cell transplantation for refractory anaplastic large cell lymphoma. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* 2014;12(3):323--6; quiz 326.
164. Conyers R, Rao A, Solomon B, Seymour JF. Editor in Chief: Response to Eyre {<i>et al</i>}. "ALK-positive anaplastic large cell lymphoma: current and future perspectives in adult and paediatric disease." *Eur. J. Haematol.* 2015;94(1):86–87.
165. Gambacorti Passerini C, Farina F, Stasia A, et al. Crizotinib in Advanced, Chemoresistant Anaplastic Lymphoma Kinase-Positive Lymphoma Patients. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 2014;106(2):djt378--djt378.
166. Gambacorti-Passerini C, Mussolin L, Brugieres L. Abrupt Relapse of ALK-Positive Lymphoma after Discontinuation of Crizotinib. *N. Engl. J. Med.* 2016;374(1):95–96.
167. Prabhash K, Noronha V, Joshi A, Desai S, Sahu A. Crizotinib: A comprehensive review. *South Asian J. Cancer.* 2013;2(2):91.
168. Doebele RC, Pilling AB, Aisner DL, et al. Mechanisms of resistance to crizotinib in patients with ALK gene rearranged non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 2012;18(5):1472–82.
169. Katayama R, Shaw AT, Khan TM, et al. Mechanisms of Acquired Crizotinib Resistance in ALK-Rearranged Lung Cancers. *Sci. Transl. Med.* 2012;4(120):120ra17--120ra17.
170. Sasaki T, Koivunen J, Ogino A, et al. A Novel ALK Secondary Mutation and EGFR Signaling Cause Resistance to ALK Kinase Inhibitors. *Cancer Res.* 2011;71(18):6051–6060.
171. Choi YL, Soda M, Yamashita Y, et al. EML4-ALK Mutations in Lung Cancer That Confer Resistance to ALK Inhibitors. *N. Engl. J. Med.* 2010;363(18):1734–1739.
172. Kim S, Kim TM, Kim D-W, et al. Heterogeneity of Genetic Changes Associated with Acquired Crizotinib Resistance in ALK-Rearranged Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol.* 2013;8(4):415–422.
173. Ceccon M, Mologni L, Bisson W, Scapozza L, Gambacorti-Passerini C. Crizotinib-Resistant NPM-ALK Mutants Confer Differential Sensitivity to Unrelated Alk Inhibitors. *Mol. Cancer Res.* 2013;11(2):122–132.
174. Zdzalik D, Dymek B, Grygielewicz P, et al. Activating mutations in ALK kinase domain confer resistance to structurally unrelated ALK inhibitors in NPM-ALK-positive anaplastic large-cell lymphoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2014;140(4):589–598.
175. Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, et al. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell.* 2002;2(2):117–125.
176. Okamoto I, Iwama E, Harada T, Takayama K, Nakanishi Y. Development of anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitors and molecular diagnosis in ALK rearrangement-positive lung cancer. *Onco. Targets. Ther.* 2014;7:375.
177. Camidge DR, Doebele RC. Treating ALK-positive lung cancer—early successes and future challenges. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2012;9(5):268–277.
178. Shaw AT, Solomon B. Anaplastic lymphoma kinase (ALK) fusion oncogene positive non-small cell lung cancer. 2017;
179. Ceccon M, Mologni L, Giudici G, et al. Treatment Efficacy and Resistance Mechanisms Using the Second-Generation ALK Inhibitor AP26113 in Human NPM-ALK-Positive Anaplastic Large Cell Lymphoma. *Mol. Cancer Res.* 2015;13(4):775–783.

180. Deter RL, Baudhuin P, De Duve C. Participation of lysosomes in cellular autophagy induced in rat liver by glucagon. *J. Cell Biol.* 1967;35(2):C11--6.
181. Deter RL, De Duve C. Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *J. Cell Biol.* 1967;33(2):437--449.
182. Boya P, Reggiori F, Codogno P. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat. Cell Biol.* 2013;15(7):713--720.
183. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes {&} Dev.* 2007;21(22):2861--2873.
184. Badadani M. Autophagy Mechanism, Regulation, Functions, and Disorders. *ISRN Cell Biol.* 2012;2012:1--11.
185. Choi AMK, Ryter SW, Levine B. Autophagy in Human Health and Disease. *N. Engl. J. Med.* 2013;368(19):1845--1846.
186. Jiang P, Mizushima N. Autophagy and human diseases. *Cell Res.* 2014;24(1):69--79.
187. Li W, Li J, Bao J. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell. Mol. Life Sci.* 2012;69(7):1125--1136.
188. Kaushik S, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol.* 2012;22(8):407--417.
189. Bejarano E, Cuervo AM. Chaperone-Mediated Autophagy. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2010;7(1):29--39.
190. Dice JF. Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* 1990;15(8):305--309.
191. Cuervo AM, Dice JF. A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science.* 1996;273(5274):501--503.
192. Knodler LA, Celli J. Eating the strangers within: host control of intracellular bacteria via xenophagy. *Cell. Microbiol.* 2011;13(9):1319--1327.
193. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in Mammalian Autophagy Research. *Cell.* 2010;140(3):313--326.
194. Chen Y, Yu L. Autophagic lysosome reformation. *Exp. Cell Res.* 2013;319(2):142--146.
195. Yu L, McPhee CK, Zheng L, et al. Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature.* 2010;465(7300):942--946.
196. Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J. Cell Biol.* 2005;171(4):603--614.
197. Lippai M, Lów P. The role of the selective adaptor p62 and ubiquitin-like proteins in autophagy. *Biomed Res. Int.* 2014;2014:832704.
198. Goussetis DJ, Gounaris E, Wu EJ, et al. Autophagic degradation of the BCR-ABL oncoprotein and generation of antileukemic responses by arsenic trioxide. *Blood.* 2012;120(17):3555--3562.
199. Tsukada M, Ohsumi Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 1993;333(1--2):169--174.
200. Roberts R, Ktistakis NT. Omegasomes: PI3P platforms that manufacture autophagosomes. *Essays Biochem.* 2013;55:17--27.

