



HAL
open science

Modulation de l'Activité de l'oncogène KRAS par BCL-xL : aspects mécanistiques

Nina Belaid

► **To cite this version:**

Nina Belaid. Modulation de l'Activité de l'oncogène KRAS par BCL-xL : aspects mécanistiques. Biochimie, Biologie Moléculaire. Nantes Université, 2022. Français. NNT : 2022NANU1041 . tel-03959406

HAL Id: tel-03959406

<https://theses.hal.science/tel-03959406>

Submitted on 27 Jan 2023

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

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

THESE DE DOCTORAT DE

NANTES UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : « *Biologie Moléculaire et Structurale, Biochimie* »

Par

Nina Maya BELAID

Modulation de l'Activité de l'oncogène KRAS par BCL-xL : Aspects Mécanistiques

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 18 mai 2022

Unité de recherche : CRCI2NA – UMR 1307 – INSERM

Rapporteurs avant soutenance :

Muriel PRIAULT
Giovanni BENARD

CR CNRS, IBGC UMR 5095, Université de Bordeaux
DR CNRS, MRGM Inserm U1211, Université de Bordeaux

Composition du Jury :

Présidente du jury : Gervaise LOIRAND DR, Institut du Thorax UMR 1087/CNRS 6291, Nantes Université
Examineur: Marc GERMAIN DR, Professeur à l'Université de Quebec à Trois-Rivières

Dir. de thèse : Philippe JUIN
Co-dir. de thèse : Fabien GAUTIER

DR, CRCI2NA Inserm UMR 1307 – Université de Nantes
CR, UNICANCER/ICO - Université de Nantes

Remerciements

Je tiens à remercier chaleureusement les membres de mon jury. Tout d'abord, Muriel Priault et Giovanni Bénard pour avoir endossé le rôle de rapporteurs, leurs commentaires et critiques ont été particulièrement instructives et m'ont aidé à faire avancer ce travail. Je remercie également sincèrement Gervaise Loirand et Marc Germain d'avoir accepté d'être présents en tant que présidente et examinateur de cette thèse.

Merci à Fabien Gautier, sans qui tout cet accomplissement n'aurait pas été possible. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir guidée dans les premiers pas de cette aventure.

Un grand merci à Philippe, évidemment, d'avoir su prendre le relais dans une période si critique, avec un projet d'unité en construction, des responsabilités grandissantes et cerise sur le gâteau, une étudiante en thèse qui l'a replongé dans la « RASologie ». Entraîné vers l'APEX, les PHBs, puis vers les MitoEVs, j'espère avoir contribué à le faire voyager dans des eaux encore inconnues de l'équipe et qui nourriront certainement les projets à venir.

Je remercie tout particulièrement Nicolas Bidère et Vincent Sauzeau, membres de mon comité de suivi de thèse, qui ont vu ce travail évoluer. Merci infiniment pour votre écoute, votre intérêt sincère et vos conseils avisés.

Je tiens également à remercier tout particulièrement Nikolay, que j'ai connu comme enseignant d'abord, puis comme encadrant et enfin comme ami. Le connaître m'a vraiment donné envie de faire ce métier. Sa capacité à partager sa passion pour la recherche, sa curiosité, ses connaissances, son expérience, sans compter son franc-parler, ont fortement inspiré mes choix.

Je remercie toute l'équipe pour leur accueil chaleureux d'abord mais surtout pour les moments de partage autour de chouquettes, dans les couloirs du centre ou encore en salle de culture. Je remercie tout particulièrement Fred, qui a toujours été une oreille attentive et de très bon conseil. Aurélie, la technicienne que tout le monde nous envie, merci de m'avoir supportée toutes ces années, juste derrière toi. Merci de m'avoir formée, merci d'avoir répondu à mes incessantes questions, merci d'avoir vu quand ça n'allait pas, merci de m'avoir écouté et conseillé. Merci pour tout ! J'espère t'avoir dit assez souvent à quel point tu fais un boulot incroyable et à quel point ton aide a été vraiment précieuse. Merci à Topette, Lisa, Alison... Avoir partagé avec vous des moments comme l'organisation des JS, la représentation des doctorants, mes moments de doute, mes moments de décompression... Merci pour tout ça les filles. Sans oublier Laurent, qui a suivi les grandes étapes de ce projet. Merci pour tes questions, merci d'avoir pris le temps de prendre le relais pour m'aider à avancer, et merci pour tes critiques et tes conseils qui m'ont été vraiment bénéfiques.

J'en profite également pour remercier tous les membres de l'équipe technique du centre qui font un travail formidable pour que nous ayons toujours de quoi travailler. Je pense notamment aux deux Stéphane, à Kamel, à Latifa, à Sophie et Fabrice et j'en passe... Je remercie également toute l'équipe de la plateforme Micropicell qui m'ont accueillie de longues heures et auprès de qui on apprend toujours quelque chose de passionnant.

Plusieurs personnes ont contribué à la conception et à la réalisation de ce projet et j'ai été vraiment ravie de travailler à vos côtés. Tout particulièrement,

Agnès, merci beaucoup pour le boulot que tu as abattu pour débroussailler mes données de protéomique, qui m'a fait faire un pas de géant. Au moment où je me sentais dépassée, tu as pris de ton temps, tu m'as tout expliqué et les résultats obtenus étaient toujours clairs, concis et très visuels, tu es vraiment une collaboratrice au top. Merci de m'avoir rassurée, de m'avoir conseillé aussi parfois et merci de m'avoir fait tant rire ! (Mes coqs te saluent, ils vont bien ^^). Une autre collaboratrice que je tiens à remercier c'est évidemment Gwennan. Merci, tu as toujours été disponible pour discuter de nos avancées, pour répondre à mes questions. Tu es la première à m'avoir dit : « les WB, je vais les faire » et là, sincèrement, j'ai découvert une nouvelle sensation ^^ . Tu as pris ce temps, au milieu de périodes d'écriture d'article puis de reviewing. Merci beaucoup. Je tiens également à remercier Laurent Désaubry, qui a participé depuis Strasbourg à ce travail. Ce fut toujours un plaisir d'échanger avec vous. Votre précision scientifique alliée à votre gentillesse et votre enthousiasme est contagieuse.

Qu'aurait été ces trois ans et demi de thèse sans Kilian... ? Kilian, un merci ne suffirait pas à te décrire à quel point je n'aurais pu surmonter tout ça sans toi. Et je dis bien tout ça, car tu as été là à tous les moments, bons ou mauvais. D'abord notre « rencontre », même si je t'avais déjà rencontré moi ! Nos pauses ensemble, tous les jours, car je ne résiste jamais à t'accompagner. Les week-ends de manips au labo où tu passais des fois juste pour me redonner de la motivation et me déposer la bose. L'HerbalTea ^^, légendaire. La liste est encore longue des bons moments avec toi qui ont rendu cette thèse pas si mal finalement ^^ . Tu es un ami génial, un scientifique calé, un collègue en or, un frère qui ose te dire ce qu'il pense par bienveillance. Tu m'as supportée plus que quiconque pendant tout ce temps, tu resteras dans mon cœur.

Je remercie aussi Thomas. Je sais que tu m'aimes pas les si... les ça... ^^ et encore moins les remerciements ^^ Alors je ferais court... Je ne crois pas que tu saches à quel point j'ai appris à ton contact, et à quel point j'apprécie le temps passé avec toi. C'était intense ces années. Mais pouvoir lancer des répliques de Kaamelott au labo sans que personne ne comprenne un broque de ce qu'on bave, je ne pouvais pas rêver mieux.

Je remercie sincèrement Antoine de m'avoir accompagné dans cette aventure qui m'a mis dans tous mes états parfois. Sa manière de toujours voir le bon côté des choses et de me soutenir tout du long a été un atout redoutable.

Car un Antoine peut en cacher un autre, je tiens à remercier aussi Antoine, et son inséparable Tempête (qui nous donne les réponses des fois, oui oui..^^), pour les soirées mots-fléchés/Battleground.

Je remercie enfin mes amis, qui pour beaucoup d'entre eux, habitent loin et qui ont toujours été là : Lydia (ma sœur de cœur), Brikou (l'homme qui a tout compris), Canard et Maya (le couple de choc), Toto (l'artiste), Nico (le voyageur), Riton (le gars du sud), Pierre et Chachou (les joueurs incontrôlés), Thomas (le rouge), Olivier (le navigateur). Merci pour tout, je suis fière d'avoir une si belle équipe autour de moi.

Le plus important pour la fin, je remercie du fond du cœur mon père et ma mère, pour avoir fait de moi la personne que suis et de m'avoir soutenu dans cette aventure. Merci de m'avoir fait confiance et merci pour vos efforts. Papa, pour être venu me voir, pour avoir lu ma thèse déjà au moins deux fois. Maman, merci d'avoir tout fait pour m'épargner du stress et de l'anxiété. Je remercie aussi mes frères, que j'aime profondément, pour m'avoir soutenue.

Table des matières

| | |
|---|----|
| NANTES UNIVERSITE | 1 |
| ECOLE DOCTORALE N° 605 <i>Biologie Santé</i> Spécialité : « <i>Biologie Moléculaire et Structurale, Biochimie</i> » | 1 |
| Remerciements | 5 |
| Table des matières | 9 |
| Liste des Illustrations | 13 |
| Liste des Figures..... | 13 |
| Listes des Abréviations | 17 |
| Introduction | 19 |
| A. Les protéines RAS..... | 20 |
| I. Structure, Activité et Localisation des protéines RAS | 20 |
| a. La découverte | 20 |
| b. La signalisation induite par les protéines RAS | 21 |
| c. Les isoformes de RAS | 23 |
| d. L'ancrage aux membranes..... | 24 |
| e. Trafic intracellulaire de KRAS | 27 |
| II. Conclusion | 31 |
| B. Le Cancer : aspects biologiques et moléculaires | 33 |
| I. Caractéristiques communes des cancers | 33 |
| II. Participation pléiotropique de KRAS dans les cancers | 34 |
| a. Les mutants de KRAS et l'acquisition d'une autosuffisance en signaux de croissance | 35 |
| b. Mutants de KRAS et métabolisme..... | 37 |
| c. Voie de signalisation KRAS dans L'EMT..... | 39 |
| III. Résistance à la mort cellulaire..... | 40 |
| C. Les morts cellulaires..... | 41 |
| I. Aspect général des morts cellulaires | 41 |
| a. Les processus de morts cellulaires non-apoptotiques | 41 |
| b. Apoptose..... | 43 |
| II. Aspects moléculaires de l'apoptose intrinsèque | 45 |
| a. Les protéines de la famille BCL-2 | 45 |
| b. Evènements moléculaires en amont de la MOMP | 46 |
| a. Evènements moléculaires en aval de la MOMP | 48 |
| D. Localisations et Fonctions de BCL-xL..... | 50 |
| I. Les localisations subcellulaires de BCL-xL | 50 |

| | | |
|------|--|----|
| a. | Localisation à la membrane externe mitochondriale..... | 50 |
| b. | Localisation à la membrane interne mitochondriale..... | 51 |
| c. | Localisation au réticulum endoplasmique..... | 52 |
| d. | Localisation aux endosomes | 52 |
| II. | Fonctions émergentes de BCL-xL | 53 |
| a. | Modifications post-traductionnelles de BCL-xL..... | 53 |
| b. | BCL-xL dans la régulation de l'autophagie | 53 |
| a. | BCL-xL, soutien de l'invasion et l'angiogenèse | 54 |
| b. | BCL-xL, soutien de l'émergence de cellules souches cancéreuses 55 | |
| III. | Conclusion | 55 |
| E. | Leçons des échecs thérapeutiques contre le cancer | 57 |
| I. | Echec des traitement ciblant KRAS | 57 |
| a. | Ciblage de l'activité GTPase | 57 |
| b. | Ciblage de l'adressage membranaire de KRAS | 57 |
| c. | Ciblage de l'ARNm de KRAS | 58 |
| d. | Ciblage des protéines en aval de KRAS | 58 |
| e. | Ciblage de la dégradation de KRAS..... | 59 |
| II. | Leçons du ciblage de la MOMP..... | 60 |
| a. | Les BH3 mimétiques..... | 60 |
| b. | Ciblage de BCL-xL par L'ABT-737 | 61 |
| c. | Ancrage membranaire de BCL-xL et résistance aux BH3mim..... | 62 |
| III. | Processus de survie influencés par le contrôle qualité mitochondrial | 62 |
| a. | Perméabilisation partielle de la membrane mitochondriale..... | 63 |
| b. | Dynamique mitochondriale..... | 64 |
| a. | La Mitophagie | 66 |
| b. | Transfert mitochondrial | 68 |
| c. | Vésicules extracellulaires cellulaires issues des mitochondries..... | 69 |
| c. | Système endosomal et élimination mitochondriale..... | 72 |
| IV. | Hétérogénéité tumorale, frein aux thérapies conventionnelles..... | 74 |
| a. | L'hétérogénéité génomique..... | 75 |
| b. | L'hétérogénéité phénotypique | 77 |
| c. | La plasticité phénotypique et cellules souches cancéreuses | 77 |
| V. | Conclusion | 78 |
| F. | Méthodes naissantes de marquage de proximité à la biotine..... | 80 |
| I. | Les méthodes de marquage de proximité par des systèmes enzymatiques | 80 |
| a. | La mise à profit du couple biotine-streptavidine | 82 |

| | | |
|----|---|-----|
| b. | Les méthodes basées sur les biotine-ligases - BioID | 83 |
| c. | Les méthodes basées sur les peroxydases - APEX | 85 |
| G. | Objectifs | 91 |
| | Article | 93 |
| | Données annexes | 124 |
| | Discussion des résultats | 134 |
| | Critiques et Perspectives | 139 |
| | Références | 144 |

Liste des Illustrations

Liste des Figures

| | |
|--|----|
| Figure 1 Voie de signalisation RAS (Gimple and Wang, 2019) | 22 |
| Figure 2 Isoformes de KRAS et leur orientation au niveau de la membrane plasmique (Nussinov, Ruth et al., 2016)..... | 25 |
| Figure 3 Organisation de protéines RAS au niveau des îlots lipidiques (Van QN et al., 2021) | 27 |
| Figure 4 Transport intracellulaire des protéines RAS (Fehrenbacher, Bar-Sagi, Phillips, 2009) | 29 |
| Figure 5 Capacités nécessaires à la croissance et la progression d'une tumeur et stratégies thérapeutiques associées (Hanahan, Weinberg 2011)..... | 34 |
| Figure 6 Fréquence des mutations du gène KRAS et des co-occurrences avec des mutations d'autres gènes dans les cancers (Huang et al., 2021) | 36 |
| Figure 7 Altérations métaboliques dirigées par KRAS muté (Kawada, Toda, Sakai 2017)..... | 38 |
| Figure 8 Différents types de mécanismes non-apoptotiques menant à la mort cellulaire (Tang et al. 2019)..... | 42 |
| Figure 9 Protéines de la famille BCL-2, Domaines d'homologie (Bock and Tait, 2020) | 46 |
| Figure 10 Représentation graphique des modèles mécanistiques orchestrant l'activation de BAX (Yin et al. 2017) | 47 |
| Figure 11 Représentation des événements en amont et en aval de la MOMP (Spierings et al., 2005) | 49 |
| Figure 12 Translocation et rétrotranslocation de BCL-xL et BAX (Popgeorgiev, Jabbour, Germain, 2018) | 51 |
| Figure 13 Différentes stratégies pour cibler la voie de signalisation RAS à plusieurs niveaux (Uprety and Adjei, 2020) | 59 |
| Figure 14 Mécanisme d'action des BH3 mimétiques (Montero, Letai 2017) .. | 61 |
| Figure 15 Repositionnement du point de non-retour de l'apoptose (Berthenet, Weber and Ichim, 2020)..... | 63 |
| Figure 16 Principaux acteurs régissant la dynamique du réseau mitochondrial (inspiré de Van der Blik et al. 2013) | 64 |
| Figure 17 Mécanismes moléculaires des voies de dégradations des mitochondries par mitophagie Parkin-dépendante et Parkin-indépendante (Zuo et al. 2020) | 67 |
| Figure 18 Inclusion de mitochondries entières ou de contenu mitochondrial dans les vésicules extracellulaires (Torralba, Baixauli, Sanchez-Madrid, 2016) | 70 |
| Figure 19 Système de transport vésiculaire intra-cellulaire | 73 |

| | |
|--|-----|
| Figure 20 Complexité du tissu tumoral (D'après Hanahan, Weinberg, 2000 et 2011) | 75 |
| Figure 21 Hétérogénéité génétique et ces répercussions en cas de rechute après traitement (Kreso et Dick, 2014)..... | 76 |
| Figure 22 Principe des méthodes de marquage de proximité (C.-L. Chen et Perrimon 2017) | 81 |
| Figure 23 Structure tridimensionnelle du tétramère de streptavidine et de son ligand, la biotine (3RY2, DOI: 10.2210/pdb3RY2/pdb)..... | 83 |
| Figure 24 Marquage de proximité à la biotine – BioID | 84 |
| Figure 25 Structure de l'Ascorbate peroxydase des graines de soja (PDB 10AF)..... | 86 |
| Figure 26 Méthode de marquage de proximité à la biotine – APEX..... | 87 |
| Figure 27 A unbiased proteomic approach reveals a major impact of BCL-xL on KRAS proximitome..... | 96 |
| Figure 28 Upon BCL-xL deletion, KRAS accumulates to mitochondria in the vicinity of PHB2..... | 100 |
| Figure 29 BCL-x loss enhances the presence of KRAS at the interface between mitochondria and endosomes in a PHB2 dependent manner | 103 |
| Figure 30 KRAS promotes PHB2 dependent mitochondrial clearance and increases mitovesicle production | 107 |
| Figure 31 Validation des constructions APEX-OMM et APEX-2xFYVE | 124 |
| Figure 32 Activité de la voie MAPK-ERK dans la lignée MCF7 exprimant APEX-KRAS et APEX-KRASG12V | 125 |
| Figure 33 Validation du contenu en protéines biotinylées dans les échantillons envoyés en pour détection en spectrométrie de masse | 125 |
| Figure 34 Distribution de l'intensité de l'ensemble des protéines détectées par spectrométrie de masse..... | 126 |
| Figure 35 Comparatif de la prédiction des localisations et des fonctions de KRAS et de KRASG12V d'après l'analyse protéomique de leur proximitome dans les lignées cellulaires MCF7 exprimant ou non BCL-xL..... | 127 |
| Figure 36 Caractérisation de l'interaction BCL-xL/KRAS (de Carné et al.,2017) | 128 |
| Figure 37 Interaction entre BCL-xL/KRAS et BCL-xL/KRAS Δ XBD par la méthode APEX | 128 |
| Figure 38 Stabilité de localisation de KRAS Δ XBD | 129 |
| Figure 39 Stabilité de KRAS influencée par BCL-xL (De Carné et al., 2017) | 129 |
| Figure 40 Stabilité de KRAS dépendant de BCL-xL dans la lignée MCF7 .. | 130 |
| Figure 41 Marquage des MVBs dans des MFC7 déplétées ou non en BCL-xL et surexprimant KRAS | 131 |
| Figure 42 Etude de la colocalisation KRAS/Rab7 | 132 |
| Figure 43 Analyse candidate des protéines biotinylées par APEX-BCL-xL. | 133 |

| | |
|---|-----|
| Figure 44 Effet protecteur de BCL-xL à un antagoniste de MCL-1 dans les MCF7..... | 139 |
| Figure 45 Représentation des différentes références spatiales fusionnées à l'APEX | 141 |
| Figure 46 Utilisation des références spatiales pour déterminer le chemin d'une protéine d'intérêt | 141 |
| Figure 47 Cartographie des environnements protéiques au cours du développement d'une mammosphère | 142 |

Listes des Abréviations

| | |
|----------------|--|
| MOMP | Perméabilisation de la membrane externe mitochondriale |
| EMT | Transition épithélio-mésenchymateuse |
| CIC | Cellules initiatrices de cancer |
| CSC | Cellules souches cancéreuses |
| EGF | Facteur de croissance épithélial |
| MAPK | <i>Mitogen-activated protein kinases</i> |
| MOM | Membrane externe mitochondriale |
| BAX | <i>BCL2 associated X protein</i> |
| BH | <i>BCL2 homology</i> |
| DAPI | 4',6'-diamidino-2-phénylindole |
| RE | Réticulum endoplasmique |
| MIM | Membrane interne mitochondriale |
| MCL1 | <i>Myeloid cell leukemia 1</i> |
| ROS | <i>Reactive oxygen species</i> |
| VDAC | <i>Voltage-dependent anion channels</i> |
| PCD | <i>Programmed cell death</i> |
| TNBC | <i>Triple negative breast cancer</i> |
| MAM | <i>Mitochondrial Associated Membranes</i> |
| BRET | <i>Bioluminescence Resonance Energy Transfer</i> |
| GDP | Guanosine diphosphate |
| SRET | <i>Spatially Restricted Enzymatic Tagging</i> |
| APEX | Ascorbate peroxidase |
| ADN | Acide Désoxyribonucléique |
| ARN | Acide Ribonucléique |
| EVs | Vésicules extracellulaires |
| MitoEVs | Vésicules extracellulaires issues des mitochondries |
| MDVs | Vésicules dérivées de mitochondries |
| GTP | Guanosine triphosphate |

RTK

Récepteur à Tyrosine Kinase

Introduction

Chaque jour, les 10^{14} cellules (de plus de 200 types différents) qui peuplent notre corps communiquent et s'engagent dans des transformations permettant à notre organisme de prospérer. Ces petits compartiments complexes assurent l'architecture et le fonctionnement de chaque tissu et organe de notre organisme. Cette unité de base du monde vivant, qu'est la cellule, a été décrite pour la première fois au XVII^e siècle par Robert Hooke (1635-1703) chimiste, physicien, mathématicien et inventeur anglais. C'est en observant, à travers un microscope élémentaire, de l'écorce de chêne-liège qu'il découvre et dessine ce qu'il appelle des petites chambres (*Cellula* en latin). Et ce n'est que bien plus tard, en 1880, grâce aux améliorations technologiques et à la description de ces « chambres » dans de nombreuses espèces que la théorie cellulaire est admise (et non sans controverse scientifique). Cette théorie énonce que chaque organisme vivant est constitué d'une ou plusieurs cellules, que celles-ci sont toujours issues d'une cellule préexistante, et que la cellule est l'unité fondamentale, structurale et fonctionnelle des organismes vivants.