201. Lamb CA, Yoshimori T, Tooze SA. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013;14(12):759–774.
202. Proikas-Cezanne T, Takacs Z, Donnes P, Kohlbacher O. WIPI proteins: essential PtdIns3P effectors at the nascent autophagosome. *J. Cell Sci.* 2015;128(2):207–217.
203. Carlsson SR, Simonsen A. Membrane dynamics in autophagosome biogenesis. *J. Cell Sci.* 2015;128(2):193–205.
204. Graef M, Friedman JR, Graham C, Babu M, Nunnari J. ER exit sites are physical and functional core autophagosome biogenesis components. *Mol. Biol. Cell.* 2013;24(18):2918–2931.
205. Appenzeller-Herzog C, Hauri H-P. The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function. *J. Cell Sci.* 2006;119(11):2173–2183.
206. van der Vaart A, Griffith J, Reggiori F. Exit from the Golgi Is Required for the Expansion of the Autophagosomal Phagophore in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* 2010;21(13):2270–2284.
207. Ravikumar B, Moreau K, Jahreiss L, Puri C, Rubinsztein DC. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat. Cell Biol.* 2010;12(8):747–757.
208. Puri C, Renna M, Bento CF, Moreau K, Rubinsztein DC. Diverse Autophagosome Membrane Sources Coalesce in Recycling Endosomes. *Cell.* 2013;154(6):1285–1299.
209. Ganley IG, Lam DH, Wang J, et al. ULK1-ATG13-FIP200 Complex Mediates mTOR Signaling and Is Essential for Autophagy. *J. Biol. Chem.* 2009;284(18):12297–12305.
210. Noda NN, Fujioka Y. Atg1 family kinases in autophagy initiation. *Cell. Mol. Life Sci.* 2015;72(16):3083–3096.
211. Russell RC, Tian Y, Yuan H, et al. ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat. Cell Biol.* 2013;15(7):741–750.
212. Burman C, Ktistakis NT. Regulation of autophagy by phosphatidylinositol 3-phosphate. *FEBS Lett.* 2010;584(7):1302–1312.
213. Sun Q, Fan W, Chen K, et al. Identification of Barkor as a mammalian autophagy-specific factor for Beclin 1 and class III phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008;105(49):19211–19216.
214. Matsunaga K, Saitoh T, Tabata K, et al. Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat. Cell Biol.* 2009;11(4):385–396.
215. Itakura E, Kishi C, Inoue K, Mizushima N. Beclin 1 Forms Two Distinct Phosphatidylinositol 3-Kinase Complexes with Mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol. Biol. Cell.* 2008;19(12):5360–5372.
216. Takahashi Y, Coppola D, Matsushita N, et al. Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat. Cell Biol.* 2007;9(10):1142–1151.
217. Morris DH, Yip CK, Shi Y, Chait BT, Wang QJ. Beclin 1-Vps34 complex architecture: Understanding the nuts and bolts of therapeutic targets. *Front. Biol. (Beijing)*. 2015;10(5):398–426.
218. Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. Role of the Apg12 conjugation system in mammalian autophagy. *Int. J. Biochem. & cell Biol.* 2003;35(5):553–561.
219. Geng J, Klionsky DJ. The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. “Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects” Review Series. *EMBO Rep.* 2008;9(9):859–864.