Une cellule cancéreuse est définie comme une cellule ayant échappé aux mécanismes de régulation qui assurent le développement harmonieux de notre organisme. De nombreux travaux de recherche, accompagnés par les progrès biotechnologiques, ont permis de mieux comprendre la genèse et la persistance de ces cellules constituant les tumeurs. Toutefois, le cancer reste un diagnostic inquiétant et les mécanismes de sa résistance aux traitements sont encore un frein à la rémission complète des patients atteints. Les difficultés rencontrées dans le traitement des cancers solides sont étroitement dues aux phénomènes d'adaptation des cellules tumorales pour échapper, notamment, à la mort induite par les stratégies thérapeutiques cytotoxiques. Cette adaptation implique des acteurs clés de la prolifération cellulaire d'une part, qui sont souvent altérés dans les cancers et qui induisent des signaux de survie indépendamment des hormones de croissance qui régissent normalement ces processus. D'autre part, les cellules cancéreuses résistent aux traitements conventionnels grâce à des mécanismes qui impliquent directement les acteurs de la mort cellulaire programmée que sont les protéines de la famille BCL-2.

Dans cette introduction, nous caractérisons en détail deux acteurs majeurs qui soutiennent les mécanismes d'adaptation des cellules cancéreuses que sont les protéines KRAS et BCL-xL. Nous montrons comment ces protéines régissent le devenir des cellules et comment elles soutiennent l'apparition et le maintien des cellules cancéreuses. Nous décrivons ensuite quelles stratégies thérapeutiques ont été mises en place pour palier à ces phénomènes et les leçons que nous pouvons tirer des échecs de ces stratégies. Enfin, un dernier chapitre est consacré aux méthodes naissantes d'étude de la localisation et de la fonction de protéines dans leur contexte spatial et temporel que sont les méthodes de marquage de proximité à la biotine.

A. Les protéines RAS

Les protéines de la famille RAS sont des petites enzymes monomériques qui ont une activité GTPases. Cette activité enzymatique consiste en l'hydrolyse du GTP en GDP, un ribonucléotide qui a un rôle majeur dans le stockage et le transport de l'énergie au sein de nos cellules. Ces protéines participent à la transmission de signaux pro-survie avec des conséquences majeures sur l'expression des gènes et sur le devenir de la cellule. Ces signaux sont transmis, nous allons le voir, par la mobilisation successive de protéines des membranes périphériques jusqu'au cœur des cellules par une série de phosphorylations. Ce phénomène est appelé cascade de signalisation ou cascade de phosphorylation.

Les protéines de la famille RAS font partie d'une superfamille de protéines, celle des petites protéines G. Cette superfamille regroupe plus d'une centaine de protéines décrites et classées sur la base de critères biochimiques (séquence, structure et fonction) en huit groupes nommés respectivement RAS, RAB, RHO, RAD, RAP, RHEB, ARF/SAR et RIT (Wennerberg, Rossman, et Der 2005; Rojas et al. 2012).

Les protéines RAS sont les oncogènes les plus connus car elles abritent des mutations oncogéniques activatrices observées dans environ 30 % de tous les cancers humains. De surcroît, les principaux acteurs en amont et en aval de la voie de signalisation RAS sont eux-aussi fréquemment altérés dans les cellules cancéreuses. Les conséquences d'une activation anarchique de la voie de signalisation RAS en fait une cible préférentielle dans la lutte contre le cancer.

I. Structure, Activité et Localisation des protéines RAS

a. La découverte

Leur découverte date d'il y a près de 60 ans, quand Jennifer Harvey (en 1964) et Werner H. Kristen (en 1967) étudiaient le rétrovirus de la leucémie murine (MLV) chez le rat. L'inoculation de ce virus induit des sarcomes chez ces animaux (Harvey 1964; Kirsten et Mayer 1967), et les séquences génétiques responsables de cette transformation oncogénique furent identifiées quelques années plus tard (Anderson et Robbins 1976; Tsuchida, Ryder, et Ohtsubo 1982). Les protéines de 21 kDa codées par ces séquences ont été nommées HRAS (Harvey Rat Sarcoma) et KRAS (Kristen Rat Sarcoma) (Coffin et al. 1981). Des versions orthologues de ces gènes ont été décrites dans le génome humain. Le terme oncogène - gène responsable de la transformation d'une cellule normale en cellule tumorale - fut introduit à cette époque (Pulciani et al. 1982), ce qui fait de HRAS et KRAS les premiers oncogènes décrits chez l'humain (Ellis et al. 1981; K. Shimizu et al. 1983). Dans le génome de cellules cancéreuses humaines, des mutations ponctuelles furent identifiées dans les séquences de HRAS (Taparowsky et al. 1982) et KRAS (Capon et al. 1983).

L'étude des séquences (Hurley et al. 1984) et de l'activité enzymatique des protéines HRAS et KRAS (Gibbs et al. 1984; McGrath et al. 1984; Sweet et al. 1984) ont permis de les classer parmi les petites protéines G à activité GTPase. Ces études ont également établi que les versions mutées de ces protéines présentent une activité GTPase réduite.

b. La signalisation induite par les protéines RAS

i. En amont de RAS

L'oncogène RAS participe à de nombreux processus pro-survie des cellules telles que la régulation du cycle cellulaire, de la résistance à l'apoptose, de l'organisation du cytosquelette, du métabolisme ainsi que de la transition épithélio-mésenchymateuse. Les signaux initiaux de l'activation de la cascade de signalisation RAS sont essentiellement extracellulaires et sont captés par des récepteurs membranaires tels que les Récepteurs à Tyrosine Kinase (RTK)(Arvidsson et al. 1994), les récepteurs couplés aux protéines-G (Koch et al. 1994; Wan, Kurosaki, et Huang 1996) ou encore par les membres de la famille des intégrines (Clark et Hynes 1996). Nous décrivons ici la voie d'activation de RAS la plus documentée, l'activation par les RTK.

Les cellules sont en effet capables de recevoir des signaux de leur environnement. Ces signaux peuvent être de différentes natures mais parmi eux nous trouvons les hormones peptidiques tels que l'EGF (*Epidermal growth factor*), le FGF (*Fibroblast growth factor*) ou le PDGF (*Platelet derived growth factor*) (Malandrino et Smith 2018). Ces hormones présentent une affinité forte pour les membres de la famille RTK, dont le plus connu est l'EGFR (*Epidermal growth factor receptor*) (Herbst 2004; Wee et Wang 2017). Ces RTK traversent la membrane plasmique et lorsqu'ils sont liés à leur ligands spécifiques par leur extrémité extracellulaire, s'activent en changeant de conformation et en se dimérisant. Leurs domaines tyrosine kinase intracellulaire hydrolysent l'ATP et s'autophosphorylent (Hubbard et Miller 2007). Cette modification est le point de départ de la cascade de signalisation RAS.

Suite à cette modification, la protéine adaptatrice GRB2 (Growth factor Receptor Bound 2) est recrutée par liaison aux domaines intracellulaires phosphorylés des RTK (Buday et Downward 1993). GRB2 ainsi liée recrute à son tour la protéine SOS (Son Of Sevenless) à la membrane plasmique où elle pourra interagir avec RAS. La protéine SOS1 appartient à la famille des GEF (*Guanine nucleotide Exchange Factor*) qui ont pour fonction de faciliter l'échange de GDP (Guanosine-5'-diphosphate) par le GTP (Guanosine-5'-triphosphate). Par conséquent, RAS est activée par la GEF SOS1 en facilitant la libération du GDP lié à RAS lorsque RAS est inactive. En effet, RAS possède un domaine de liaison capable de se lier successivement au GDP ou au GTP appelé le domaine G. Dans le cytoplasme, la concentration de GTP est dix fois supérieure à celle du GDP. Ainsi, la libération du GDP laisse la place pour la formation du complexe RAS-GTP qui est la forme active de RAS. Les premières étapes de cette cascade de signalisation permettent donc de faire passer RAS d'une forme inactive à une forme active. La conséquence de l'activation de RAS par les GEF est le recrutement et l'activation de différentes protéines effectrices.

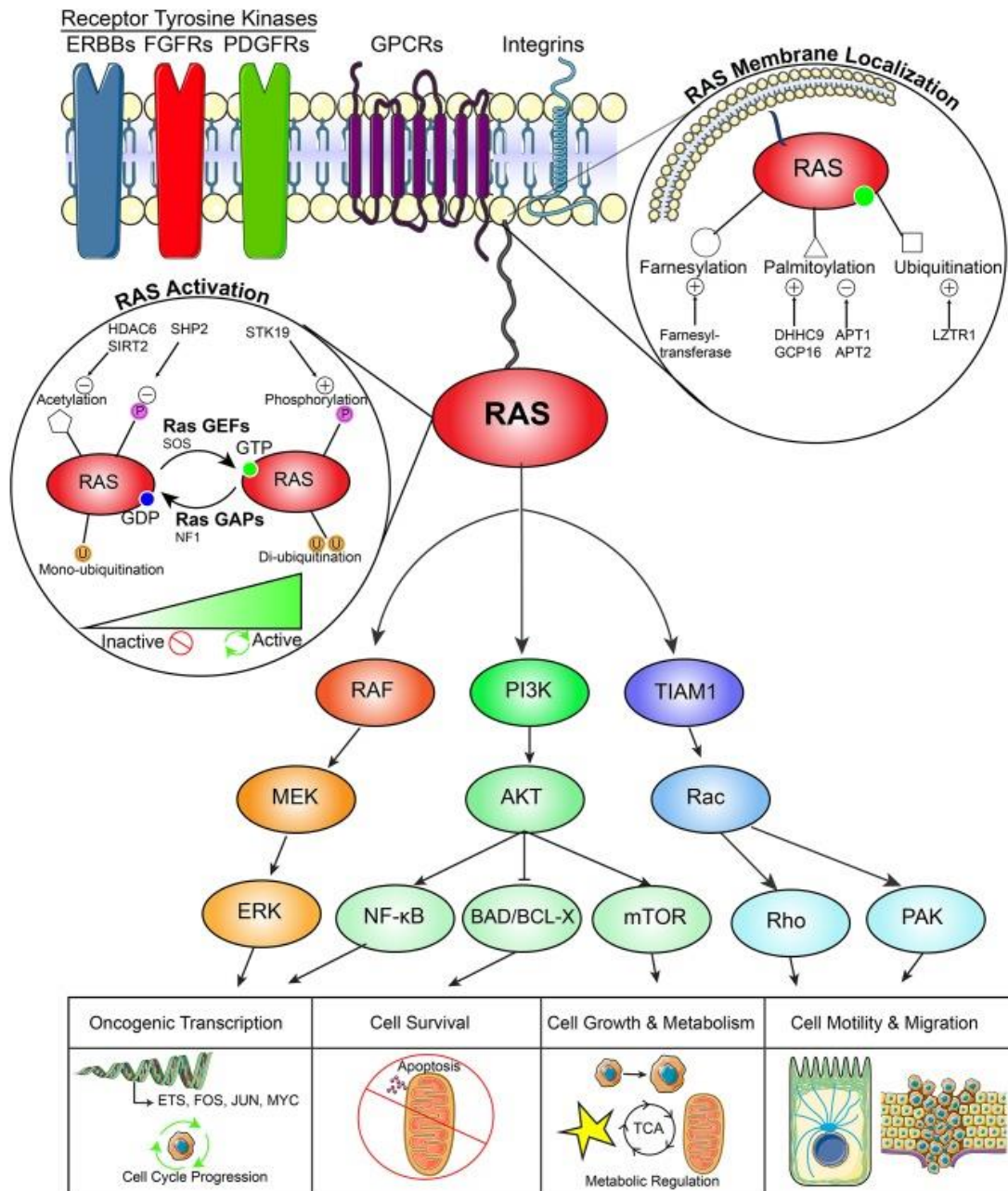


Figure 1 Voie de signalisation RAS (Gimple and Wang, 2019)

Ce schéma présente les différents acteurs de la voie de signalisation RAS. Les récepteurs membranaires, en amont de RAS, les régulateurs de l'ancrage membranaire de RAS, les régulateurs de l'activation de la voie de signalisation participant à l'hydrolyse et la libération du couple GTP/GDP, différentes protéines effectrices de la signalisation en aval de RAS et enfin les effets fonctionnels en aval de la signalisation RAS dans les cancers.

ii. En Aval de RAS

L'activation de RAS induit le recrutement et l'activation de protéines effectrices au niveau de la membrane plasmique. RAS-GTP peut se lier à une dizaine de protéines effectrices différentes via un domaine conservé, le domaine RBD pour *RAS Binding Domain* (Gimple et Wang 2019). Plus d'une vingtaine de protéines effectrices se liant à RAS ont été identifiées et, parmi elles, les plus connues sont RAF1 et PI3K (Phosphoinositol-3-Kinase) (Castellano et Downward 2011).

Elles régissent respectivement l'activation des voies MAPK et PI3K/AKT.

- La voie MAPK fait intervenir une cascade de phosphorylation passant de RAF1 (ou MAPKKK) à MEK (MAPKK) puis à ERK (MAPK). Cette réaction en chaîne conduit in-fine à l'activation de substrats cytoplasmiques et nucléaires de P-ERK (la version phosphorylée de ERK) qui ont des impacts biologiques sur la prolifération et la survie de la cellule (Wimmer et Baccarini 2010). Dans le noyau, P-ERK régule l'expression de certains gènes via son interaction avec des facteurs de transcriptions connus notamment pour leur potentiel oncogénique tels que c-FOS, c-JUN et c-Myc.
- La voie PI3K/AKT repose sur l'activation de PI3K par RAS permettant la production de PIP2 (Phosphatidylinositol biphosphate) et de PIP3 (Phosphatidylinositol triphosphate). Ceci permet alors de recruter PDK1 (*Phosphoinositide Dependent Protein Kinase 1*) qui, suite à son activation, va interagir et phosphoryler la protéine effectrice AKT. Une fois AKT pleinement activée elle participe à la survie cellulaire par inhibition de l'apoptose et par l'activation de la voie mTOR augmentant la biosynthèse des ribosomes donc le phénomène de traduction des ARNm.

Le passage de la forme active à la forme inactive de RAS fait intervenir une autre famille de protéines, les GAP (*GTPase Activating Proteins*) (Bos, Rehmann, et Wittinghofer 2007). La fonction de cette famille de protéine est de catalyser l'hydrolyse du GTP conduisant à l'inactivation des GTPases. La plus connue des GAPs intervenant dans l'inactivation de RAS est NF1 (*Neurofibromin 1*). Ce mode d'activation sous la forme d'un interrupteur « on-off » est cependant une vision simplifiée de l'activation de la voie RAS. Il a, en effet, été démontré que l'intensité et la durée d'activation de cette voie participent également aux conséquences fonctionnelles de cette cascade de signalisation (Dikic, Schlessinger, et Lax 1994, 12; Traverse et al. 1994, 12).

c. Les isoformes de RAS

Les quatre isoformes de la protéine RAS décrits à ce jour sont HRAS, NRAS, KRAS4a et KRAS4b. Ces isoformes sont codés par 3 gènes distincts (KRAS4b étant un produit de l'épissage alternatif de l'ARNm de KRAS4a). Leurs séquences sont homologues à 90% mais ces protéines exercent des fonctions spécifiques selon le contexte cellulaire. Nous utiliserons, dans la suite de cette introduction l'appellation KRAS en référence à KRAS4a et KRAS4b sauf lorsque la distinction sera nécessaire.

Ces isoformes activent plus ou moins efficacement des effecteurs différents et sont régulés par des protéines GAP/GEF différentes (Jones et Jackson 1998). Par exemple, KRAS est plus efficace pour activer RAF-1 que HRAS alors qu'à l'inverse, HRAS est plus efficace pour activer PI3K (J. Yan et al. 1998). Une première hypothèse, qui pourrait en partie expliquer ces différences, est liée à l'abondance de ces isoformes dans les modèles humains et murins classiquement étudiés. Effectivement, KRAS est l'isoforme le plus exprimé, suivi de près par NRAS alors que l'expression de HRAS est bien inférieure dans de nombreux types cellulaires (Omerovic et al. 2008). Ces différences d'expression ont été corrélés à des capacités différentes d'induction de fonctions tels que la prolifération des cellules souches (Quinlan et Settleman 2008). Par exemple, alors que des souris déficientes pour le gène codant pour HRAS et NRAS sont viables et fertiles, le gène codant pour KRAS est quant à lui indispensable et suffisant au développement

embryonnaire normal des souris (Koera et al. 1997; Esteban et al. 2001). La substitution du gène de KRAS par celui de HRAS, et donc sa mise sous dépendance du promoteur de KRAS, permet tout de même de donner naissance à des souris mais celles-ci présentent des anomalies cardiaques importantes (Potenza et al. 2005). Ces exemples soulignent que les différences fonctionnelles des isoformes de RAS ne reposent pas uniquement sur leur abondance intracellulaire.

Une distinction majeure entre ces protéines, réside dans leurs mécanismes d'adressage aux différentes membranes cellulaires (John F. Hancock 2003). En effet, la région la plus variable entre les différents isoformes de RAS est l'extrémité C-terminale. Cette extrémité possède une région dite « hypervariable » (HVR) comprenant un domaine appelé CAAX, c'est-à-dire possédant une Cystéine suivie de deux acides aminés aliphatiques et un acide aminé aléatoire. Cette région est la cible de modifications post-traductionnelles par ajout de chaînes lipidiques (Wright et Philips 2006). Cet ajout permet aux protéines RAS de s'ancrer dans les membranes et participe à leur activation (Ahearn et al. 2011). C'est la raison pour laquelle la compartimentation est apparue comme le mécanisme le plus probable pour expliquer les fonctions spécifiques des isoformes de RAS.

d. L'ancrage aux membranes

Les protéines RAS sont des protéines hydrophiles globulaires, synthétisées dans le cytoplasme et nécessitant des modifications post-traductionnelles leur permettant leur ancrage aux membranes. Cette association aux membranes est finement régulée car elle impacte leur activité.

Une première modification post-traductionnelle permet à tous les isoformes d'acquérir un domaine C-terminal hydrophobe capable de s'ancrer dans les différentes membranes cellulaires. Cette transformation fait intervenir le domaine CAAX qui subit une succession de transformations en trois étapes :

- La première étape correspond à l'ajout d'un groupement farnésyl sur la cystéine par la Farnésyl-transférase. Cette première modification entraîne un ancrage de RAS à la membrane du réticulum endoplasmique (RE).

- Au niveau du RE se trouve l'endoprotéase RCE1 (*RAS-Converting Enzyme 1*) qui reconnaît la cystéine farnésylée et coupe l'extrémité C-terminale de RAS juste après ce résidu.

- Enfin, la cystéine désormais en bout de chaîne est carboxyméthylée par l'enzyme ICMT (*Isoprenylcysteine CarboxylMethylTransferase*). Seul cette étape est réversible.

D'autres modifications supplémentaires sont nécessaires pour améliorer la liaison membranaire permise par le groupement farnésyl (J. F. Hancock, Paterson, et Marshall 1990). Ces modifications font intervenir une séquence en amont du domaine CAAX dans la région HVR. Les isoformes KRAS4a, NRAS et HRAS présentent des cystéines (deux pour HRAS et une pour KRAS4a et NRAS) pouvant être palmitoylées. Cet ajout permet de mettre en jeu des interactions hydrophobes avec les lipides de la membrane plasmique et peut être reversé par des enzymes de la famille des Thioestérases. Cette seconde modification suffit à HRAS pour être stablement ancrée à la membrane plasmique. Pour rester ancrés stablement à la membrane plasmique, KRAS4a et NRAS font intervenir des forces électrostatiques permises par d'autres résidus (Laude et Prior 2008). L'isoforme KRAS4b ne possède, quand à lui, pas de site de palmitoylation mais une région polybasique

Les différences observées sur l'activité des différents isoformes pourraient être imputées aux mécanismes d'ancrage aux membranes spécifique à chaque isoforme. En effet, il a été démontré que la capacité des différents isoformes de RAS à interagir avec la membrane plasmique module à trois niveaux l'activité de RAS :

- Un premier niveau repose sur l'orientation du domaine G (domaine de liaison au GDP ou au GTP) et du domaine RBD (se liant aux protéines effectrices), plus ou moins accessibles en fonction du type d'ancrage (Abankwa et al. 2010).

- Un second niveau de régulation est la composition de l'environnement membranaire qui favorise ou non les interactions électrostatiques et hydrophobes engagées avec les différents isoformes de RAS (Gorfe et al. 2007).

- Un troisième niveau de régulation réside dans des changements conformationnels de RAS lorsqu'elle est associée avec le GDP ou le GTP . Cette interaction va plus ou moins éloigner les résidus basiques qui interagissent avec les membranes et rendre RAS plus ou moins stable à la membrane (Abankwa et al. 2008).

La membrane plasmique est un compartiment cellulaire dynamique qui possède une organisation complexe. Certaines nanostructures, appelées aussi « îlots lipidiques », au sein de cette membrane participent à la signalisation RAS. Ces îlots contenant les protéines RAS font entre 6 et 11nm de diamètre et concentrent 6 à 8 de ces protéines. Ces plateformes amplifient la signalisation RAS proportionnellement à leur durée (Henis, Hancock, et Prior 2009). Il a été démontré que la formation de ces nanostructures nécessite l'intervention, entre autres, du cytosquelette d'actine (Y. Zhou et al. 2014; Head, Patel, et Insel 2014; Y. Zhou et Hancock 2015). La perturbation du réseau d'actine a un impact négatif sur la signalisation de KRAS mais pas sur celle de HRAS (Plowman et al. 2005). La stabilité de ces structures font parfois intervenir des modifications post-traductionnelles ainsi que d'autres protéines (Melkonian et al. 1999). A titre d'exemple, la formation d'îlots de KRAS, mais pas de HRAS et NRAS, fait intervenir une protéine stabilisatrice, la Prohibitine1 (PHB1) et peut être perturbée par un ligand de PHB1 et PHB2, le Rocaglamide (Hajime Yurugi et al. 2020).

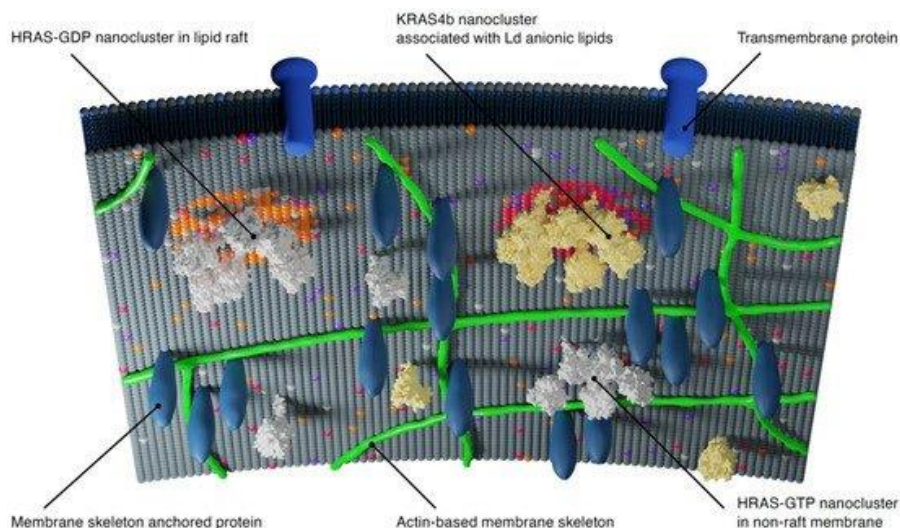


Figure 3 Organisation de protéines RAS au niveau des îlots lipidiques (Van QN et al., 2021)

Les sous-compartiments membranaires définissent l'organisation des « nanoclusters » RAS. Les sous-compartiments membranaires (40-300 nm de diamètre) sont formés par le cytosquelette d'actine et les protéines transmembranaires qui y sont attachées. À l'intérieur de ces compartiments, des domaines lipidiques se forment et sont définis par des interactions lipide-lipide et lipide-protéine. Par exemple, les « nanoclusters » d'HRAS-GDP s'assemblent au niveau de structures appelées radeaux lipidiques (lipid rafts), tandis que les HRAS-GTP se regroupent dans des structures différentes (non-raft), et KRAS4b interagit avec des îlots lipidiques anioniques.

Les interactions électrostatiques et hydrophobes facilitent l'association dynamique réversible des protéines RAS avec les différentes membranes cellulaires. Il a longtemps été admis que la membrane plasmique était le site exclusif de l'activité RAS. Avec les avancées technologiques, notamment sur les méthodes d'imagerie et de modification génétique, d'autres localisations de RAS ont été identifiées avec une activité spécifique à chaque localisation. Ces différences de localisation peuvent expliquer les variations en terme de signalisation des isoformes par la concentration différente des régulateurs et effecteurs rencontré par RAS au niveau des différents compartiments.

e. Trafic intracellulaire de KRAS

Le trafic intracellulaire des protéines influence leur activité et leur fonction. Les petites GTPases RAS sont majoritairement localisées à la membrane plasmique. Cela dit, une diversité d'autres organelles, ont été identifiées comme étant différenciellement accessible aux isoformes de RAS. Ces protéines ont été identifiées différenciellement au niveau des endosomes (S. Surve, Watkins, et Sorkin 2021), du RE (Chiu et al. 2002), de la mitochondrie (Wolfman et al. 2006) et de l'appareil de Golgi (Bivona et al. 2003; Casar et al. 2018). Par exemple, HRAS et NRAS, mais pas les variants d'épissage de KRAS, circulent entre l'appareil de Golgi

et la membrane plasmique en fonction de leur degré de palmitoylation avec des distributions sub-Golgi différentes (S. J. Lynch et al. 2015). Voyons maintenant comment la signalisation RAS est influencé par sa localisation en prenant comme exemple la localisation endosomale et la localisation mitochondriale.

i. Localisation endosomale

La localisation des isoformes de RAS la plus intéressante du point de vue de la signalisation est la localisation endosomale. Des études menées vers la fin des années 1980 ont établi l'importance des endosomes comme plateforme de signalisation des RTK tels que l'EGFR (Bergeron et al. 1988). Lors de l'activation de cette voie par fixation de l'EGF, les cellules internalisent rapidement l'EGFR par endocytose médiée par des clathrines. Transporté par les endosomes précoces, le récepteur reste lié à son ligand et est toujours capable de signaler au sein de la cellule. Ceci est rendu possible grâce à la présence de nombreux composants clés des voies de signalisation RAS à ce niveau (Di Guglielmo et al. 1994; Oksvold et al. 2000; Fortian et Sorkin 2014). Plusieurs études ont montré la présence de complexes EGFR-GRB2-RAS au niveau des endosomes (Jiang et Sorkin 2002). Mais la part des protéines RAS internalisées en complexe avec EGFR ou s'accrochant spontanément à la membrane endosomale reste à éclaircir.

En effet, tous les isoformes de RAS sont retrouvés au niveau du système endosomal bien que peu d'études aient caractérisé le mécanisme et le rôle de KRAS (4a et 4b) à ce niveau, en comparaison de HRAS et NRAS. (Howe et al. 2001). L'accumulation de HRAS et NRAS au niveau de la membrane des endosomes précoces est médiée par leur di-ubiquitylation et les responsables de ces modifications ont été identifiés (Jura et al. 2006; Colicelli 2010). Cette relocalisation de HRAS et NRAS est réversible et entraîne une réduction de la signalisation MAPK (Dohlman et Campbell 2019). Contrairement aux autres isoformes, les données existantes sur le trafic intracellulaire de KRAS montrent qu'une fois endocyté, KRAS se retrouve emporté sur le chemin endosomes précoces/endosomes tardifs/lysosomes ou endosomes recyclant (Lu et al. 2009; K. Cho et al. 2012). KRAS présent sur les endosomes tardifs est capable d'activer la voie MAPK et un inhibiteur de la voie de dégradation lysosomal soutient le maintien de l'activation de cette voie. Des régulateurs, tels que la PKC ou la Calmoduline, impliqués dans la stabilisation de KRAS aux membranes endosomales ont été proposés mais la spécificité et le mécanisme restent à élucider (Alvarez-Moya et al. 2011).

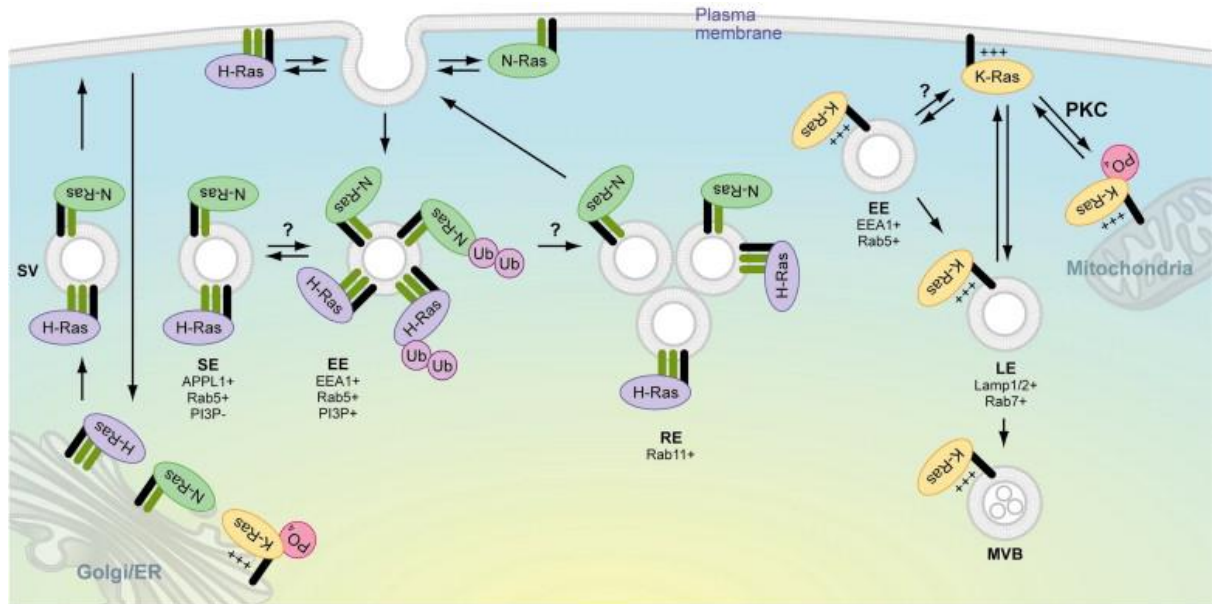


Figure 4 Transport intracellulaire des protéines RAS (Fehrenbacher, Bar-Sagi, Phillips, 2009)

NRAS et HRAS décoorent la surface cytoplasmique des endosomes précoces (EE) EEA1+/Rab5+/PI3P+ à la suite de l'endocytose et, lorsqu'ils sont diubiquitinés (Ub), sont retenus sur ce compartiment. Ils peuvent également être recyclés vers la membrane plasmique (PM), peut-être via les endosomes de recyclage Rab11+ (RE). Ils sont compétents pour la signalisation MAPK. N-Ras et H-Ras circulent également entre le PM et le Golgi en raison d'un cycle de palmitoylation/dépalmitoylation qui se déplace de manière antérograde sur les vésicules sécrétoires (SV) et de manière rétrograde par diffusion.

KRAS décoore également divers endosomes, y compris les endosomes tardifs (LE) Lamp1/2+/Rab7+ et les corps multivésiculaires (MVB). Par opposition aux autres isoformes, les mécanismes participant à la localisation endosomale de KRAS ne sont pas totalement éclaircis. KRAS4b phosphorylé au niveau de la PM par PKC se transloque vers la surface externe des mitochondries ainsi que vers le Golgi et le RE.

Les queues noires sur les protéines Ras représentent les groupements farnésyl, les queues vertes représentent les palmitates et +++ désigne la région polybasique de KRAS4b.

ii. La localisation mitochondriale

La connexion entre les protéines de la famille RAS et la mitochondrie est particulièrement intéressante car cet organe, en plus de contenir son propre ADN, est le cœur de décision de vie ou de mort de la cellule. De plus, la mitochondrie héberge les réactions indispensables au métabolisme de la cellule sur lesquelles la signalisation RAS a une influence.

HRAS, NRAS et KRAS ont été identifiées à la mitochondrie par microscopie de fluorescence ou par fractionnement subcellulaire. Plus particulièrement, NRAS est décrit au niveau des deux membranes mitochondriales, la membrane externe et la membrane interne. Au niveau de cette dernière, NRAS régule la communication, dite rétrograde, de la mitochondrie au noyau (Wolfman et al. 2006). De manière surprenante, autant la localisation que la fonction de NRAS mitochondrial est un processus indépendant de son état de farnésylation. Ceci suggère que NRAS pourrait être retenu aux membranes mitochondriales par un ou des partenaire(s) d'interaction. NRAS a, par exemple, été montré colocalisé avec BCL-2 au niveau mitochondrial dans des cellules de patients atteints de leucémies myéloïdes aiguës

(AML) ainsi que dans des modèles *in-vivo* et *in-vitro* (Omidvar et al. 2007; Le Pogam et al. 2013). A cette localisation, NRAS est capable de se lier au GTP et les protéines effectrices de cette voie sont activées. Au niveau fonctionnel, cette coopération physique induit la progression de syndromes myélodysplasiques (MDS) en AML. Notons que l'ABT-737, un antagoniste de BCL-2, permet de relocaliser le complexe BCL-2/NRAS à la membrane plasmique sans rompre l'interaction. Cette relocalisation favorise l'apoptose des cellules souches cancéreuses myéloïdes d'une part et réduit la transformation MDS-AML d'autre part (Beurlet et al. 2013).

Concentrons-nous maintenant sur KRAS qui nous intéressera pour le reste de cette introduction. La relocalisation de KRAS4b à la mitochondrie est médiée par sa phosphorylation sur la Serine 181 par la PKC (*Protein Kinase C*) (Bivona et al. 2006). Le traitement de la lignée cellulaire MDCK sur-exprimant GFP-KRAS4b12V par de la Bryostatine-1 (un activateur de la PKC) induit en quelques minutes une relocalisation de KRAS4b12V au niveau des membranes intra-cellulaires. L'effet de cette molécule est antagonisé par un pré-traitement par un inhibiteur de la PKC ou par l'expression d'un mutant de KRAS4b12V possédant en position 181 un acide aminé non-phosphorylable. La substitution de la Serine 181 par un acide aminé phospho-mimétique (acide glutamique) aboutit à sa localisation constante au niveau des membranes intracellulaire. Ainsi, KRAS4b12V est relocalisé au niveau de l'appareil de Golgi, de l'enveloppe nucléaire, des membranes du ER, et de la membrane externe mitochondriale. Cependant dans cette étude, la présence de KRAS4b12V au niveau du système de transport vésiculaire n'a pas été étudié. BCL-2 ayant été déjà rapporté comme interagissant de KRAS au niveau mitochondrial (Rebollo, Pérez-Sala, et Martínez-A 1999), l'équipe de Mark Philips a choisi d'évaluer l'impact de l'activité de la PKC sur la co-immunoprécipitation de KRAS4b12V avec différents membres de la famille BCL-2 donc BCL-xL et BCL-2 lui-même. Bien que cette méthode ne permette pas d'exclure une interaction indirecte, celle-ci a permis de confirmer l'interaction de KRAS avec BCL-2 et d'établir que seul l'interaction entre KRAS4b12V et BCL-xL était dépendante de l'activité de la PKC, en ça qu'elle est sensible à un traitement par la Bryostatine-1 et est favorisée par l'expression d'un mutant de KRAS phospho-mimétique. Par microscopie en fluorescence, KRAS et BCL-xL se sont révélés colocalisés au niveau de l'OMM. La conséquence fonctionnelle de cette relocalisation, dans des lignées cellulaires fibroblastiques ou lymphocytaires, est l'induction de l'apoptose de manière dépendante à la protéine BCL-xL mais également dépendante de la capacité de BCL-xL à s'ancrer dans les membranes via son domaine C-terminal. Ces travaux pionniers ont donc posé les bases d'une fonction non-canonique de KRAS sur l'intégrité mitochondriale nécessitant la présence de BCL-xL et participant activement à favoriser l'apoptose.