220. Tanida I, Ueno T, Kominami E. Human light chain 3/MAP1LC3B is cleaved at its carboxyl-terminal Met121 to expose Gly120 for lipidation and targeting to autophagosomal membranes. *J. Biol. Chem.* 2004;279(46):47704–47710.
221. Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int. J. Biochem. {&} Cell Biol.* 2004;36(12):2503–2518.
222. Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy.* 2012;8(4):445.
223. Jahreiss L, Menzies FM, Rubinsztein DC. The Itinerary of Autophagosomes: From Peripheral Formation to Kiss-and-Run Fusion with Lysosomes. *Traffic.* 2008;9(4):574–587.
224. Hyttinen JMT, Niittykoski M, Salminen A, Kaarniranta K. Maturation of autophagosomes and endosomes: a key role for Rab7. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013;1833(3):503–510.
225. Metcalf D, Isaacs AM. The role of ESCRT proteins in fusion events involving lysosomes, endosomes and autophagosomes: Figure 1. *Biochem. Soc. Trans.* 2010;38(6):1469–1473.
226. Moreau K, Renna M, Rubinsztein DC. Connections between SNAREs and autophagy. *Trends Biochem. Sci.* 2013;38(2):57–63.
227. Eskelinen E-L, Illert AL, Tanaka Y, et al. Role of LAMP-2 in Lysosome Biogenesis and Autophagy. *Mol. Biol. Cell.* 2002;13(9):3355–3368.
228. Yu Z-Q, Ni T, Hong B, et al. Dual roles of Atg8–PE deconjugation by Atg4 in autophagy. *Autophagy.* 2012;8(6):883–892.
229. Lin W, Kuang H. Oxidative stress induces autophagy in response to multiple noxious stimuli in retinal ganglion cells. *Autophagy.* 2014;10(10):1692–1701.
230. Kroemer G, Mariño G, Levine B. Autophagy and the Integrated Stress Response. *Mol. Cell.* 2010;40(2):280–293.
231. Huang Z, Zhou L, Chen Z, Nice EC, Huang C. Stress management by autophagy: Implications for chemoresistance. *Int. J. Cancer.* 2016;139(1):23–32.
232. Füllgrabe J, Klionsky DJ, Joseph B. The return of the nucleus: transcriptional and epigenetic control of autophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013;15(1):65–74.
233. Laplante M, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth Control and Disease. *Cell.* 2012;149(2):274–293.
234. Sengupta S, Peterson TR, Sabatini DM. Regulation of the mTOR Complex 1 Pathway by Nutrients, Growth Factors, and Stress. *Mol. Cell.* 2010;40(2):310–322.
235. Giaccia AJ, Simon MC, Johnson R. The biology of hypoxia: the role of oxygen sensing in development, normal function, and disease. *Genes {&} Dev.* 2004;18(18):2183–2194.
236. Dennis PB, Jaeschke A, Saitoh M, et al. Mammalian TOR: A Homeostatic ATP Sensor. *Science (80-. .).* 2001;294(5544):1102–1105.
237. Kim E. Mechanisms of amino acid sensing in mTOR signaling pathway. *Nutr. Res. Pract.* 2009;3(1):64.
238. Inoki K, Zhu T, Guan K-L. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell.* 2003;115(5):577–590.
239. Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan K-L. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat. Cell Biol.* 2002;4(9):648–657.

240. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, et al. AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint. *Mol. Cell.* 2008;30(2):214–226.
241. Brugarolas J, Lei K, Hurley RL, et al. Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes & Dev.* 2004;18(23):2893–2904.
242. Nobukuni T, Joaquin M, Rocco M, et al. Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005;102(40):14238–14243.
243. Smith EM, Finn SG, Tee AR, Browne GJ, Proud CG. The Tuberous Sclerosis Protein TSC2 Is Not Required for the Regulation of the Mammalian Target of Rapamycin by Amino Acids and Certain Cellular Stresses. *J. Biol. Chem.* 2005;280(19):18717–18727.
244. Sancak Y, Bar-Peled L, Zoncu R, et al. Ragulator-Rag Complex Targets mTORC1 to the Lysosomal Surface and Is Necessary for Its Activation by Amino Acids. *Cell.* 2010;141(2):290–303.
245. Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, et al. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol. Biol. Cell.* 2009;20(7):1981–1991.
246. Frankel LB, Lund AH. MicroRNA regulation of autophagy. *Carcinogenesis.* 2012;33(11):2018–2025.
247. Kovaleva V, Mora R, Park YJ, et al. miRNA-130a Targets ATG2B and DICER1 to Inhibit Autophagy and Trigger Killing of Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. *Cancer Res.* 2012;72(7):1763–1772.
248. Li L, Yuan L, Luo J, et al. MiR-34a inhibits proliferation and migration of breast cancer through down-regulation of Bcl-2 and SIRT1. *Clin. Exp. Med.* 2013;13(2):109–117.
249. Yang F, Li Q, Gong Z, et al. MicroRNA-34a Targets Bcl-2 and Sensitizes Human Hepatocellular Carcinoma Cells to Sorafenib Treatment. *Technol. Cancer Res. Treat.* 2013;13(1):77–86.
250. Frankel LB, Lubas M, Lund AH. Emerging connections between RNA and autophagy. *Autophagy.* 2017;13(1):3–23.
251. Guo H, Chitiprolu M, Gagnon D, et al. Autophagy supports genomic stability by degrading retrotransposon RNA. *Nat. Commun.* 2014;5:5276.
252. Aita VM, Liang XH, Murty V V, et al. Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics.* 1999;59(1):59–65.
253. Takamura A, Komatsu M, Hara T, et al. Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes & Dev.* 2011;25(8):795–800.
254. Mariño G, Salvador-Montoliu N, Fueyo A, et al. Tissue-specific Autophagy Alterations and Increased Tumorigenesis in Mice Deficient in Atg4C/Autophagin-3. *J. Biol. Chem.* 2007;282(25):18573–18583.
255. Mathew R, Kongara S, Beaudoin B, et al. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes & Dev.* 2007;21(11):1367–1381.
256. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 2009;417(1):1–13.
257. Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VAK, et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat. Immunol.* 2011;12(3):222–230.
258. Belaid A, Ndiaye PD, Cerezo M, et al. Autophagy and SQSTM1 on the RHOA(d) again. *Autophagy.* 2014;10(2):201–208.