Il est à noter que le variant d'épissage KRAS4a ne possède pas de Serine en position 181 mais une Valine, donc un acide aminé ne pouvant subir cette phosphorylation dépendante de la PKC. Le mécanisme adressant KRAS4a à la mitochondrie est donc encore inconnu. De manière intéressante, bien que tous les isoformes de RAS interagissent avec l'Hexokinase 1 (HK1) ainsi qu'avec les isoformes de VDAC (*Voltage-Dependant anion channel*), seul KRAS4a est capable de se lier avec l'Hexokinase 2 (HK2) (Amendola et al. 2019). L'interaction entre KRAS4a et HK1/HK2 a lieu au niveau de la membrane externe mitochondriale, et nécessite la farnésylation de KRAS sur sa Cystéine 186. Au contraire, cette interaction est négativement régulée par la palmitoylation de KRAS4a sur sa Cystéine 180, l'adressant à la membrane plasmique. Ainsi, KRAS4a augmente le flux glycolytique, la production de lactate et la production d'ATP des lignées cellulaires tumorales (Chiaradonna et al. 2005; Yun et al. 2009; Gaglio et al. 2011) et

cette fonction est favorisée par son interaction avec HK1. Nous verrons que KRAS participe à plusieurs niveaux à favoriser un « switch » métabolique nécessaire à la genèse et au maintien du phénotype cancéreux

iii. Localisation de KRAS au réticulum endoplasmique

Quelques années plus tard, la question a été posée ainsi : quelle localisation de KRAS4b induit les phénomènes d'apoptose précédemment observés ? Pour cela, l'équipe de Mark Philips a établi des lignées cellulaires de fibroblastes exprimant la protéine KRAS4b12V possédant soit des mutations au niveau du site de phosphorylation 181, soit fusionnée avec de petites séquences d'adressage à la membrane du RE et à l'OMM, deux compartiments connus pour abriter également BCL-xL (Sung et al. 2013). Une première observation au cours de l'établissement de ces lignées a été l'incapacité de générer une lignée exprimant stablement le phospho-mimétique KRAS4b12V181E en raison de l'incapacité de ces cellules à survivre. Ceci a été également observé au sein de la lignée exprimant la fusion KRAS4b ciblée au niveau de la membrane du ER. Ces résultats suggèrent que la localisation réticulaire de KRAS4b est suffisante pour induire une toxicité contrairement à sa localisation mitochondriale. Au niveau du RE, BCL-xL participe à réguler les flux calciques en interagissant avec le domaine C-terminal d'IP3R (*Inositol triphosphate receptor*). L'hypothèse de la participation d'une interaction entre KRAS4b et IP3R dans la toxicité observée a été explorée. In vitro, l'interaction avec le domaine C-terminal d'IP3R1 s'est révélé spécifique du mutant phospho-mimétique de KRAS4b12V, alors que la forme native et la forme non-phosphorylable de KRAS4b12V n'ont pas été co-purifiées avec ce segment d'IP3R1. Dans ce même type d'expérience, la présence de BCL-xL, en plus d'augmenter drastiquement la quantité de KRAS12V181E co-purifié avec le domaine C-terminal d'IP3R1, favorise également cette interaction avec KRAS4b12V sous sa forme native. Cependant, la présence du phospho-mimétique de KRAS4b n'a pas d'influence sur l'interaction entre IP3R et BCL-xL. D'autre part, KRAS4b12V181E co-immunoprécipite avec la forme longue d'IP3R et pas avec un mutant d'IP3R- Δ C. Des résultats similaires ont été obtenus par co-immunoprécipitation des protéines endogènes après stimulation de la PKC. Le modèle proposé est donc une interaction ternaire entre BCL-xL/KRAS/IP3R dépendante de la phosphorylation de KRAS4b au niveau de la sérine 181. Par la suite, en explorant la capacité du mutant phospho-mimétique de KRAS à contribuer aux échanges calciques entre le RE et la mitochondrie, les chercheurs ont mis en évidence, que KRAS4b séquestre BCL-xL au niveau de RE réduisant ainsi sa capacité anti-apoptotique.

II. Conclusion

Dans le but de comprendre la mécanistique des événements soutenant la régulation de l'activité de KRAS par BCL-xL, les questions posées par ce travail ont été : quel impact a BCL-xL sur le trafic intracellulaire de KRAS ? BCL-xL impact-il ainsi les partenaires d'interaction de KRAS ?

En effet, nous avons vu que l'activité des protéines de la famille RAS est dépendante de leur localisation. Ce processus est finement régulé et sous la dépendance de domaines variables en fonction des isoformes et variant d'épissage. D'autre part, l'activité de ces protéines dépend de leurs partenaires d'interaction. Les travaux de Mark Philips dans ce domaine sont particulièrement instructifs bien que ces résultats soulignent la nécessité d'aborder ces questions par des approches

biochimiques permettant, en cellule entière, une résolution spatio-temporel et globale. De plus, les travaux de notre équipe sur le sujet décrivent une fonction non-canonique de BCL-xL dans la régulation de l'activité canonique de KRAS d'une part, mais également comme soutien d'une reprogrammation des cellules cancéreuses vers un phénotype plus agressif (Carné Trécesson et al. 2017). Voyons, tout d'abord, quels sont les caractéristiques communes des cancers et comment KRAS participe à soutenir l'émergence et la progression tumorale.

B. Le Cancer : aspects biologiques et moléculaires

La trace la plus ancienne du cancer remonte au paléolithique il y a 1,7 millions d'années et fut localisée dans les territoires de l'Afrique du Sud actuelle. Mais c'est en Egypte Antique que le premier cas de cette maladie a été répertorié. Ce cas a été décrit dans le plus ancien document chirurgical dont nous disposons. C'est un papyrus datant d'environ 1600 av. J.C. qui décrit la présence de « protubérances sphériques froides » sur la poitrine d'une femme, qui sont aujourd'hui les symptômes du cancer du sein. Le dénomination « Cancer » nous vient d'Hippocrate (460-377 av. J.C.). Ce philosophe grec et père de la médecine a décrit des tumeurs malignes dont l'aspect lui inspira le terme grec « Karkinos » (crabe). (Le préfixe « onco », relatif aux tumeurs est également d'origine grecque (onkos) et signifie tas, masse, gonflement.) De nos jours, le cancer est diagnostiqué en grand nombre et représente la première cause de mortalité chez l'homme et la deuxième chez la femme (Institut National du Cancer, 2021). En 2018, l'incidence de cette maladie en France a été estimée à 382 000 nouveaux cas avec 157 000 cas de décès.

D'un point de vue biologique, cette maladie se caractérise par une multiplication anarchique de cellules échappant aux processus normaux de prolifération, de différenciation et de mort. Chez les hommes, les trois cancers les plus fréquents sont ceux de la prostate, du poumon et du colon alors que chez les femmes, ce sont le sein, le colon et le poumon. Cependant, d'un point de vue biologique, ces cancers sont distincts et impliquent des réponses aux traitements différentes.

I. Caractéristiques communes des cancers

Dans deux articles, parus en 2000 puis en 2011, Douglas Hanahan et Robert Weinberg publient les « *Hallmarks of cancer* » visant à décrire les signes distinctifs permettant de rationaliser la complexité de la biologie des cellules cancéreuses (D. Hanahan et Weinberg 2000; Douglas Hanahan et Weinberg 2011). Ils décrivent un panorama de dix caractéristiques biologiques acquises au cours du développement des tumeurs qui participent à l'élaboration de thérapies visant à limiter la croissance et la progression de la tumeur . Ces caractéristiques communes sont : la dérégulation du métabolisme énergétique des cellules, l'échappement aux signaux de suppression de croissance, la résistance à la destruction par les cellules immunitaires, une perte de contrôle du cycle cellulaire, une instabilité génomique, la promotion d'un microenvironnement pro-tumoral, l'induction de l'angiogenèse, l'activation de capacités invasives et enfin l'acquisition d'une autosuffisance en signaux de croissance et l'échappement à la mort cellulaire. Nous décrirons dans les prochaines parties ces deux derniers marqueurs communs des cancers épithéliaux qui participent activement à la réflexion autour de ce projet de thèse.

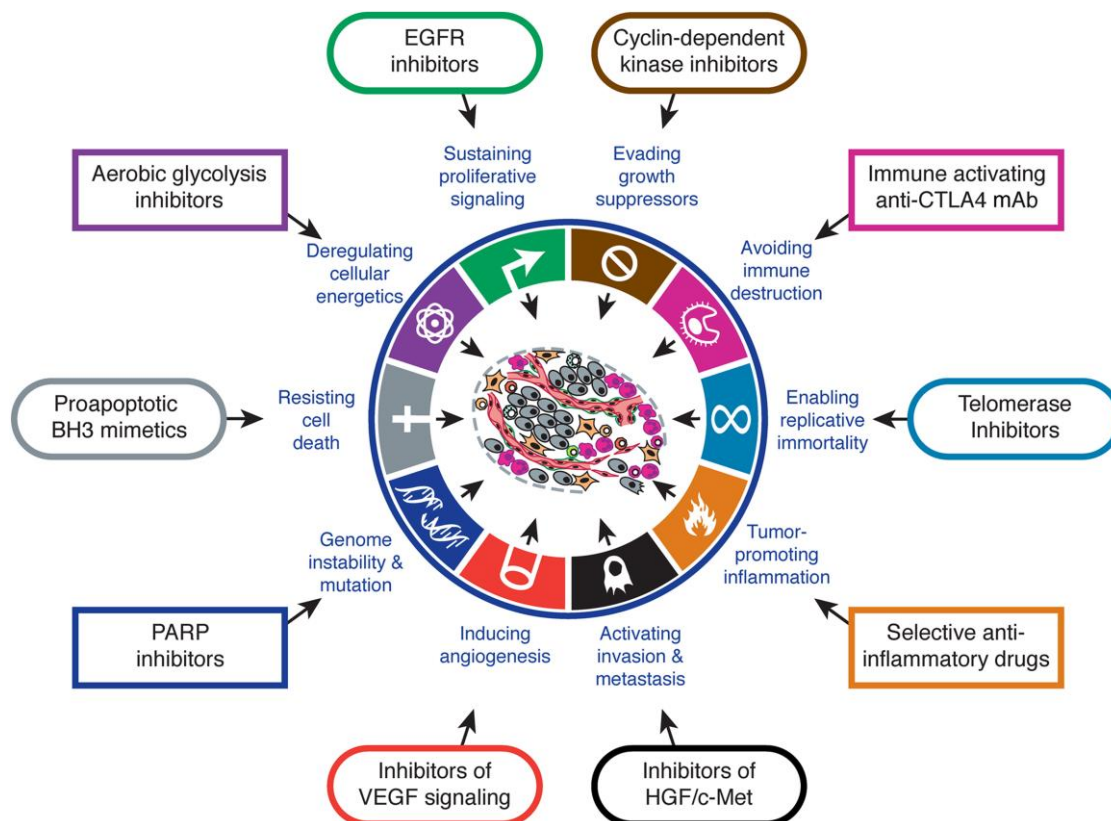


Figure 5 Capacités nécessaires à la croissance et la progression d'une tumeur et stratégies thérapeutiques associées (Hanahan, Weinberg 2011)

Enumération des caractéristiques communes des cancers et des médicaments qui interfèrent avec chacune des capacités acquises nécessaires à la croissance et à la progression des tumeurs. Les médicaments énumérés ne sont que des exemples illustratifs ; il existe un large éventail de candidats médicamenteux avec des cibles moléculaires et des modes d'action différents en développement pour la plupart de ces caractéristiques.

L'activation des voies de signalisations de KRAS sont fréquemment retrouvées dans les tumeurs solides et sont associées à un mauvais pronostic (la plupart du temps en aval de l'activation des RTK).

II. Participation pléiotropique de KRAS dans les cancers

Nous l'avons vu, KRAS est un le premier oncogène décrit chez l'homme et la signalisation RAS soutient diverses fonctions cellulaires tels que la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Lorsque KRAS est dérégulé, les cellules acquièrent une autosuffisance en signaux de croissance, c'est-à-dire, que même sans stimulation par des hormones de croissances, les cellules continuent de proliférer. Ceci aboutit à l'apparition et au maintien des cancers. KRAS présente des mutations activatrices dans plus de 30% des cancers qui touchent des organes variés notamment le pancréas, le colon et le poumon (Barbacid 1986). Dans certains cancers, ce pourcentage monte à 95%. De surcroit, les principaux acteurs en aval de la voie RAS ainsi que les protéines effectrices en aval sont fréquemment altérés dans les cancers (Coulier et al. 1990; Dorard et al. 2017).

a. Les mutants de KRAS et l'acquisition d'une autosuffisance en signaux de croissance

Il existe plusieurs mutations du gène KRAS ayant comme conséquence d'impacter l'activité GTPase de la protéine. Ces mutations sont surreprésentées dans les cancers. En moyenne, 16 % des cancers humains présentent des mutations au niveau des codons 12, 13 ou 61, qui rendent KRAS constitutivement actif (Forbes et al. 2011). La mutation la plus fréquente est la substitution en position 12 d'une glycine par une valine et donne son nom à ce mutant, KRAS12V. Ces différentes mutations empêchent KRAS d'hydrolyser le GTP ce qui a pour conséquence une accumulation de la forme active KRAS-GTP (J. M. L. Ostrem et Shokat 2016). Les protéines effectrices en aval de la voie se retrouvent donc constitutionnellement activées. Une autre conséquence de ces mutations est la perte de l'interaction entre KRAS et les GAPs, aboutissant à la même accumulation de KRAS-GTP (Hunter et al. 2015). Par exemple, les mutations en G12 et Q61 rendent KRAS insensibles à l'action de la GAP NRF1 alors que les mutants en G13 y sont sensibles (Rabara et al. 2019). Certaines mutations peuvent également avoir un impact sur l'interaction entre KRAS et les protéines effectrices. On peut citer les mutants G12V et G12C qui présentent une diminution de l'activation de AKT alors que l'inverse se produit pour le mutant G12D (Nadal et al. 2014).

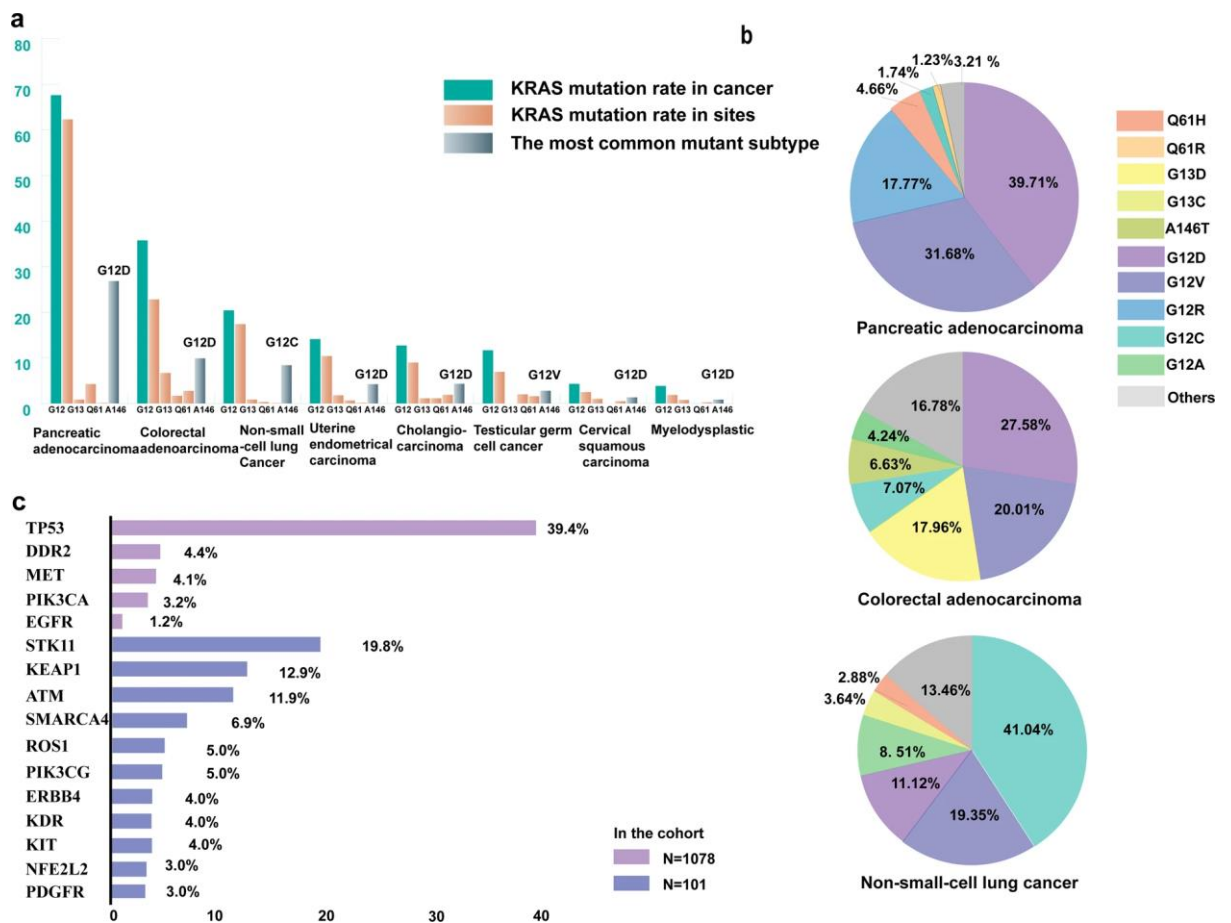


Figure 6 Fréquence des mutations du gène *KRAS* et des co-occurrences avec des mutations d'autres gènes dans les cancers (Huang et al., 2021)

A Fréquence des mutations de *KRAS* dans les différents types de tumeurs y compris la fréquence de mutation des sites communs et la mutation la plus représentée dans différents types de tumeurs. Les mutations de *KRAS* se caractérisent par des mutations faux-sens d'une seule base, dont 98 % se trouvent au codon 12, au codon 13 ou au codon 61.

B Pourcentages de mutants spécifiques représentés dans les trois cancers présentant les taux de mutation les plus élevés de *KRAS*, à savoir le cancer du pancréas, le cancer colorectal et le cancer du poumon non à petites cellules.

C Fréquence des mutations co-occurentes dans les cellules cancéreuses présentant une mutation sur *KRAS*. *TP53* : gène de la protéine tumorale p53 ; *DDR2* : gène du récepteur tyrosine kinase à domaine discoïdine 2 ; *MET* : gène *MNNG HOST Transforming* ; *PIK3CA* : gène de la sous-unité catalytique alpha de la phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase ; *STK11* : gène de la sérine/thréonine kinase 11 ; *KEAP1* : gène de la protéine 1 associée à l'*EGFR* de type kelch ; *ATM* : Gène de la sérine/thréonine kinase ATM, *PIK3CG* : gène de la sous-unité catalytique gamma de la phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase ; *ERBB4* : gène de la tyrosine kinase 4 du récepteur *erb-b2* ; *KDR* : gène du récepteur à domaine d'insertion de la kinase ; *KIT* : gène du récepteur tyrosine kinase du proto-oncogène *KIT* ; *NFE2L2* : gène du facteur nucléaire érythroïde 2, like 2 ; *PDGFR* : symbole précédent du *PDGFRB* (gène du récepteur bêta du facteur de croissance dérivé des plaquettes). Données acquises auprès de l'Atlas du génome du cancer (pan-Cancer) de cBioPortal.

Les sous-types de cancers présentant des mutations KRAS différentes ont des réponses aux traitements différentes. De plus, la co-occurrence de mutations sur d'autres gènes et, notamment, sur des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeurs sont des biomarqueurs prédictifs de réponse aux traitements dans de nombreux cancers (Huang et al. 2021). Il est nécessaire, pour améliorer la survie des patients atteints de ces cancers, de développer des thérapies ciblant spécifiquement les mutants de KRAS.

L'activation constitutive de KRAS par des mutations accompagne la progression tumorale sur plusieurs aspects. Parmi les caractéristiques communes des cellules cancéreuses, on retrouve la dépendance des cellules cancéreuses à la glycolyse aérobie connue sous le nom d'Effet Warburg (Warburg 1925; Liberti et Locasale 2016).

b. Mutants de KRAS et métabolisme

Les mutants activateurs de KRAS influencent tous les aspects clefs du métabolisme des cellules cancéreuses bien que les effets des mutations de KRAS soient différents d'un type cellulaire à un autre.

L'activation aberrante de la voie de signalisation KRAS est responsable d'une reprogrammation métabolique, notamment pour promouvoir la glycolyse (Racker, Resnick, et Feldman 1985). A travers l'étude d'un model murin, une équipe de recherche américaine a montré que la présence de mutations sur KRAS entraîne une augmentation de l'expression de GLUT1 (*Glucose transporter-1*) ainsi que d'un certain nombre d'enzymes glycolytiques dont HK1 et la LDH (*Lactate dehydrogenase*) (Ying et al. 2012). Ils ont également démontré que les mutations KRAS induisent la glycosylation des protéines via l'HBP (*Hexosamine biosynthesis pathway*) ainsi que la production de ribose par la voie des pentoses phosphates (PPP). En effet, le « *knockdown* » des enzymes essentielles à ces voies induisent une forte diminution de la taille tumorale *in vivo* des cancers dépendants de KRAS muté. La conséquence de ces modifications métaboliques a été illustrée dans des lignées cellulaires de cancer colorectal. Dans ces cellules, la mutation de KRAS (ou de B-RAF) mais pas l'expression de KRAS sauvage, entraîne leur survie à long terme dans un environnement pauvre en glucose (Yun et al. 2009). Un inhibiteur de la glycolyse était particulièrement efficace pour cibler ces cellules *in vivo*.