259. Dou Z, Xu C, Donahue G, et al. Autophagy mediates degradation of nuclear lamina. *Nature*. 2015;527(7576):105–109.
260. Mathew R, White E. Autophagy in tumorigenesis and energy metabolism: friend by day, foe by night. *Curr. Opin. Genet. & Dev.* 2011;21(1):113–119.
261. White E, Lowe SW. Eating to exit: autophagy-enabled senescence revealed. *Genes & Dev.* 2009;23(7):784–787.
262. Kim M-J, Woo S-J, Yoon C-H, et al. Involvement of Autophagy in Oncogenic K-Ras-induced Malignant Cell Transformation. *J. Biol. Chem.* 2011;286(15):12924–12932.
263. Parkhitko A, Myachina F, Morrison TA, et al. Tumorigenesis in tuberous sclerosis complex is autophagy and p62/sequestosome 1 (SQSTM1)-dependent. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2011;108(30):12455–12460.
264. Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2006;10(1):51–64.
265. Nelson DA, Tan T-T, Rabson AB, et al. Hypoxia and defective apoptosis drive genomic instability and tumorigenesis. *Genes & Dev.* 2004;18(17):2095–2107.
266. Guo JY, Chen H-Y, Mathew R, et al. Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes & Dev.* 2011;25(5):460–470.
267. Viale A, Pettazoni P, Lyssiotis CA, et al. Oncogene ablation-resistant pancreatic cancer cells depend on mitochondrial function. *Nature*. 2014;514(7524):628–632.
268. Sosa MS, Bragado P, Aguirre-Ghiso JA. Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nat. Rev. Cancer*. 2014;14(9):611–622.
269. Gewirtz DA. Autophagy, senescence and tumor dormancy in cancer therapy. *Autophagy*. 2009;5(8):1232–1234.
270. Kenific CM, Thorburn A, Debnath J. Autophagy and metastasis: another double-edged sword. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2010;22(2):241–245.
271. Grassi G, Di Caprio G, Santangelo L, et al. Autophagy regulates hepatocyte identity and epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transitions promoting Snail degradation. *Cell Death Dis.* 2015;6(9):e1880.
272. Fung C, Lock R, Gao S, Salas E, Debnath J. Induction of Autophagy during Extracellular Matrix Detachment Promotes Cell Survival. *Mol. Biol. Cell.* 2007;19(3):797–806.
273. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007;8(9):741–752.
274. Nikolettou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 2013;1833(12):3448–3459.
275. Fitzwalter BE, Thorburn A. Recent insights into cell death and autophagy. *FEBS J.* 2015;282(22):4279–4288.
276. Pattingre S, Levine B. Bcl-2 inhibition of autophagy: a new route to cancer? *Cancer Res.* 2006;66(6):2885–2888.
277. Pattingre S, Tassa A, Qu X, et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*. 2005;122(6):927–939.
278. Thorburn J, Andrysik Z, Staskiewicz L, et al. Autophagy controls the kinetics and extent of

- mitochondrial apoptosis by regulating PUMA levels. *Cell Rep.* 2014;7(1):45–52.
279. Gump JM, Staskiewicz L, Morgan MJ, et al. Autophagy variation within a cell population determines cell fate through selective degradation of Fap-1. *Nat. Cell Biol.* 2014;16(1):47–54.
280. Oral O, Oz-Arslan D, Itah Z, et al. Cleavage of Atg3 protein by caspase-8 regulates autophagy during receptor-activated cell death. *Apoptosis.* 2012;17(8):810–820.
281. Zhu Y, Zhao L, Liu L, et al. Beclin 1 cleavage by caspase-3 inactivates autophagy and promotes apoptosis. *Protein & Cell.* 2010;1(5):468–477.
282. Gu W, Wan D, Qian Q, et al. Ambra1 is an essential regulator of autophagy and apoptosis in SW620 cells: pro-survival role of Ambra1. *PLoS One.* 2014;9(2):e90151.
283. Young MM, Takahashi Y, Khan O, et al. Autophagosomal Membrane Serves as Platform for Intracellular Death-inducing Signaling Complex (iDISC)-mediated Caspase-8 Activation and Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2012;287(15):12455–12468.
284. Basit F, Cristofanon S, Fulda S. Obatoclox (GX15-070) triggers necroptosis by promoting the assembly of the necrosome on autophagosomal membranes. *Cell Death Differ.* 2013;20(9):1161–1173.
285. Shen HM, Codogno P. Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species? *Autophagy.* 2011;
286. Liu Y, Shoji-Kawata S, Sumpter RM, et al. Autosis is a Na⁺,K⁺-ATPase-regulated form of cell death triggered by autophagy-inducing peptides, starvation, and hypoxia-ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2013;110(51):20364–20371.
287. Gewirtz DA. The Four Faces of Autophagy: Implications for Cancer Therapy. *Cancer Res.* 2014;74(3):647–651.
288. Gewirtz DA. When cytoprotective autophagy isn't{...} and even when it is. *Autophagy.* 2014;10(3):391–392.
289. Bellodi C, Lidonnici MR, Hamilton A, et al. Targeting autophagy potentiates tyrosine kinase inhibitor-induced cell death in Philadelphia chromosome-positive cells, including primary CML stem cells. *J. Clin. Invest.* 2009;119(5):1109–1123.
290. Peng P, Kuo W-H, Tseng H-C, Chou F-P. Synergistic Tumor-Killing Effect of Radiation and Berberine Combined Treatment in Lung Cancer: The Contribution of Autophagic Cell Death. *Int. J. Radiat. Oncol.* 2008;70(2):529–542.
291. Shin J-Y, Lim H-T, Minai-Tehrani A, et al. Aerosol delivery of beclin1 enhanced the anti-tumor effect of radiation in the lungs of K-rasLA1 mice. *J. Radiat. Res.* 2012;53(4):506–515.
292. Yin Y-C, Lin C-C, Chen T-T, et al. Clozapine induces autophagic cell death in non-small cell lung cancer cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 2015;35(3):945–956.
293. Li C, Liu Y, Liu H, et al. Impact of Autophagy Inhibition at Different Stages on Cytotoxic Effect of Autophagy Inducer in Glioblastoma Cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 2015;35(4):1303–1316.
294. Takeuchi H, Kondo Y, Fujiwara K, et al. Synergistic Augmentation of Rapamycin-Induced Autophagy in Malignant Glioma Cells by Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein Kinase B Inhibitors. *Cancer Res.* 2005;65(8):3336–3346.
295. Lorente M, Torres S, Salazar M, et al. Stimulation of the midkine/ALK axis renders glioma cells resistant to cannabinoid antitumoral action. *Cell Death Differ.* 2011;18(6):959–973.
296. Laane E, Tamm KP, Buentke E, et al. Cell death induced by dexamethasone in lymphoid leukemia