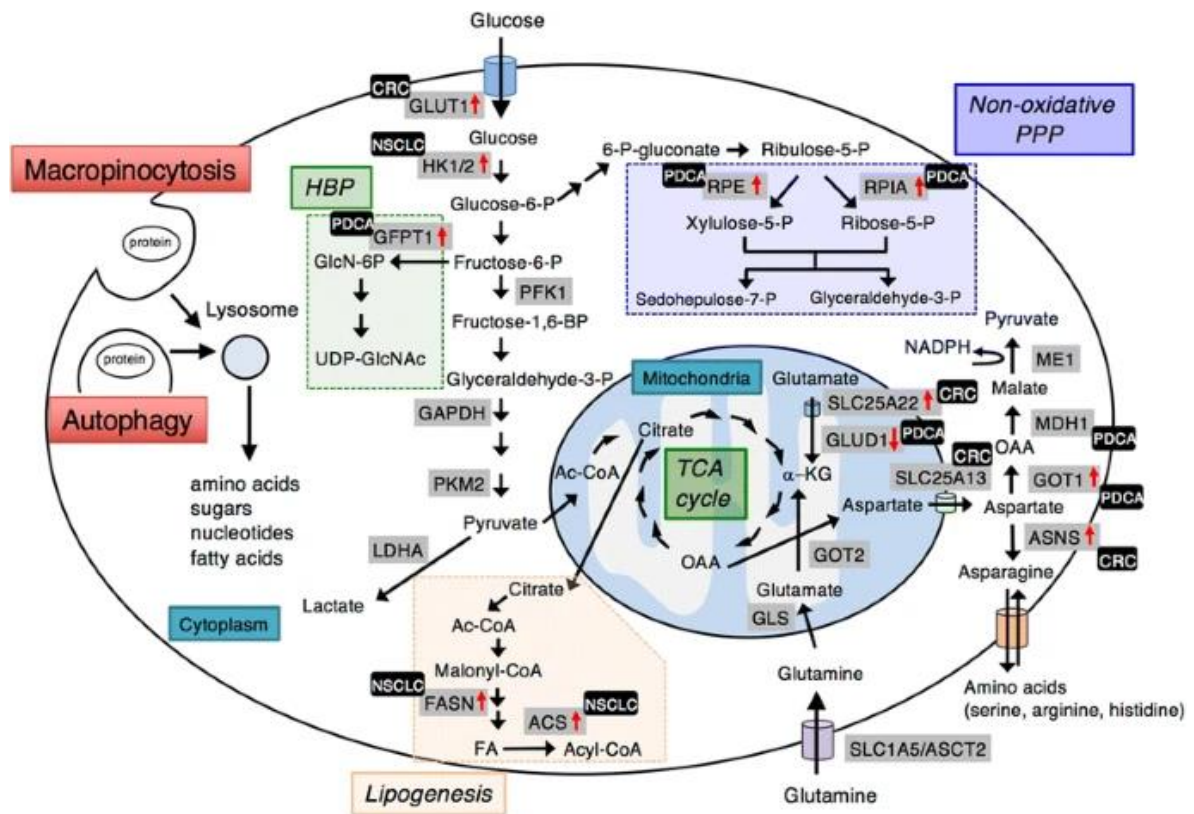


Figure 7 Altérations métaboliques dirigées par KRAS muté (Kawada, Toda, Sakai 2017)

Représentation schématique des voies métaboliques impliquées dans les cancers pilotés par KRAS. Boîtes noires : Type de cancer dans lequel la molécule est associée à un KRAS muté : PDCA carcinome des cellules canalaire du pancréas, CRC cancer colorectal, NSCLC cancer du poumon non à petites cellules. Flèches rouges : Changement du niveau d'expression qui est modulé par KRAS muté : flèche vers le haut pour une régulation à la hausse, flèche vers le bas pour une régulation à la baisse. Entre autres : GLUT1 Glucose transporter 1, HK1/2 hexokinase 1/2, PFK1 phosphofruktokinase 1, GAPDH glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, PKM2 pyruvate kinase M2, LDHA lactate dehydrogenase A

Le métabolisme des acides aminés est également impacté par la sur-activation de la voie RAS. La glutamine est également une source d'énergie importante pour les cellules cancéreuses qui l'utilise de manière non-conventionnel via la régulation de l'expression des enzymes impliquées dans ces voies cataboliques (Wise et Thompson 2010; Bhutia et al. 2015). A titre d'exemple, dans des modèles de cancers pancréatiques *in vitro* et *in vivo*, des chercheurs ont montré que la mutation de KRAS régule la conversion de glutamine en aspartate permettant, par des réactions biochimiques successives, de maintenir la balance RedOx des cellules supportant ainsi la croissance de la tumeur (Son et al. 2013)

i. Différences entre KRAS4a et KRAS4b

Les différences de fonction de KRAS4a et KRAS4b sont notables. Tout particulièrement en ce qui concerne de leur capacité de reprogrammation métabolique. Cet aspect a fait l'objet d'une étude qui traite de la dépendance des cellules souches cancéreuses (CSC) à l'un ou l'autre des variants d'épissage (W.-C. Chen et al. 2021). Par une méthode de tri cellulaire en fonction de la capacité des cellules à expulser un fluorophore via leur pompes à efflux (nommé *Side Population*

Assay), les chercheurs ont montré qu'un « Knock Out » KRAS4a diminue la proportion de CSC ainsi que la proportion de cellules ALDH+. Ces différences significatives n'ont pas été observées après un Knock Out de KRAS4b. De plus, l'expression ectopique de KRAS4a restaure le maintien de ces populations. Ce travail révèle également que l'extinction de KRAS4a mais pas de KRAS4b augmente significativement la production d'ATP et la production de lactate. Ces effets métaboliques sont contrecarrés par le 2-DG, un inhibiteur de la glycolyse. Bien que plusieurs études mettent en lumière des différences dans le « switch » métabolique imputé à KRAS4a ou à KRAS4b, l'effet de l'extinction de KRAS4a reste controversé. En effet, certains travaux montrent à l'inverse un impact négatif de l'extinction de KRAS4a sur la production d'ATP et de lactate (Amendola et al. 2019). Ces travaux soulèvent plusieurs interrogations, notamment quant à la participation de différents interactants au niveau mitochondrial de ces deux variants d'épissage. D'autre part, l'activité canonique de KRAS n'est pas impactée par cet épissage alternatif, et ce dans de nombreuses études. Ceci souligne que des activités non-canoniques des différents isoformes de RAS nécessitent d'être mieux explorés.

c. Voie de signalisation KRAS dans L'EMT

En plus d'induire une prolifération des cellules de manière auto-suffisante, certaines données indiquent que la signalisation RTK-KRAS joue un rôle important dans la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) (Qian et al. 2004; Hammond et al. 2015). L'EMT est un programme de plasticité cellulaire qui contribue à favoriser la survie des cellules, la résistance aux traitements et la cascade métastatique (Das et al. 2019). Ce programme rend les cellules « plastiques » et leur permettent d'acquérir des caractéristiques de cellules souches. En effet, l'EMT est un programme activé lors du développement de l'embryon et est caractérisé par une perte de l'adhésion des cellules entre elles leur permettant de se déplacer et de s'auto-renouveler pour former les cellules souches du futur tissu (Thiery et al. 2009). Ce programme peut être réactivé dans les cellules cancéreuses, soit pour survivre à des stress cellulaires, soit par l'activation de voies oncogéniques telles que la voie RAS (Brabletz et al. 2018).

Les cancers induits par les mutants de KRAS sont souvent associés à l'expression de marqueur d'EMT tels que la perte de l'E-cadhérine ainsi que la surexpression de SNAIL ou Zeb1. Il a été montré *in vivo*, dans un modèle de souris exprimant KRAS muté, que ce programme est activé très tôt au cours de la formation de la tumeur (Rhim et al. 2012). De plus, la co-expression de KRAS et de Bmi1 (*Polycomb-group repressor complex protein 1*) induit l'EMT dans des cellules pancréatiques normales via la surexpression du facteur de transcription SNAIL (S.-J. Chen et al. 2016). Les RTK en amont de la voie RAS sont également impliqués dans ces transformations (Tripathi et Garg 2018). Notre équipe a également démontré qu'une coopération directe entre KRAS et BCL-xL, dans des cellules mammaires normales, influence la transcription de marqueurs de cellules souches cancéreuses et d'EMT tels que HMGA2, FOSL1 et CD44 (Carné Trécesson et al. 2017).

L'EMT est également impliquée dans la résistance aux traitements par l'activation de mécanismes d'échappement à la mort cellulaire (Fischer et al. 2015). A titre d'exemple, dans des cellules de cancer du poumon à non-petites cellules, l'expression de marqueurs de l'EMT est associée à une résistance aux inhibiteurs de l'EGFR et de PI3K (Sequist et al. 2011; Byers et al. 2013). Il a été démontré que l'intégrine $\beta 3$ et la galectine-3 forment un complexe avec KRAS et entraînent à la fois la résistance aux inhibiteurs de RTK et l'induction de diverses sous-populations de CSC dans le cancer du sein, du poumon et du pancréas (Seguin et al.

2014). Plusieurs marqueurs de l'EMT sont proposés comme biomarqueurs prédictifs du stade de la tumeur et de la réponse aux traitements dans différents cancers dans le but d'éviter les mécanismes d'échappement à la mort cellulaire (P. Farmer et al. 2009; Oliveras-Ferraro et al. 2012; Cheng et al. 2014; Busch et al. 2018; Cheaito et al. 2019).

III. Résistance à la mort cellulaire

Aujourd'hui, les alternatives thérapeutiques développées pour lutter contre les cancers dits épithéliaux comprennent la chirurgie, la radiothérapie, les médicaments cytotoxiques ainsi que les thérapies ciblées. Malgré les avancées thérapeutiques basées sur une meilleure compréhension de la biologie tumorale (et l'amélioration concomitante du taux de rémission totale pour de nombreux types de cancers épithéliaux), l'échec thérapeutique reste un sérieux problème dans les maladies agressives ou avancées en raison du phénomène d'échappement à la mort cellulaire, d'apparition de métastases et de récurrence locale de la tumeur primaire (Shibue et Weinberg 2017).

Les cellules cancéreuses sont soumises à plusieurs traumatismes simultanés intrinsèques à l'évolution d'une tumeur qui sont l'hypoxie (manque d'oxygène) (Höckel et Vaupel 2001), la réponse immunitaire anti-tumorale (Munhoz et Postow 2016), la compression mécanique (Jain, Martin, et Stylianopoulos 2014) ou les agents chimiques cytotoxiques. Une tumeur croissante implique une adaptation des cellules cancéreuses pour échapper à ces traumatismes. Voilà pourquoi, la mise en place de mécanismes d'échappement à la mort cellulaire est une des caractéristiques majeures des cellules cancéreuses, participant à la progression tumorale, à la résistance aux thérapies et à la récurrence après traitement (Safa 2016).

La plupart des thérapies anti-cancéreuses activent une ou plusieurs protéines pro-apoptotiques de la famille BCL-2, les « *BH3-only* », afin d'éliminer les cellules cancéreuses en induisant la MOMP. C'est également le cas des nombreux stress inhérents à la croissance tumorale (hypoxie, la pression du système immunitaire...). Malgré les nombreux progrès dans la compréhension des mécanismes d'induction de la MOMP, un enjeu majeur persiste, la sélection après traitement de populations cellulaires exprimant fortement les anti-apoptotiques de la famille BCL-2, tel que BCL-xL. Certaines altérations oncogéniques elles-mêmes induisent l'expression de protéines « *BH3-only* ». La signalisation KRAS, par exemple, participe à ces phénomènes. En effet, cette voie oncogénique régule l'expression des « *BH3-only* » BIM, PUMA et NOXA via le contrôle de leur facteurs de transcription (Sheridan et al. 2010; Campone et al. 2011; Y. L. Liu et al. 2014).

Pour comprendre ces mécanismes d'adaptation, commençons par décrire différents mécanismes de mort cellulaire.

C. Les morts cellulaires

Chaque jour, 10^8 des cellules de notre organisme engagent des processus finement régulés de mort cellulaire. Au-delà d'assurer l'équilibre entre naissance et mort de nos cellules, ces processus de mort cellulaire participent à des aspects fondamentaux de notre survie, en permettant par exemple la formation de cavités lors du développement embryonnaire mais également en permettant l'élimination de cellules infectées ou anormales. En cas de déséquilibre entre naissance et mort de cellules, des pathologies peuvent apparaître. Une mort cellulaire exacerbée peut induire l'apparition de pathologies dites dégénératives pouvant perturber les systèmes neuronaux, musculaires ou immunitaires, menant à des maladies répandues telles que Parkinson ou Alzheimer. A l'inverse, une résistance anormale à la mort cellulaire peut être à l'origine de maladies, telles que les maladies auto-immunes ou le cancer, en raison de la persistance de cellules superflues ou présentant des mutations aberrantes. Un processus de régulation des morts cellulaires est donc crucial au cours du développement et de la vie des organismes vivants.

I. Aspect général des morts cellulaires

a. Les processus de morts cellulaires non-apoptotiques

Les processus de morts des cellules sont des mécanismes clés dans la vie d'un organisme. Ces différents processus sont conservés au cours de l'évolution et sont soutenus par des programmes de régulation fins qui font encore l'objet de découvertes majeures. Plusieurs décennies de recherche dans ce domaine ont amené à décrire et classer, par des paramètres morphologiques et moléculaires, une dizaine de mécanismes amenant à l'arrêt de la prolifération et à la mort des cellules (Schweichel et Merker 1973; Kroemer et al. 2005; 2009; L. Galluzzi et al. 2012; Lorenzo Galluzzi et al. 2018). La description de ces différents mécanismes s'accompagne du développement de méthodes d'identification et de quantification de ces événements (Hu et al. 2021).

La nécrose fut longtemps considérée comme une mort cellulaire uniquement « accidentelle » et incontrôlée, en cela qu'elle est irréversible et a été souvent observée à la suite d'un traumatisme local mécanique, chimique ou à de fortes températures. Or, des études mettent en évidence le déclenchement d'un réel programme nécrotique notamment lorsque les autres types de mort programmées sont inefficaces (Golstein et Kroemer 2007). La nécrose à proprement parler se traduit par un gonflement de la cellule suivi d'une rupture de sa membrane et d'une libération du contenu cellulaire participant à un recrutement local du système immunitaire. En plus de la nécrose accidentelle, plusieurs types de programmes menant à la mort des cellules sont aujourd'hui décrits. Une nomenclature spécifique permet désormais de différencier les éléments qui déclenchent et exécutent ces différents phénomènes. On distinguera donc la nécroptose (pouvant être activée par des récepteurs de mort et activant la voie RIPK.), la pyroptose (activée par des DAMPs ou PAMPs et médiée par GSDMD), la ferroptose (activée par le Fer et médiée par les acteurs de la balance ROS/antioxydants), la mort dépendante des lysosomes (activée par l'éclatement intra-cellulaire des membranes lysosomales, entre autres.(Tang et al. 2019)

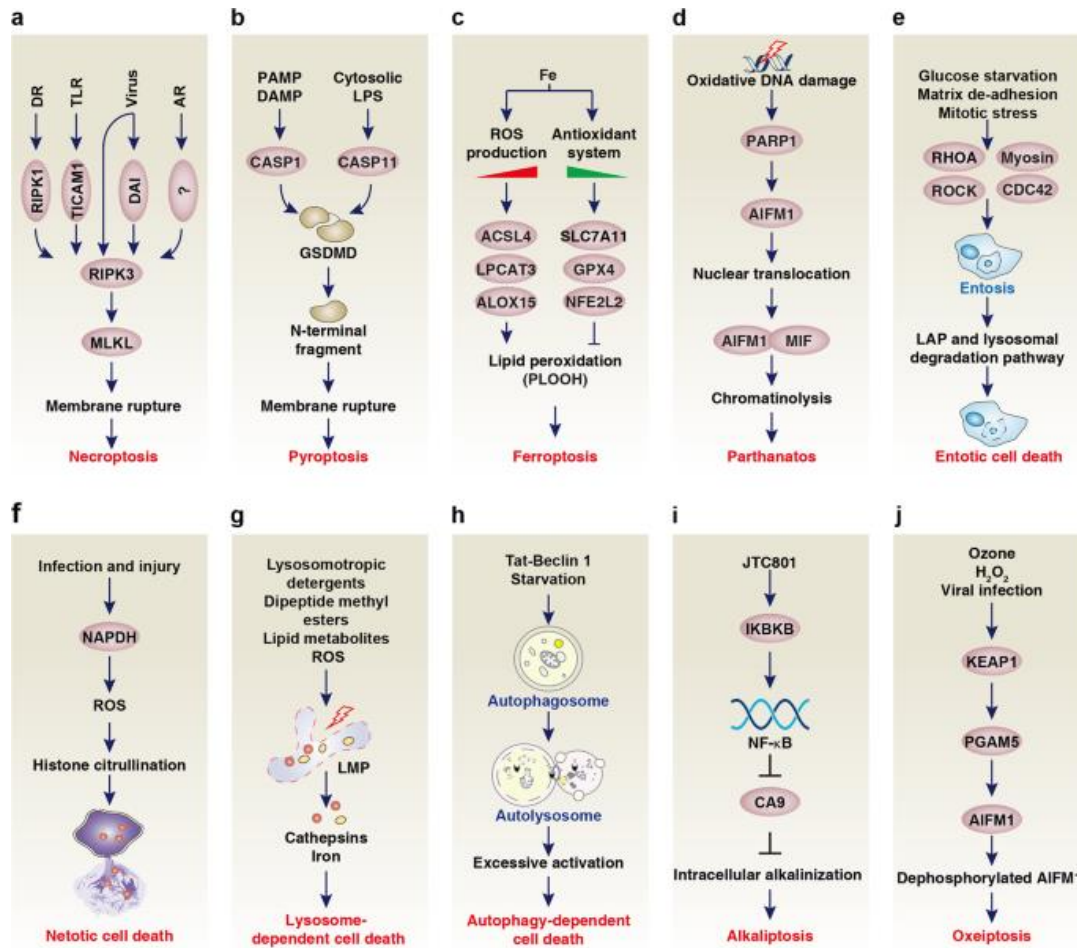


Figure 8 Différents types de mécanismes non-apoptotiques menant à la mort cellulaire (Tang et al. 2019)

a La nécroptose. MLKL stimulée par RIPK3 est nécessaire à la formation de la rupture de la membrane. Les déclencheurs en amont comprennent les récepteurs de mort (DR), le TLR et les virus, qui induisent l'activation de RIPK3 par l'intermédiaire de RIPK1, TICAM1 et ZBP1, respectivement. En outre, RIPK3 est activé par les récepteurs d'adhésion (AR) via une protéine adaptatrice ou des kinases inconnues. **b La pyroptose** est principalement pilotée par GSDMD après le clivage de cette protéine par CASP1 et CASP11 en réponse à des PAMPs et DAMPs, ou au LPS cytosolique. **c La ferroptose** est une forme de mort cellulaire qui repose sur l'équilibre entre la production de ROS induite par l'accumulation de fer et le système antioxydant pendant la peroxydation lipidique. La peroxydation lipidique est médiée par la voie ACSL4-LPCAT3-ALOX15. En revanche, plusieurs systèmes antioxydants, en particulier le système comprenant SLC7A11, GPX4 et NFE2L2, inhibent ce processus. **d Le parthanatos** est une forme de mort cellulaire dépendante de PARP1 qui repose sur la voie AIFM1-MIF. **e L'entose** est d'une forme de cannibalisme cellulaire par l'activation de l'entose suivie de l'engloutissement et de la mort des cellules par LAP et la voie de dégradation lysosomale. RHOA, ROCK, la myosine et CDC42. **f La NETose** (mort cellulaire netotique) est provoquée par la libération de NET, qui est régulée par la production de ROS médiée par la NADPH oxydase et la citrullination des histones. **g La mort cellulaire dépendante du lysosome** est médiée par la libération d'enzymes hydrolytiques (cathepsines) ou de fer lors de la perméabilisation de la membrane lysosomale (LMP). **h La mort cellulaire dépendante de l'autophagie** est entraînée par la machinerie moléculaire de l'autophagie. **i L'alcaliptose.** est entraînée par l'alcalinisation intracellulaire après la régulation négative de CA9 dépendante de la voie IKBKB-NF-κB. **j L'oxéptose** est une forme de mort cellulaire induite par les radicaux libres entraînée par l'activation de la voie KEAP1-PGAM5-AIFM1.