- is mediated through initiation of autophagy. *Cell Death Differ.* 2009;16(7):1018–1029.
297. Grandér D, Kharaziha P, Laane E, Pokrovskaja K, Panaretakis T. Autophagy as the main means of cytotoxicity by glucocorticoids in hematological malignancies. *Autophagy.* 2009;5(8):1198–1200.
 298. Puissant A, Robert G, Fenouille N, et al. Resveratrol promotes autophagic cell death in chronic myelogenous leukemia cells via JNK-mediated p62/SQSTM1 expression and AMPK activation. *Cancer Res.* 2010;70(3):1042–1052.
 299. Mitou G, Frentzel J, Desquesnes A, et al. Targeting autophagy enhances the anti-tumoral action of crizotinib in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Oncotarget.* 2015;6(30):30149–30164.
 300. Fulda S, Kögel D. Cell death by autophagy: emerging molecular mechanisms and implications for cancer therapy. *Oncogene.* 2015;34(40):5105–5113.
 301. Akar U, Chaves-Reyez A, Barria M, et al. Silencing of Bcl-2 expression by small interfering RNA induces autophagic cell death in MCF-7 breast cancer cells. *Autophagy.* 2008;4(5):669–679.
 302. Sharma K, Goehe RW, Di X, et al. A novel cytostatic form of autophagy in sensitization of non-small cell lung cancer cells to radiation by vitamin D and the vitamin D analog, EB 1089. *Autophagy.* 2014;10(12):2346–2361.
 303. Bristol ML, Emery SM, Maycotte P, et al. Autophagy inhibition for chemosensitization and radiosensitization in cancer: do the preclinical data support this therapeutic strategy? *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2013;344(3):544–552.
 304. Chakradeo S, Sharma K, Alhaddad A, et al. Yet Another Function of p53--The Switch That Determines Whether Radiation-Induced Autophagy Will Be Cytoprotective or Nonprotective: Implications for Autophagy Inhibition as a Therapeutic Strategy. *Mol. Pharmacol.* 2015;87(5):803–814.
 305. Bristol ML, Di X, Beckman MJ, et al. Dual functions of autophagy in the response of breast tumor cells to radiation: cytoprotective autophagy with radiation alone and cytotoxic autophagy in radiosensitization by vitamin D 3. *Autophagy.* 2012;8(5):739–753.
 306. Wilson EN, Bristol ML, Di X, et al. A Switch Between Cytoprotective and Cytotoxic Autophagy in the Radiosensitization of Breast Tumor Cells by Chloroquine and Vitamin D. *Horm. Cancer.* 2011;2(5):272–285.
 307. Xu H-D, Wu D, Gu J-H, et al. The pro-survival role of autophagy depends on Bcl-2 under nutrition stress conditions. *PLoS One.* 2013;8(5):e63232.
 308. Kim EL, Wustenberg R, Rubsam A, et al. Chloroquine activates the p53 pathway and induces apoptosis in human glioma cells. *Neuro. Oncol.* 2010;12(4):389–400.
 309. Park EJ, Min K, Choi KS, et al. Chloroquine enhances TRAIL-mediated apoptosis through up-regulation of DR5 by stabilization of mRNA and protein in cancer cells. *Sci. Rep.* 2016;6(1):22921.
 310. Maes H, Kuchnio A, Peric A, et al. Tumor Vessel Normalization by Chloroquine Independent of Autophagy. *Cancer Cell.* 2014;26(2):190–206.
 311. Kimura T, Takabatake Y, Takahashi A, Isaka Y. Chloroquine in Cancer Therapy: A Double-Edged Sword of Autophagy. *Cancer Res.* 2013;73(1):3–7.
 312. Nishimura M, Hidaka N, Akaza T, Tadokoro K, Juji T. Immunosuppressive effects of chloroquine: potential effectiveness for treatment of post-transfusion graft-versus-host disease. *Transfus. Med.* 1998;8(3):209–14.

313. Amaravadi RK, Yu D, Lum JJ, et al. Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *J. Clin. Invest.* 2007;117(2):326–336.
314. Pasquier B. Autophagy inhibitors. *Cell. Mol. Life Sci.* 2016;73(5):985–1001.
315. Liu J, Xia H, Kim M, et al. Beclin1 Controls the Levels of p53 by Regulating the Deubiquitination Activity of USP10 and USP13. *Cell.* 2011;147(1):223–234.
316. Levine B, Packer M, Codogno P. Development of autophagy inducers in clinical medicine. *J. Clin. Invest.* 2015;125(1):14–24.
317. Jundt F, Raetzl N, Müller C, et al. A rapamycin derivative (everolimus) controls proliferation through down-regulation of truncated CCAAT enhancer binding protein β and NF- κ B activity in Hodgkin and anaplastic large cell lymphomas. *Blood.* 2005;106(5):1801–1807.
318. Malik SA, Orhon I, Morselli E, et al. BH3 mimetics activate multiple pro-autophagic pathways. *Oncogene.* 2011;30(37):3918–3929.
319. Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat. Med.* 2013;19(2):202–208.
320. Ishimaru D, Ramalingam S, Sengupta TK, et al. Regulation of Bcl-2 expression by HuR in HL60 leukemia cells and A431 carcinoma cells. *Mol. Cancer Res.* 2009;7(8):1354–1366.
321. Akl H, Vandecaetsbeek I, Monaco G, et al. HA14-1, but not the BH3 mimetic ABT-737, causes Ca²⁺ dysregulation in platelets and human cell lines. *Haematologica.* 2013;98(4):e49–e51.
322. Chang N, Yi J, Guo G, et al. HuR Uses AUF1 as a Cofactor To Promote p16INK4 mRNA Decay. *Mol. Cell. Biol.* 2010;30(15):3875–3886.
323. Yaman I, Fernandez J, Sarkar B, et al. Nutritional Control of mRNA Stability Is Mediated by a Conserved AU-rich Element That Binds the Cytoplasmic Shuttling Protein HuR. *J. Biol. Chem.* 2002;277(44):41539–41546.
324. Cairo MS, Raetz E, Perkins S. Clinical Presentation and Staging. 2003;
325. Tabbó F, Barreca A, Piva R, Inghirami G, European T-Cell Lymphoma Study Group. ALK signaling and target therapy in anaplastic large cell lymphoma. *Front. Oncol.* 2012;2:41.
326. Parrilla Castellar ER, Jaffe ES, Said JW, et al. ALK-negative anaplastic large cell lymphoma is a genetically heterogeneous disease with widely disparate clinical outcomes. *Blood.* 2014;124(9):1473–1480.
327. Kang MH, Reynolds CP. Bcl-2 Inhibitors: Targeting Mitochondrial Apoptotic Pathways in Cancer Therapy. *Clin. Cancer Res.* 2009;15(4):1126–1132.
328. Ameres SL, Zamore PD. Diversifying microRNA sequence and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013;14(8):475–488.
329. Kim DH, Rossi JJ. Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat. Rev. Genet.* 2007;8(3):173–184.
330. Ahmed F, Benedito VA, Zhao PX. Mining Functional Elements in Messenger RNAs: Overview, Challenges, and Perspectives. *Front. Plant Sci.* 2011;2:84.
331. Shaw AT, Friboulet L, Leshchiner I, et al. Resensitization to Crizotinib by the Lorlatinib ALK Resistance Mutation L1198F. *N. Engl. J. Med.* 2016;374(1):54–61.
332. Wu J, Savooji J, Liu D. Second- and third-generation ALK inhibitors for non-small cell lung cancer.

J. Hematol. Oncol. 2016;9:19.

333. Amin AD, Rajan SS, Liang WS, et al. Evidence Suggesting That Discontinuous Dosing of ALK Kinase Inhibitors May Prolong Control of ALK+ Tumors. *Cancer Res.* 2015;75(14):2916–2927.
334. Wirawan E, Berghe T Vanden, Lippens S, Agostinis P, Vandenabeele P. Autophagy: for better or for worse. *Cell Res.* 2012;22(1):43–61.
335. Kaur J, Debnath J. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2015;16(8):461–472.
336. LIANG C, yang yongfei. MicroRNAs : An Emerging Player In Autophagy. *Sci. Res.* 2014;
337. Kubisch J, Türei D, Földvári-Nagy L, et al. Complex regulation of autophagy in cancer – Integrated approaches to discover the networks that hold a double-edged sword. *Semin. Cancer Biol.* 2013;23(4):252–261.
338. Rubinstein AD, Kimchi A. Life in the balance – a mechanistic view of the crosstalk between autophagy and apoptosis. *J. Cell Sci.* 2012;125(22):5259–5268.
339. Fleming A, Noda T, Yoshimori T, Rubinsztein DC. Chemical modulators of autophagy as biological probes and potential therapeutics. *Nat. Chem. Biol.* 2011;7(1):9–17.

AUTEUR : Avédis TOROSSIAN

TITRE : Contrôle de l'expression de Bcl-2 dans les Lymphomes Anaplasiques à Grandes Cellules par la protéine HuR en réponse au crizotinib: impact sur l'apoptose et l'autophagie.

DIRECTEUR DE THESE : Pr. Estelle ESPINOS

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : 19 Septembre 2017, Toulouse

Les lymphomes anaplasiques à grandes cellules (LAGC) sont des lymphomes non-hodgkiniens dits de type T ou nul, représentant la majorité des lymphomes T pédiatriques (20 à 30%). Dans plus de 80% des cas, une translocation chromosomique réciproque aboutissant à l'expression anormale de protéines chimères de type X-ALK qui arborent constitutivement et de manière anormale l'activité tyrosine-kinase ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase) est le moteur de la tumorigenèse (LAGC dits "ALK⁺"). L'une des particularités de ces lymphomes, mise en évidence par mon équipe, est le fait que B-Cell Lymphoma-2 (BCL-2) demeure indétectable dans les cas ALK⁺ contrairement aux cas ALK⁻. Ce point est d'autant plus surprenant que BCL-2, oncogène largement établi comme prototype de protéines anti-apoptotiques ainsi que régulateur clé de l'autophagie, est fortement surexprimé dans la majorité des lymphomes. A l'inverse, Human Antigen R (HuR) est surexprimée dans les LAGC (comme dans la plupart des cancers). Il a été démontré que cette protéine de liaison aux ARN participait au maintien du phénotype tumoral, et que sa localisation subcellulaire et ses fonctions dépendaient étroitement de son statut de phosphorylation, lequel est régulé par ALK dans les LAGC ALK⁺. Au niveau du cytoplasme, HuR permet de stabiliser et d'augmenter la traduction d'ARNm possédant, dans leur région 3'-UTR, des séquences riches en adénine et uridine (AU-rich elements, "ARE"). De manière plus générale, HuR a la capacité de dialoguer avec les microARNs (miARN), soit en empêchant leur action par compétition, soit à l'inverse en coopérant avec ces derniers et en promouvant ainsi leur fonction de régulateur négatif sur certains transcrits cibles communs. Le transcrit Bcl-2, dont l'expression est réprimée dans les LAGC ALK⁺, fait partie des cibles potentielles de HuR. Au cours de ma thèse, j'ai ainsi cherché à comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la répression de l'expression de Bcl-2, en me focalisant sur le rôle de HuR et de miARN "partenaires" dans ce processus. Mes données semblent indiquer que ce mécanisme implique le recrutement par HuR du miR-34a sur l'ARNm Bcl-2, conduisant à la mise en silence de ce dernier. A l'inverse, quand l'activité tyrosine-kinase de ALK est inhibée, l'interaction entre HuR et le transcrit Bcl-2 diminue, ce qui limite le recrutement de miR-34a et conduit à une restauration de l'expression de cette oncogène majeur dans les cellules lymphomateuses. Dans le contexte des essais cliniques d'inhibiteurs ciblant l'activité tyrosine kinase de ALK tels que le Crizotinib, la question de cette ré-expression de BCL-2 éclaire d'une lumière nouvelle certains échecs thérapeutiques subis par cette molécule pourtant prometteuse. Je me suis donc également consacré, pendant ma thèse, à l'étude des conséquences de cette ré-expression de BCL-2 sur les LAGC ALK⁺ traités par le Crizotinib. Les résultats que j'ai obtenus *in vitro* et *in vivo* montrent que contrecarrer, par interférence à l'ARN, l'élévation du taux de BCL-2 consécutive au traitement par le Crizotinib, permet de potentialiser les effets de la drogue : cela se traduit en particulier par une potentialisation de la mort par apoptose induite par le traitement mais aussi, de manière fascinante, par une conversion de la réponse autophagique initialement cytoprotectrice et pro-tumorale en une autophagie incontrôlée et délétère, qui participe alors à l'effet thérapeutique accru de la drogue. De manière globale, ce travail permet d'envisager de nouvelles combinaisons et alternatives thérapeutiques pour les patients souffrants de LAGC ALK⁺, et illustre la complexité des régulations croisées entre processus apoptotiques et autophagiques.