Les données actuellement disponibles soutiennent que les traitements, pour être cliniquement efficaces contre une cellule maligne donnée, doivent affecter son intégrité mitochondriale (Philippe Juin et al. 2013). Comme cela a été examiné ailleurs (Bock et Tait 2020), les mitochondries jouent des rôles importants dans de nombreuses formes de mort cellulaire régulée et tout particulièrement, l'apoptose.

b. Apoptose

L'apoptose, aussi appelée mort cellulaire programmée de type I, fût observé pour la première fois en 1842 par Carl Vogt puis théorisée au fur et à mesure de l'avancée des technologies.

L'apoptose peut être déclenchée par des signaux moléculaires intracellulaires, tels que des dommages de l'ADN, ainsi que par des signaux extracellulaires, tels que le contact de la cellule avec des lymphocytes T cytotoxiques. On distingue ainsi l'apoptose extrinsèque et l'apoptose intrinsèque. Malgré les différences moléculaires d'activation de ces deux voies, que nous décrirons par la suite, l'apoptose est toujours soutenue par des protéines essentielles appelées les CASPASES. Ces protéines qui sont des *cysteine aspartyl-specific proteases*, représentent une classe d'enzymes de dégradation par clivage de plusieurs centaines de protéines essentielles aux fonctions cellulaires telles que le cytosquelette ou les protéines nucléaires. On distingue :

- Les CASPASES initiatrices (-2, -8, -9, -10), participant aux clivages initiaux nécessaires à l'activation de l'apoptose (Couzinet, Hérincs, et Hueber 2002).
- Les CASPASES effectrices (-3,-6, -7) participent quant à elles à façonner le devenir de la cellule qui a enclenché son programme de mort cellulaire (Wu et al. 2014; Shalini et al. 2015).
- Les CASPASES « inflammatoires » (-1,-4,-5) qui participent quant à elles à la régulation de l'inflammation par, entre autres substrats, la maturation de certaines cytokines pro-inflammatoires (Broz et al. 2012; Agard, Maltby, et Wells 2010).

Ces différents types de CASPASES participent ensemble à un mécanisme d'amplification du signal apoptotique par activation séquentielle qui est appelée « la cascade d'activation des CASPASES ».

Une fois que le processus apoptotique est activé, des changements morphologiques sont observés. Dans les premières étapes, le noyau de la cellule apoptotique se condense. Il s'en suit une perte du potentiel transmembranaire des mitochondries et une présentation à la surface externe de la dite cellule des lipides particuliers (les PS, *phosphatidyl serines*) qui sont normalement restreints à la surface interne de la membrane cellulaire. Il s'en suit une fragmentation nucléaire et cytoplasmique de cette cellule en de multiples débris (corps apoptotiques) qui sont ensuite phagocytés par les macrophages environnant. Les manifestations morphologiques spécifiques aux cellules apoptotiques ont permis d'élaborer des méthodes biochimiques pour leur détection.

Les cellules phagocytaires (monocytes, macrophages et cellules dendritiques) sont à l'origine de la mort à proprement dite des cellules apoptotiques par leur capacité à être recrutées et à reconnaître les corps apoptotiques afin de les « digérer ». La première étape repose sur l'émission par les cellules apoptotiques de signaux dits « *find me* ». Parmi les signaux chimioattractants « *find me* », nous

pouvons citer la libération des nucléotides ATP et UTP dans le milieu extracellulaire au cours des premières étapes de l'apoptose contribuant au recrutement actif des monocytes (Elliott et al. 2009). Une fois les cellules immunitaires recrutées, celles-ci reconnaissent les corps apoptotiques via des signaux dits « *eat me* ». Les PS, exposés à la surface externe des corps apoptotiques, sont les signaux les plus décrits.

i. Apoptose extrinsèque

La voie extrinsèque de l'apoptose, également appelée la voie de récepteurs de morts, se distingue par le fait qu'elle est activée par un signal venant de l'extérieur de la cellule. Ce signal peut provenir de facteurs sécrétés par les cellules environnantes, tels que le TNF ou FAS Ligand, mais également de la liaison directe d'une autre cellule, tel que les lymphocytes T cytotoxiques. Ce signal est capté à la surface des cellules donc, par ce qui est communément appelé des récepteurs de mort (TRAILR ou FAS). La liaison de ces récepteurs à leurs ligands entraîne leur oligomérisation suivi par le recrutement, au niveau d'un domaine précis (le DD, *Death domain*) à leur base intra-cellulaire, de différentes protéines adaptatrices (FADD, TRADD, RIP) et des pro-CASPASES initiatrices (CASPASES 8 et 10). Ce super-complexe forme ce qu'on appelle le complexe DISC pour *Death Inducing Signaling Complex*.

Les pro-CASPASES ainsi recrutées sont alors clivées au niveau d'un site spécifique afin de les activer. Elles peuvent ainsi cliver à leur tour d'autres CASPASES effectrices de l'apoptose (CASPASES 3,7 et 6) ou cliver la protéine BID en tBID induisant sa translocation vers la membrane externe mitochondriale afin de co-activer la voie intrinsèque de l'apoptose (Pfeffer et Singh 2018).

La voie extrinsèque de l'apoptose peut être régulée par la cellule à deux niveaux.

- Soit en inhibant le clivage des CASPASES initiatrices par le complexe DISC, fonction portée par la protéine c-FLIP (*FLICE Associated Death Factor*).
- Soit en inhibant directement les CASPASES effectrices, fonction portée par une famille de protéines appelées les IAPs (*Inhibitors of Apoptosis Protein*). (Pfeffer and Singh, 2018).

ii. Apoptose intrinsèque ou régulation mitochondriale de la mort cellulaire

L'apoptose intrinsèque, aussi appelée la voie mitochondriale, est déclenchée par des signaux intracellulaires pouvant être de différentes natures. Ces signaux sont appelés des « stress » et parmi eux nous pouvons citer des dommages à l'ADN. Cette cascade d'évènements voit la mitochondrie comme régulateur et acteur central.

En effet, la perte de l'intégrité mitochondriale, et notamment la MOMP (*mitochondrial outer membrane permeabilization*) conduit à la libération de facteurs apoptogéniques dans le cytosol. Certains de ces facteurs (ex : cytochrome c) déclenchent la cascade d'activation des CASPASES. La mort cellulaire par apoptose est déclenchée lorsque le dommage mitochondrial et l'activité des CASPASES sont au-dessus d'un certain seuil, mais les éléments moléculaires qui définissent ces seuils, et la biologie d'une cellule vivante à peine en deçà, font actuellement l'objet de nombreuses études.

II. Aspects moléculaires de l'apoptose intrinsèque

L'organite au centre des processus d'activation de l'apoptose intrinsèque est la mitochondrie (P. Juin et al. 1998). En cas de dommages cellulaires importants, une MOMP massive est déclenchée. Les protéines de la famille BCL-2 sont un groupe de protéines intracellulaires particulièrement étudiées pour leur rôle majeur dans la régulation de la voie intrinsèque de l'apoptose .

a. Les protéines de la famille BCL-2

Le premier membre de cette famille de protéines à avoir été décrit est BCL-2 (B-cell Lymphoma 2) (Tsujimoto et al. 1984). En effet, dans le Lymphome B, l'équipe de Carlo M. Croce a identifié une translocation chromosomique t(14:18) du gène de BCL-2 (présent initialement sur le chromosome 18) juxtaposé au promoteur du gène codant pour les chaînes lourdes des immunoglobulines (sur le chromosome 14) (Cleary, Smith, et Sklar 1986). La conséquence de cette translocation est la surexpression du gène codant pour BCL-2, participant ainsi au développement du cancer par la régulation négative de la mort par apoptose (Reed 1994). BCL-2 a rapidement été défini comme un proto-oncogène et de nombreuses études ont permis d'incriminer BCL-2 comme acteur majeur dans d'autres cancers (Joensuu, Pylkkänen, et Toikkanen 1994; Eliopoulos et al. 1995; Raffo et al. 1995) ainsi que dans le développement embryonnaire (Novack et Korsmeyer 1994; Baer 1994).

L'analyse de la séquence génétique de la protéine BCL-2 a mené à l'identification de plusieurs autres membres de cette famille. Bien que le terme « homologie » fait encore l'objet d'études (Aouacheria et al. 2013), les protéines de la famille de BCL-2 sont classées en fonction de domaines caractéristiques et comprennent :

- les membres anti-apoptotiques (BCL-2, BCL-xL, MCL-1...) présentant 3 à 4 domaines d'homologie (BH) en commun avec BCL-2;
- les membres pro-apoptotiques à multi-domaine, que sont BAX et BAK, qui possèdent 3 BH en commun avec les membres anti-apoptotiques;
- les protéines pro-apoptotiques « BH3-only » (BID, BIM, PUMA, NOXA, BIK, HRK, BFM, BNIP3) qui ne possèdent qu'un BH avec BCL-2, le domaine BH3.

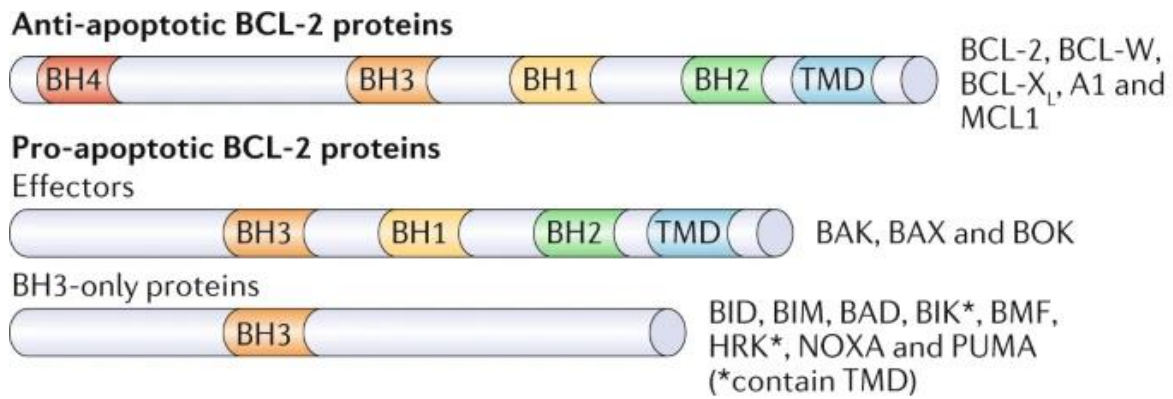


Figure 9 Protéines de la famille BCL-2, Domaines d'homologie (Bock and Tait, 2020)

Représentation des différents domaines d'homologie des protéines de la famille BCL-2 : les anti-apoptotiques à multi-domaines (tels que BCL-2, BCL-xL, MCL-1), les pro-apoptotiques à multi-domaines (tels que BAX, BAK et BOK) et des pro-apoptotiques dits « BH3 only » (tels que PUMA et NOXA).

b. Evènements moléculaires en amont de la MOMP

BCL-2 et ses homologues maintiennent l'intégrité mitochondriale via un réseau d'interactions intracellulaires sélectives. Le motif clé est l'engagement, par une poche hydrophobe des protéines anti-apoptotiques, avec le domaine BH3 des protéines pro-apoptotiques. Cette liaison prévient le déclenchement d'une activation de BAX/BAK en oligomères qui s'insèrent dans la membrane externe mitochondriale et la perforent (Er et al. 2006; Lalier et al. 2007). Cette liaison aux domaines BH3 est à la base de la fonction dite canonique des homologues de BCL-2 (Philippe Juin, Cartron, et Vallette 2005). Les protéines pro-apoptotiques dites « BH3 only » agissent donc comme des senseurs du stress cellulaire. Leur niveau d'expression est sous la dépendance de plusieurs facteurs de transcription (tels que p53, E2F1 et IRF3) et leur expression est activée à la survenue d'un signal de stress. De la même manière, l'expression des membres anti-apoptotique est finement régulée, pour soit maintenir la balance pro-survie de la cellule, soit faire pencher la balance pour déclencher la MOMP. En effet, les homologues anti-apoptotiques de BCL-2 exercent leur fonction canonique en empêchant l'oligomérisation de BAX et BAK et la perméabilisation subséquente de la membrane externe mitochondriale (Youle et Strasser 2008).

i. Amorçage mitochondrial

Sur la base des interactions dynamiques qui se produisent entre membres de la famille BCL-2, trois modèles mécanistiques ont été proposés (Shamas-Din et al. 2013) :

- le modèle d'activation directe (mode 1) suggère que les protéines « BH3-only » sont nécessaires à l'activation des deux protéines pro-apoptotiques BAX et BAK. Les « BH3-only » dits activateurs BID, BIM et PUMA se lient aux protéines pro et anti-apoptotiques de la famille BCL-2. Les « BH3-only » dits

sensibilisateurs, NOXA, BIK, HRK, BFM, BNIP3, se lient uniquement aux membres anti-apoptotiques pour libérer les « BH3-only » activateurs et promouvoir la MOMP (Letai et al. 2002). Les membres anti-apoptotiques de la famille BCL-2 sont toutefois capables de se lier directement à BAX et BAK et afin de maintenir l'intégrité de la membrane externe de la mitochondrie.

- Le modèle d'activation indirecte (mode 2) suggère que BAX et BAK sont constitutivement actifs et doivent être inhibés par les protéines anti-apoptotiques. Pour déclencher l'apoptose, les protéines « BH3-only » rompent l'interaction entre BAX/BAK et les membres anti-apoptotiques (Yin et al. 2017).
- Dans le modèle unifié, les membres anti-apoptotiques séquestrent à la fois les « BH3-only » activateurs (mode 1) et la forme active de BAX/BAK (mode 2). Bien que les deux modes d'inhibition aient lieu simultanément, l'inhibition par le mode 1 est moins efficace que par le mode 2. Fait important, le modèle unifié intègre également les fonctions de BAX et BAK dans la fission et la fusion mitochondriales et postule que seule la répression par le mode 2 affecte ce processus. Ce modèle est donc le premier à lier explicitement les modes de régulation de la MOMP et la dynamique mitochondriale (Llambi et al. 2011).

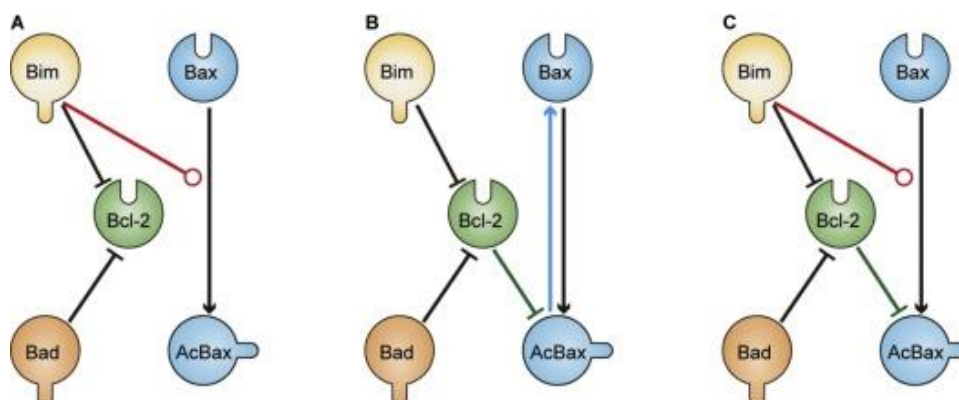


Figure 10 Représentation graphique des modèles mécanistiques orchestrant l'activation de BAX (Yin et al. 2017)

A Modèle d'activation direct

B Modèle d'activation indirect

C Modèle unifié

L'état cellulaire qui résulte de la formation des complexes pro- et anti-apoptotiques n'est pas déficient pour l'apoptose mais il est au contraire « mito-primed » : il s'agit d'un état viable mais amorcé (« primed ») pour la perméabilisation mitochondriale. C'est un état sous dépendance, puisqu'il nécessite une activité de liaison aux domaines BH3 soutenue pour rester viable.

Cet état « mito-primed » est particulièrement intéressant car :

- il est beaucoup plus fréquemment retrouvé dans les cellules cancéreuses que dans les cellules normales (Chonghaile et al. 2011) ;
- son induction prédit l'efficacité des traitements cytotoxiques (Montero et al. 2015) ;
- il peut être vulnérable à une nouvelle classe d'agents thérapeutiques, les BH3-mimétiques. Ces molécules sont en cours d'évaluation pour leur efficacité à induire la mort des cellules cancéreuses comme en témoigne l'entrée en clinique d'un BH3mim sélectif de BCL-2 (Venetoclax) (Montero et Letai 2018) .

ii. Oligomérisation de BAX et BAK

Lorsque qu'un seuil, encore mal défini, est franchi, une MOMP massive est déclenchée. Cette étape menant à MOMP est l'oligomérisation de BAX et BAK et la formation de pores. Une fois libéré de sa liaison avec les anti-apoptotiques :

- BAX insère les hélices 5, 6 et 9 dans la MOM (Annis et al. 2005)

- l'hélice 9 de BAK est constitutivement trans-membranaire donc l'activation de BAK conduit à l'insertion d'au moins l'hélice 6 dans la MOM (Oh et al. 2010)

Ensuite, BAX et BAK s'homodimérisent via l'interaction d'un domaine BH3 avec une poche hydrophobe. Les dimères se propagent en oligomères plus grands formant des pores et entraînant la libération du cytochrome c de la mitochondrie.

Toutes ces découvertes ont motivé la recherche de petites molécules capables de cibler spécifiquement les interactions des protéines de la famille BCL-2 (Delbridge et al. 2016). Au cours des dernières décennies, le développement de médicaments thérapeutiques innovants appelés BH3 mimétiques, comme l'ABT-737 (Baev et al. 2014), a montré une efficacité pour étudier et inhiber l'activité anti-apoptotique typique des cellules cancéreuses.

a. Evènements moléculaires en aval de la MOMP

Les évènements suivant la MOMP ont été décrits pour la première fois en 1996. Wang et ses collègues ont découvert que pendant l'apoptose, en plus de la perte du potentiel mitochondrial, le Cytochrome C est libéré des mitochondries et favorise l'activation des CASPASES (X. Liu et al. 1996). En effet, lorsque le Cytochrome C est libéré dans le cytoplasme, il interagit avec la protéine adaptatrice Apaf-1 et avec la pro-CASPASE-9 pour former un complexe multiprotéique appelé apoptosome (Yuan et Akey 2013). Une fois formé, l'apoptosome peut alors activer la CASPASE-9. Une fois induite, cette caspase initiateur peut à son tour activer les CASPASES effectrices (3 et 7) (Bock et Tait 2020). Il s'en suit une séquence d'évènements morphologiques et moléculaires aboutissant à la formation de corps apoptotiques digérés par l'environnement immunitaire.

En plus de la libération du cytochrome c, les protéines SMAC (pour *second mitochondria-derived activator of caspases*) et OMI sont aussi libérées dans le cytoplasme. Ces protéines inhibent XIAP (pour *X-linked inhibitor of apoptosis protein*) empêchant ainsi son activité inhibitrice des CASPASES-3, -7 et -9. Le signal apoptotique est ainsi amplifié (Salvesen et Duckett 2002). Il est important de retenir que ce processus de mort cellulaire est initié soit par une augmentation de la signalisation pro-apoptotique, soit par une diminution de la signalisation anti-apoptotique via, notamment, les niveaux d'expression des membres de la famille

BCL-2 (Hanson et al. 2008). Les membres de cette famille de protéines jouent donc un rôle crucial de points de contrôle par lesquels le sort de chaque cellule est évalué en permanence.

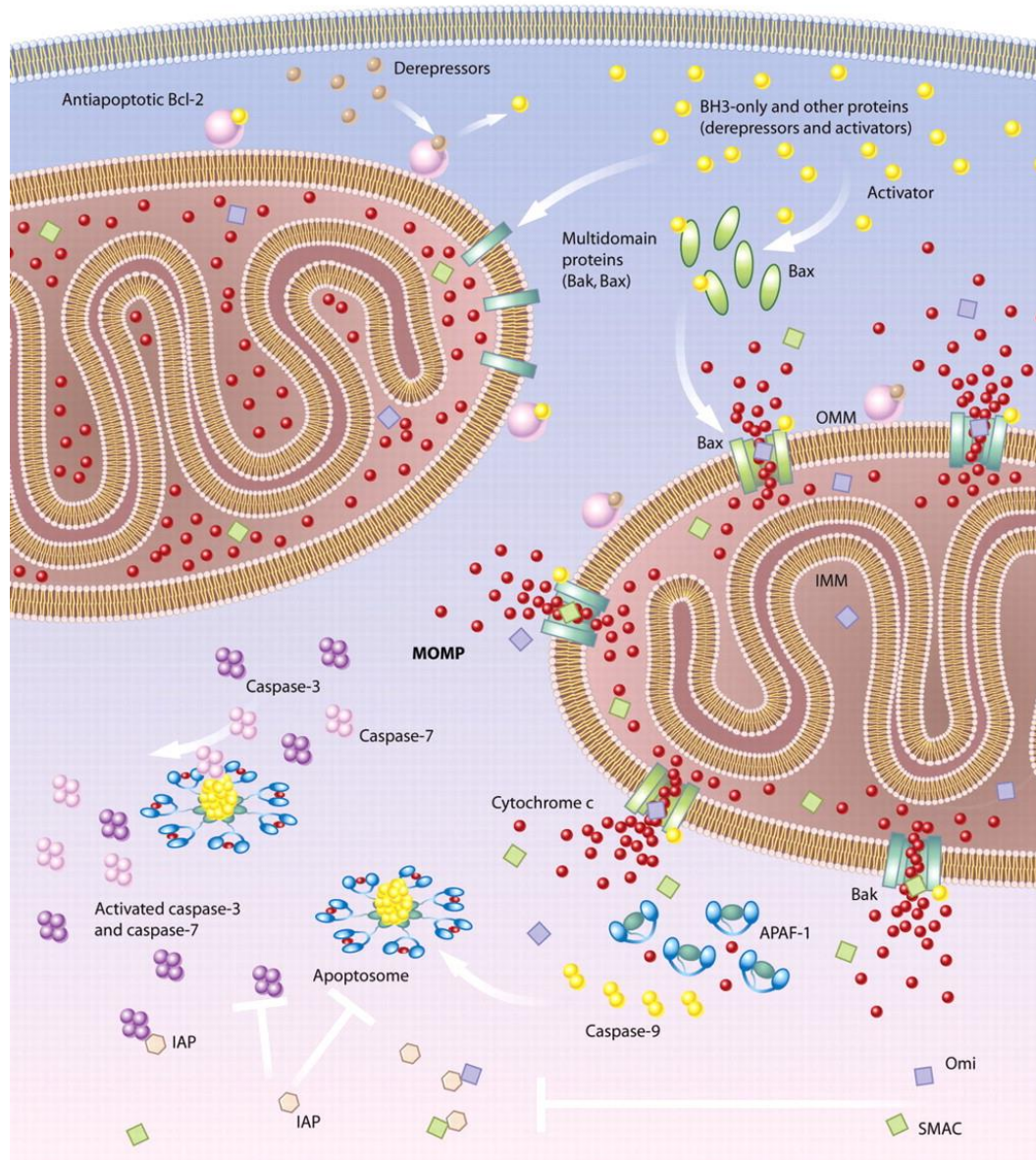


Figure 11 Représentation des événements en amont et en aval de la MOMP (Spierings et al., 2005)

Au cœur du processus apoptotique se trouve la MOMP. Ce phénomène est principalement médié par les protéines pro-apoptotiques BAX et BAK, et inhibé par les protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2. Les protéines « BH3-only » de cette famille régulent la MOMP soit en activant BAX et BAK (activateurs), soit en s'opposant aux membres anti-apoptotiques (répresseurs). La MOMP permet aux protéines de l'espace intermembranaire mitochondrial d'accéder au cytosol. Le cytochrome c déclenche l'activation de l'APAF-1, ce qui entraîne la formation de l'apoptosome, puis le recrutement et l'activation de la caspase-9. La caspase-9, à son tour, clive et active les caspases exécutrices 3 et 7 pour orchestrer l'apoptose par le clivage de substrats clés. IAP (Inhibitor of apoptosis protein) inhibe l'activation des caspases, et cette inhibition peut être inversée par les antagonistes de IAP (par exemple, SMAC et Omi) libérés par les mitochondries lors de la MOMP.

D. Localisations et Fonctions de BCL-xL

En plus de la régulation de l'apoptose intrinsèque, BCL-xL peut moduler une diversité de fonctions biologiques (M. Li et al. 2020). La fonction exercée est dépendante de plusieurs paramètres : sa localisation sub-cellulaire, ses modifications post-traductionnelles et enfin ses partenaires d'interaction. Les signaux perçus par les cellules, dirigent ces différents paramètres et guident leur devenir.

I. Les localisations subcellulaires de BCL-xL

BCL-xL, principalement localisé au niveau de la membrane externe mitochondriale (MOM) (Vuillier et al., 2018), se trouve également dans le cytoplasme ainsi qu'au niveau des membranes internes mitochondriales (REF), du réticulum endoplasmique (Popgeorgiev et al., 2018) et des endosomes (Farmer et al., 2019).

a. Localisation à la membrane externe mitochondriale

L'ancrage de BCL-xL aux membranes résulte d'un processus dynamique dans lequel l'adressage membranaire est contrebalancé par un mécanisme de rétrotranslocation. Sous un stress apoptotique, BCL-xL est capable d'être transloquée du cytosol à la MOM. Cette observation reflète une dynamique subcellulaire de BCL-xL dépendante du statut de la cellule et des signaux reçus. Nous l'avons vu, ces signaux peuvent être de différentes natures, et c'est au niveau de la MOM que la balance entre survie et mort de la cellule s'opère.

BCL-xL présente 44% d'homologie de séquence avec BCL-2. Ces deux protéines, ayant pourtant une fonction semblable dans la protection des cellules contre l'apoptose, ont toutefois des localisations différentes (Krajewski et al. 1993; Lithgow et al. 1994). Ces deux protéines possèdent une hélice α hydrophobe jouant le rôle de domaine transmembranaire (TM) C-terminal et leur permettant leur ancrage aux membranes. En effet, l'extrémité TM de BCL-xL l'ancre préférentiellement à la MOM ou aux membranes du RE qui peuvent être en continuité via les structures de contacts appelées MAM (*Mitochondrial associated ER membrane*). L'étude de ces domaines révèle des différences entre BCL-xL et BCL-2 au niveau des résidus qui entourent l'hélice α hydrophobe. L'équipe de Christoph Borner a démontré, par des mutations génétiques ciblées, que BCL-xL présente une succession de deux résidus basiques de chaque côté du TM indispensable à son insertion dans la MOM (Kaufmann et al. 2003). Cette succession de résidus basiques est absent de la séquence de BCL-2, ce qui pourrait expliquer les différences de localisation de ces deux protéines. Plusieurs hypothèses ont été formulées quant à la possible implication d'autres protéines dans ce processus. De manière surprenante, la fusion de l'hélice α 1 N-terminale de BCL-xL avec la protéine GFP induit la localisation de la GFP à la MOM (McNally et al. 2013).

Les protéines pro-apoptiques BAX et BAK sont sujettes à un phénomène de rétrotranslocation de la MOM au cytosol. L'équipe de Richard Youle a montré que BCL-xL participe à l'inhibition de BAX en favorisant son maintien au cytosol sans qu'un mécanisme de compétition pour l'ancrage à la MOM ait été détecté (Edlich et al. 2011). Ce mécanisme est également observé entre BCL-xL et BAK et les domaines incriminés sont le TM de BCL-xL et les domaines BH3 de BAX et BAK (F Todt et al. 2013; Franziska Todt et al. 2015). BCL-xL, qui rétrotransloque également de la MOM au cytoplasme, est maintenu plus longtemps à la MOM en absence de BAX. L'inverse est également vrai puisque la surexpression de BAX accélère la rétrotranslocation de BCL-xL. Ces résultats suggèrent que BCL-xL et BAX rétrotransloquent au cytoplasme sous la forme d'un hétérodimère.

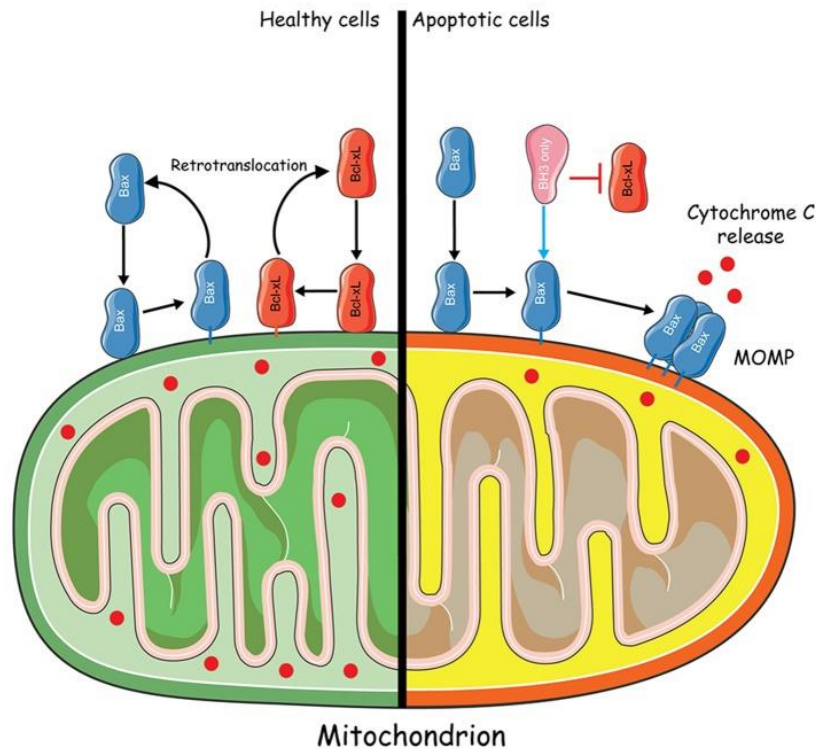


Figure 12 Translocation et rétrotranslocation de BCL-xL et BAX (Popgeorgiev, Jabbour, Germain, 2018)

Dans les cellules saines, BAX est constamment transloqué du cytosol vers la mitochondrie. La rétrotranslocation de BAX de la mitochondrie au cytosol pourrait être induite par la formation d'un hétérocomplexe avec la protéine anti-apoptotique BCL-xL. Dans des conditions apoptotiques, BCL-xL est inhibée par les répresseurs « BH3-only ». BAX est donc transloqué vers la mitochondrie où il est activé par les « BH3-only » activateurs et forme des pores ce qui conduit à la MOMP et à la libération de Cytochrome C.

Les autres acteurs de la MOMP sont les « BH3-only ». Or, en employant la technique de BRET (*Bioluminescence resonance energy transfert*) pour évaluer les complexes « BH3-only »/BCL-xL en cellule entière, nous avons établi que la localisation membranaire de BCL-xL influence sa fonction anti-apoptotique en renforçant sélectivement son interaction avec PUMA et BIM mais pas tBID (Pécot et al. 2016).

En plus de réguler la MOMP, BCL-xL interagit au niveau de la MOM avec des acteurs essentiels du complexe de perméabilité transitoire (PTPC). Ce complexe forme des pores qui traversent l'OMM et la membrane interne mitochondriale (IMM) et comprend, entre autres, les VDACS (*Voltage-dependant anion channels*), les protéines de la famille ANT (*Adenine nucleotide translocase*) et la CYPD (*Cyclophilin D*). BCL-xL interagit directement avec VDAC1 et ANT, influençant ainsi l'ouverture du PTPC et le passage de métabolites à travers la MOM (Vander Heiden et al. 1999; S. Shimizu, Shinohara, et Tsujimoto 2000; Vander Heiden et al. 2001).

b. Localisation à la membrane interne mitochondriale

Une localisation de BCL-xL, encore assez peu documentée, est l'IMM. En effet, certains partenaires de BCL-xL sont des résidents de cette membrane, où ils exercent des fonctions majeurs dans le métabolisme et le contrôle qualité

mitochondrial. Parmi eux l'on retrouve la sous-unité β de l'ATP synthase participant activement à la production d'ATP via la chaîne respiratoire (Y.-B. Chen et al. 2011). A travers cette interaction, BCL-xL réduit les fuites d'ions traversant l'IMM participant ainsi à maintenir le potentiel transmembranaire mitochondrial et la production optimale d'ATP. Ces observations ont été faites sur des neurones cultivées, et BCL-xL a été détecté au niveau de l'IMM par microscopie électronique. De plus, le complexe cycline B1/CDK1 a été identifié comme un inhibiteur de cette interaction via la phosphorylation de BCL-xL. Cette modification induit la dépolarisation de l'IMM, des dommages oxydatifs et l'apoptose des neurones (Veas-Pérez de Tudela et al. 2015). La fraction de BCL-xL au niveau de l'IMM ainsi que son rôle dans d'autres modèles cellulaires doit encore être élucidée.

c. Localisation au réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est le principal organe impliqué dans l'homéostasie et la signalisation du Ca^{2+} intracellulaire. Les signaux calciques participent à de nombreux processus physiologiques tels que la prolifération cellulaire (Munaron, Antoniotti, et Lovisolo 2004), la fécondation (Sardet, Dumollard, et McDougall 2006), la différenciation (Lombardi et al. 2019), le développement embryonnaire (Bonneau et al. 2014) et l'apoptose (Bonfond et al. 2015). Le Ca^{2+} est séquestré dans le RE à une concentration plus élevée que dans le cytoplasme environnant. Les signaux calciques sont générés lorsque le Ca^{2+} est libéré du RE par les canaux calciques à ligands appelés récepteurs de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) (Patel, Joseph, et Thomas 1999). L'élévation du Ca^{2+} cytoplasmique qui suit cette libération est hautement régulée et peut être transitoire, soutenue ou suivre des schémas plus complexes (Bootman et Bultynck 2020). Les informations du signal sont codées par la fréquence et l'amplitude des pointes répétitives et transmises à un large éventail d'effecteurs en aval.

L'apoptose induite par les signaux Ca^{2+} est générée par un large éventail de stimuli initiateurs, notamment le retrait des facteurs de croissance, la thapsigargin (un inhibiteur de la Ca^{2+} -ATPase), le peroxyde d'hydrogène, la staurosporine, le céramide, le facteur de nécrose tumorale et le stress génotoxique (Mathai, Germain, et Shore 2005). En tant qu'acteurs majeurs de ce processus, les récepteurs IP3 peuvent renforcer ou déclencher des signaux apoptotiques, formant ainsi une boucle de rétroaction positive. Par exemple, le Cytochrome C, libéré aux premiers stades de l'apoptose intrinsèque, se lie aux récepteurs de IP3 pour potentialiser la libération de Ca^{2+} (Boehning et al. 2003).

En plus de réguler la libération de Cytochrome C, les protéines de la famille BCL-2 participent également directement à la libération de Ca^{2+} du RE médiée par IP3. En effet, BCL-xL interagit directement avec les récepteurs de IP3 via son domaine BH4, au niveau du RE, limitant ainsi le flux calcique du RE à la mitochondrie (Williams et al. 2016). Dans les cellules B de poulet, BCL-xL favorise les oscillations du Ca^{2+} par une interaction directe avec le récepteur de IP3. Ceci entraîne le maintien de la bioénergétique mitochondriale et contribue à la survie cellulaire (White et al. 2005). Cette interaction induit également une augmentation de la réactivité des récepteurs de IP3 à de faibles concentrations de leur ligand IP3. Notre compréhension de la régulation des signaux Ca^{2+} par BCL-xL évolue dans le but d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

d. Localisation aux endosomes

Plusieurs études ont rapporté des interactions entre BCL-xL et des acteurs majeurs du trafic vésiculaire intracellulaire tels que les clathrines (H. Li et al. 2013). Récemment, une équipe a montré que BCL-xL est retrouvé colocalisé aux

endosomes avec VSP35 et VSP26, des protéines de la famille des « *Vacuolar protein sorting* » qui participent à l'échafaudage et à la courbure des endosomes (T. Farmer et al. 2019). Ces interactions participent à la localisation correcte de BCL-xL à la MOM. En effet, lors du « Knock out » de VSP35, la quantité de BCL-xL localisée au niveau de la MOM diminue, influençant ainsi l'activation de BAX et la réponse apoptotique.

Des contacts entre la MOM et les endosomes ont été décrits, notamment au cours d'un stress oxydatif. Un rapprochement des endosomes avec l'OMM a également été récemment observé aux étapes précoces du déclenchement de l'apoptose, participant à la régulation du recrutement et de l'oligomérisation de BAX (T. S. Wang et al. 2020).

II. Fonctions émergentes de BCL-xL

Nous l'avons vu, le rôle cytoprotecteur de BCL-xL n'est pas réduit à la régulation de la MOMP (L. Galluzzi et al. 2008; Lorenzo Galluzzi et al. 2012). L'étude des modifications post-traductionnelles (MPT) que subit BCL-xL amène à la découverte de nouvelles fonctions.

a. Modifications post-traductionnelles de BCL-xL

L'une des MPT des plus courantes est la phosphorylation. BCL-xL peut être phosphorylé au niveau de plusieurs résidus sérine. Par exemple, les résidus S49 et S62 de BCL-xL sont ciblés par la PLK3 (Polo-like kinase 3) et PLK1/MAPK9 respectivement au cours du cycle cellulaire (J. Wang, Beauchemin, et Bertrand 2011; 2012). BCL-xL joue un rôle double dans ce processus comme acteur physiologique de la progression du cycle d'une part et d'autre part comme senseur au cours de l'arrêt mitotique causé par des dommages à l'ADN. La phosphorylation en S62 a plusieurs conséquences comme par exemple de déstabiliser l'interaction BCL-xL/BAX (Upreti et al. 2008; Bah et al. 2014).