Anaplastic large cell lymphoma (ALCL) are T/-null non-hodgkin lymphoma representing most of childhood T-cell lymphoma (up to 30%). More than 80% of cases bear reciprocal chromosomal translocation responsible for abnormal expression and constitutive activation of X-ALK type (Anaplastic Lymphoma Kinase) chimeric proteins (ALK⁺ ALCL). A striking characteristic of this lymphoma is that B-Cell Lymphoma-2 (BCL-2) remains undetectable in ALK⁺ cases compared to ALK⁻ cases. This is all the more surprising as the BCL-2 oncogene, which is firmly established as a prototypic anti-apoptotic factor as well as a key autophagy regulator, has been shown to be overexpressed in a majority of lymphomas. On the other hand, the RNA-binding protein HuR (Human Antigen R) is overexpressed in ALCL (as in most cancers). It has been demonstrated that this protein was involved in the sustainability of the tumoral phenotype, and that its subcellular localization and functions were closely related to its phosphorylation status, which in turn heavily depends on ALK activity in ALK⁺ ALCL. In the cytoplasm, HuR has the ability to bind adenine and uridine-rich elements (ARE) located on the 3'-UTR of target mRNAs, and both protect them from degradation and increase their translation. From a general point of view, HuR is able to establish an interplay with microRNAs (miRNAs), either blocking them through competition, or actually cooperating with them and thus promote their function of negative regulators of gene expression on common target transcripts. The BCL-2 transcript, which expression seems to be silenced in ALK-expressing ALCL, has been described as a potential target of HuR. During my PhD work, I dedicated myself to understand the molecular mechanism at work in the silencing of BCL-2 expression with a focus on HuR and collaborating miRNA. The data I obtained point at a cooperation between HuR and miR-34a leading to the silencing of the BCL-2 transcript. However, when the ALK tyrosine kinase activity is inhibited, it appears the interaction between the BCL-2 mRNA diminishes, which limitates the miR-34a 's access to this transcript and ultimately results in a re-expression of the BCL-2 oncogene in these lymphoma cells. In the current context of clinical trials for ALK-targeting inhibitors, such as the Crizotinib, this BCL-2 re-expression observed upon ALK inhibition shed light on potential reasons behind some therapeutic failures that have recently been reported. Indeed, during my PhD work, I also studied the consequences of the BCL-2 re-expression observed in Crizotinib-treated cells. The data I obtained *in vitro* and *in vivo* show that, by blocking this re-expression using RNA interference, the Crizotinib anti-tumoral efficiency can be greatly potentiated. This potentiation took the form of an increase of apoptotic cell death induction and, interestingly, also affected the autophagic response triggered by the drug, making it switch from a cytoprotective-type, protumoral autophagic flux to an enhanced, delectary-type and tumor suppressive flux, adding to the therapeutic effect of the drug. This work in general provides insights for new therapeutic combinations that could potentially benefit to ALK⁺ ALCL patients, and illustrates the complex cross-regulations between apoptotic and autophagic pathway.

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Cancérologie

LABORATOIRE : Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse (CRCT), INSERM U1037, 2 Avenue Hubert Curien, Oncopôle entrée C, CS53717, 31037 Toulouse CEDEX 1