En réponse à des dommages à l'ADN, BCL-xL peut également subir une double déamidation des résidus asparagine (N) 52 et 66 en 15 à 30% de résidus aspartate (D) et 70 à 85% de résidus iso-aspartates (iso-D) (Deverman et al. 2002; R. Zhao et al. 2007; 2008). La mono-déamidation en position N52 en D52 est observée sur une fraction importante de BCL-xL dans les cellules normales et maintient ainsi sa fonction anti-apoptotique d'une part et stimule l'autophagie d'autre part (Beaumat et al. 2016). Au cours d'un stress prolongé ou aiguë, BCL-xL est retrouvé doublement déamidé, se présentant ainsi majoritairement sous la forme iso-D52/iso-D66. Cette forme perd sa capacité à interagir avec ces homologues ce qui impacte fortement sa fonction anti-apoptotique et permet aux cellules de réagir à un stress par l'induction de l'apoptose. Les cellules cancéreuses présentent, quant à elles, une diminution de la part de BCL-xL N52- et N66-déamidé favorisant la survie des cellules cancéreuses (Takehara et Takahashi 2003).

b. BCL-xL dans la régulation de l'autophagie

L'autophagie est un mécanisme de dégradation lysosome-dépendant dont les cellules eucaryotes disposent pour éliminer les composés superflus ou potentiellement cytotoxiques. (L. Galluzzi et al. 2012). Ce processus repose sur la formation de vésicules doubles membranaires appelées les autophagosomes pouvant fusionner avec les lysosomes pour initier la dégradation de macromolécules

biologiques ou de corps étrangers. Ce processus est régulé par une machinerie moléculaire complexe en réseau avec de nombreuses autres fonctions cellulaires. (Dikic et Elazar 2018)., telles que la sécrétion, la défaillance mitochondriale (M. Priault et al. 2005) ou la mort cellulaire (Lorenzo Galluzzi et al. 2018). Plusieurs protéines de la famille BCL-2 interagissent avec les acteurs de l'autophagie pour permettre aux cellules de répondre et surmonter à un stress (M. Priault et al. 2010). L'un des régulateurs majeurs de l'autophagie est la protéine Becline1 identifiée comme une protéine antivirale en 1998 et qui interagit avec BCL-2 et BCL-xL (M Chiara Maiuri et al. 2007). La Becline 1 possède un domaine BH3 qui a la capacité physique et fonctionnelle d'interagir avec la poche hydrophobe de BCL-xL. Cette interaction a pour conséquence d'inhiber l'autophagie et est déstabilisée par la phosphorylation en S62 de BCL-xL par JKN1 (aussi connue sous le nom de MAPK8) (S.-Y. Kim et al. 2014). La surexpression d'un BH3-only ou l'exposition à l'ABT-737 peuvent restaurer cette activité en déplaçant l'interaction BCL-xL/Becline 2 (Maria Chiara Maiuri, Criollo, et Kroemer 2010). La compréhension de ces mécanismes nécessite encore d'être approfondie. En effet, certaines études sur cellules modifiées Bax/Bak KO démontrent l'implication directe de Bax et Bak dans ces mécanismes. (Lindqvist et al. 2014).

a. BCL-xL, soutien de l'invasion et l'angiogenèse

Plusieurs études ont révélé la contribution de BCL-xL dans la reprogrammation de cellules cancéreuses via l'activation de voies non-canoniques et dont la mécanistique n'est pas encore clairement explicitée. Une équipe de recherche italienne s'est récemment intéressée à la contribution de la surexpression de BCL-xL dans l'émergence de cellules cancéreuses présentant des propriétés souches (Triscioglio et al. 2017). Pour cela, les chercheurs ont générés des lignées cellulaires de mélanome et de glioblastome surexprimant ou non BCL-xL et ont évalué leur capacité à migrer (en utilisant une méthode appelée le « *Transwell migration assay* ») ainsi que leur capacité d'invasion. Ces deux caractéristiques se sont révélées sur-représentées au sein des populations cellulaires surexprimant BCL-xL et une altération unique de l'expression de BCL-xL par un siARN permet de limiter ces caractéristiques délétères. L'utilisation d'un inhibiteur des CASPASEs, le zVAD, n'ayant pas d'effet sur ce phénotype, la participation de la voie canonique de BCL-xL a été exclue. En plus de participer à l'invasion et à la migration des cellules tumorales, cette équipe a évalué l'impact de BCL-xL sur leur capacité à former de nouvelles tumeurs à partir d'une cellule unique, signature phénotypique des CICs. Les résultats montrent une corrélation entre la surexpression de BCL-xL et le phénotype CIC. Ces cellules présentent un transcriptome différent, notamment une augmentation de la transcription des protéines NANOG, OCT4 et SOX2 connues pour participer activement à la reprogrammation des cellules vers un phénotype CIC. L'analyse histologiques de xénogreffes de ces tumeurs ont également fourni des pistes sur la participation de BCL-xL dans l'angiogenèse. En effet, les tumeurs surexprimant BCL-xL présentent des marqueurs de vascularisation plus important que les tumeurs contrôle.

b. BCL-xL, soutien de l'émergence de cellules souches cancéreuses

Nos récents travaux ont mis en évidence une fonction non-canonique de BCL-xL participant à la promotion de voies oncogéniques indépendantes de la MOMP, et conférant un avantage aux cellules cancéreuses pour survivre et initier l'émergence d'une tumeur plus agressive (Carné Trécesson et al., 2017). En effet, nous avons montré que BCL-xL peut moduler finement l'activité de l'oncogène KRAS, promouvant l'émergence de cellules initiatrices de cancer (CIC). Dans le cancer du sein, les cellules dites "*basal-like*" surexpriment l'EGFR ce qui contribue à l'activation de la voie de signalisation RAS. Nous avons mis en évidence que, indépendamment de la stimulation à l'EGF, BCL-xL contribue activement à l'émergence d'une population de CICs en induisant la voie MAPK favorisant ainsi la prolifération, la motilité, et l'invasion cellulaire. En effet, différents modèles de lignées mammaires KRAS activées ont été évalués sur la capacité d'une cellule à initier la formation d'une mammosphère, signature phénotypique des CICs, en présence et en absence de BCL-xL. Dans des cellules non tumorales activées MCF10A-KRASG12V, le « *knock-down* » de BCL-xL s'est avéré aussi efficace pour faire chuter le nombre de mammosphères formées, qu'un « *knock-out* » IL6, une cytokine ayant un rôle central dans le maintien du phénotype CIC. Des analyses de protéomique quantitative ITraq ont permis d'identifier 118 protéines induites par KRAS et dépendantes de la présence de BCL-xL. Parmi celles-ci, nous avons mis en évidence l'induction de l'expression de FOSL1 et HMGA2 des régulateurs de l'auto-renouvellement ainsi que CD44, une protéine d'adhésion utilisée comme marqueur de CIC. Nous avons également identifié entre KRAS et BCL-xL une interaction physique par les méthodes de BRET et d'immuno-précipitation (IP), impliquant les domaines BCL-xL Binding Domain (XBD) et le domaine BH4 de KRAS et de BCL-xL respectivement. Enfin, nous avons montré une diminution de la stabilité de KRAS dans les cellules déplétées en BCL-xL, sans effet sur le niveau d'expression des ARNm de KRAS, supposant un mécanisme de stabilisation post-traductionnel induit par la présence BCL-xL.

III. Conclusion

Les fonctions non-canoniques de BCL-xL, ainsi que celles d'autres membres de la famille BCL-2, ouvrent d'autres perspectives quant à sa contribution à la progression tumorale. En effet, la surexpression des protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2 est détectée dans les cellules cancéreuses qui ont des propriétés initiatrices de tumeurs (Ramesh et al. 2021). Bien que la fonction canonique de cette famille de protéines est bien appréhendée, les connaissances acquises dans le cadre de la recherche sur les BH3 mimétiques suggèrent que ces approches thérapeutiques peuvent être que fractionnelles et laisser intactes les CICs résiduelles. De plus, nous avons montrés qu'une des fonctions non-canoniques de BCL-xL, par son soutien à l'activité de KRAS, participe à ce programme de transition (Carné Trécesson et al. 2017). La principale question soulevée est de savoir si la résistance des CICs contre les stimuli de mort résulte de leur nature intrinsèque et/ou de ce programme d'adaptation qui favorise leur émergence.

Ces questionnements sont clés car les échecs des thérapies anti-cancéreuses, notamment celles basées sur le ciblage de la voie RAS (dite « *the undruggable* »), sont nombreux.

E. Leçons des échecs thérapeutiques contre le cancer

I. Echec des traitement ciblant KRAS

Dans le domaine de la recherche des traitements contre le cancer, KRAS est une cible de choix. Jusqu'à présent, le traitement de l'activité de RAS s'est concentré sur la régulation de sa liaison au GTP et sur les modifications post-traductionnelles contrôlant son association à la membrane. L'inhibition de la croissance tumorale par l'inhibition directe du RAS oncogène est restée sans succès (Uprety et Adjei 2020). Une meilleure compréhension des mécanismes qui soutiennent l'activité RAS ainsi que les raisons des échecs thérapeutiques est donc nécessaire pour l'élaboration de thérapies innovantes.

a. Ciblage de l'activité GTPase

L'accumulation de KRAS-GTP reste une des causes principales du développement et du maintien des cellules cancéreuses. De nombreuses équipes de recherche ont donc voulu cibler le domaine G de KRAS (Taveras et al. 1997). Une première approche a été d'utiliser de petites molécules antagonistes au GTP, cette approche ayant montré de bon résultats pour empêcher la liaison d'ATP sur les protéines kinases (J. M. Ostrem et al. 2013). Cependant, la liaison KRAS-GTP est beaucoup plus affine (de l'ordre du picomolaire) que celle des Kinases-ATP, et le développement de telles molécules s'est révélé inefficace ou toxique (Xie et al. 2017). Seuls des inhibiteurs, développé par l'équipe de Kevan M Shokat, ont obtenu de bons résultats cliniques, mais ceux-ci ciblent sélectivement le mutant KRAS12C (J. M. Ostrem et al. 2013; Goebel et al. 2020). Ces molécules sont également un atout considérable pour la recherche fondamentale, permettant des avancées dans la compréhension, entre autres, des mécanismes de compensation. Malgré les efforts, le ciblage du domaine G des mutants KRAS12V et KRAS12D reste sans succès.

Le ciblage du domaine RBD de KRAS est également une cible de choix dans le but d'inhiber la liaison de KRAS avec les protéines effectrices (Welsch et al. 2017). Plusieurs molécules ont été développées dans ce but, mais ces inhibiteurs sont mal tolérés car ils présentent des effets dits « *off-target* » (Cruz-Migoni et al. 2019; McCarthy et al. 2019; Kessler et al. 2019). De plus, ces molécules gagneraient à être optimisées pour se lier sélectivement à KRAS muté.

Une autre stratégie repose sur le développement de molécules capables de d'inhiber ou de mimer l'activité des protéines GEFs et GAPs. Des études cliniques sont en cours pour le développement de molécules ciblant SHP2 et SOS1 (Gu et al. 2018; LaMarche et al. 2020; Z. Song et al. 2021). A ce jour, ces molécules sont en cours d'optimisation car les mécanismes biochimiques de l'activité de ces protéines ne sont pas totalement élucidés.

b. Ciblage de l'adressage membranaire de KRAS

L'ancrage à la membrane plasmique, régie par des modifications post-traductionnelles, est indispensable pour l'activité de KRAS. Cette vulnérabilité a donc donné lieu à des tentatives de blocage du processus de farnésylation de KRAS. Pour cela, la stratégie thérapeutique a été le développement de molécules inhibitrices des enzymes responsables de l'ajout de chaînes lipidiques sur KRAS et notamment, les farnésyl-trasférases (End et al. 2001). De nombreuses molécules ont fait l'objet d'études dont le tipifarnib et le lonafarnib dont les essais cliniques sont

allés jusqu'à la phase III. Ces inhibiteurs diminuent efficacement la croissance tumorale médiée par HRAS mais ne sont pas efficaces sur les cancers dépendants de KRAS (ni de NRAS) (Gilardi et al. 2020). Ces résultats décevants sont imputés à la capacité de KRAS (et NRAS) de subir des prénylations au niveau de leur domaine HVR qui restaure l'adressage de KRAS à la membrane plasmique. Une autre molécule permettant d'inhiber et la farnésylation, et la prénylation a été évaluée par des essais cliniques, sans succès sur le blocage de la prénylation de KRAS (Lobell et al. 2002). D'autres approches ont consisté à développer des molécules inhibant la palmitoylation de KRAS ou encore inhibant la liaison des groupements prényl aux membranes. Une autre stratégie a été de développer des molécules qui bloquent les enzymes RCE1 et ICMT responsables respectivement du clivage et de la carboxyméthylation de KRAS (Winter-Vann et Casey 2005).

Ces stratégies se sont confrontées à deux enjeux majeurs. Le premier est que les enzymes ciblées ont d'autres fonctions dans les cellules et ciblent d'autres GTPases. La deuxième est que ce mécanisme n'est pas corrélé au statut mutationnel de KRAS, et ne cible donc pas uniquement les cellules présentant un KRAS muté.

c. Ciblage de l'ARNm de KRAS

L'utilisation de chaînes d'ARN anti-sens permet de bloquer l'expression d'un gène en se fixant par complémentarité de bases à l'ARNm de la protéine ciblée. Une fois l'ARN anti-sens fixé sur son ARNm cible, le complexe formé est reconnu par des RNAases cellulaires qui les dégradent, empêchant ainsi l'expression de la protéine ciblée. Cette méthode permet de cibler de manière spécifique un gène ou un variant d'épissage. Cette approche a été développée pour cibler les différents isoformes de RAS. L'inhibition spécifique de HRAS s'est révélée fructueuse pour limiter la croissance tumorale *in-vivo* (Yang et al. 2003). Plusieurs essais ont été menés pour cibler l'ARNm de KRAS, toujours sans succès. Aucune de ces tentatives n'a pu aboutir par un essai clinique car la distribution des ARN anti-sens n'est pas restreinte aux cellules cancéreuses et pourraient avoir des conséquences sur les cellules saines.

d. Ciblage des protéines en aval de KRAS

Lorsque KRAS présente des mutations activatrices, les protéines effectrices, en aval de la voie de signalisation sont activées en permanence. Ce constat rend donc les voies MAPK et PI3K/AKT des cibles de choix pour limiter les effets délétères de la mutation de KRAS. De ce fait, de nombreuses molécules inhibitrices ont été développées. Le Sorafenib, par exemple, a été développé dans le but de prévenir l'activité ATPase de RAF1, et il s'est avéré être efficace comme inhibiteur des RTK (Ramakrishnan et al. 2010). Plusieurs inhibiteurs de B-RAF (un des isoforme de RAF1), tels que le vemurafenib, sont désormais indiqués en monothérapie pour le traitement du mélanome présentant la mutation B-RAFV600E (Karoulia, Gavathiotis, et Poulidakos 2017). De plus, des inhibiteurs de MEK s'avèrent efficaces pour limiter la progression tumorale en combinaison avec les inhibiteurs de B-RAF. Cependant, ces différents traitements comportent des effets secondaires importants (Masson s. d.). Enfin des inhibiteurs de ERK font l'objet d'essais cliniques (Buchbinder et al. 2020) Ces différentes molécules sont particulièrement efficaces chez des patients présentant des mutations sur RAF mais pas autant chez les patients présentant des mutations sur KRAS.

PI3K, AKT et mTOR constituent également des cibles pour le développement de composés anti-cancéreux tout d'abord car ces protéines ont été décrites comme

nécessaires à l'activité pro-tumorale de KRAS (Castellano et Downward 2010). D'autre part, car ces protéines sont également fréquemment dérégulées dans les cancers. Temsirolimus et everolimus, deux inhibiteurs de mTOR, sont déjà autorisés pour le traitement de lymphomes du manteau présentant l'expression de KRAS muté ainsi que dans les cas de cancers rénaux avancés (Fasolo et Sessa 2012). Ces molécules, ne ciblant que l'une des voies de signalisation RAS, ne sont pas adaptés au traitement de tous les cancers supportés par l'expression de KRAS muté car des phénomènes de compensation entre les différentes voies de signalisation persistent.

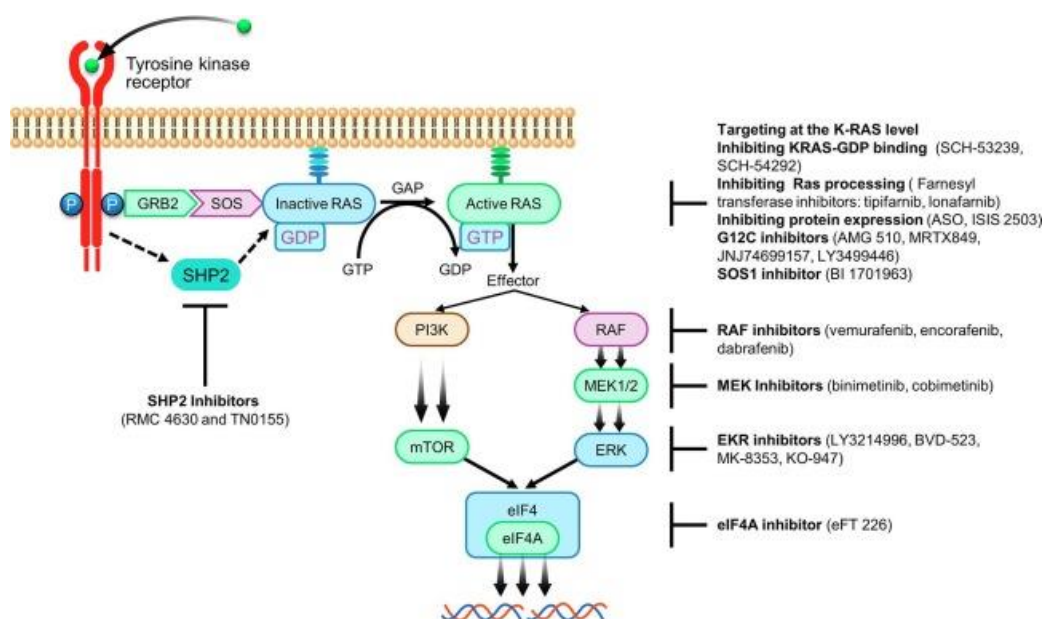


Figure 13 Différentes stratégies pour cibler la voie de signalisation RAS à plusieurs niveaux (Uprety and Adjei, 2020)

Représentation simplifiée de la voie de signalisation RAS et des différentes stratégies thérapeutiques ciblant cette voie à différents niveaux dans l'espoir d'inhiber les conséquences délétères de la suractivation de ces voies dans le cancer.

e. Ciblage de la dégradation de KRAS

Les protéines RAS peuvent être sujettes à des dégradations ubiquitine-dépendantes (Abe et al. 2020, 1) Les acteurs et les mécanismes participant à la dégradation de KRAS et de ces mutants activateurs restent encore à éclaircir. Cependant, le développement des molécules se liant spécifiquement à KRAS12C permet d'explorer une nouvelle stratégie thérapeutique se basant sur la dégradation médiée par les PROTACs (*Proteolysis-targeting chimeras*). Les PROTACS sont des petites molécules de nouvelle génération, conçues pour induire la dégradation sélective de protéines cibles (Cermakova et Hodges 2018). Ces molécules sont dites hétéro-bifonctionnelles car elles se composent de deux éléments :

-le premier élément est une molécule se liant spécifiquement à la protéine ciblée pour sa dégradation.

-le deuxième, rattaché au premier par élément de liaison (dit « *linker* »), recrute une E3-ligase permettant l'ubiquitylation dégradative de la cible.

La molécule LC-2, issue de la technologie PROTAC, est composée d'un inhibiteur de KRAS12C (MRTX849) et d'une molécule permettant le recrutement de l'E3-ligase VHL. LC-2 induit, à faible concentration, la dégradation ciblée de KRAS12C et l'inhibition sous-jacente de la voie MAPK (Bond et al. 2020). L'efficacité de cette drogue est dépendante du statut hétérozygote ou homozygote des cellules traitées mais parvient à dégrader spécifiquement le mutant KRAS12C sans affecter la dégradation de KRAS sauvage. Dans le même temps, l'adressage par la stratégie PROTAC de l'E3-ligase CRBN (*Cereblon*) s'est révélé inefficace pour dégrader KRAS12C dans des lignées cellulaires de cancers pancréatiques et pulmonaires (Zeng et al. 2020). La stratégie de dégradation des GEFs (M. Wang et al. 2020) ou des protéines effectrices (Vollmer et al. 2020; Alabi et al. 2021) médiée par les PROTACs sont actuellement en cours d'études.

Ces résultats démontrent que des efforts sont encore nécessaires dans la compréhension des mécanismes de dégradation de KRAS.

II. Leçons du ciblage de la MOMP

La résolution de la structure 3D de la poche de liaison aux domaines BH3 de BCL-2, BCL-xL et MCL-1 a permis le développement de petites molécules BH3 mimétiques (BH3mim) susceptibles de favoriser la mort cellulaire des cellules cancéreuses présentant un état « *mito-primed* ».

a. Les BH3 mimétiques

Les interactions dépendantes des BH3 régulant de manière critique la MOMP, le réseau d'interaction des protéines de la famille BCL-2 est souvent déséquilibré en faveur des anti-apoptotiques dans les cellules cancéreuses. Les BH3mim antagonisant sélectivement ces protéines constituent une stratégie prometteuse pour surmonter la résistance thérapeutique et induire la mort des cellules cancéreuses. De tels composés comprennent, de manière non exhaustive, l'ABT-737 (antagoniste de BCL-2, BCL-xL et BCL-w), l'ABT-199 (alias Venetoclax, un inhibiteur sélectif de BCL-2 approuvé par la FDA pour le traitement de la leucémie lymphoïde chronique en avril 2016) et le S63845 (inhibiteur sélectif de MCL-1) (Townsend et al. 2021). Les BH3-mim vont de loger dans la poche hydrophobe des anti-apoptotiques entrant ainsi en compétition avec les protéines pro-apoptotiques « BH3-only » (Ni Chonghaile et Letai 2008). Le potentiel pro-apoptotique de ces molécules a été démontré dans de nombreuses lignées cellulaires et sur des cultures de cellules primaires (Ni Chonghaile et Letai 2008, 3; Lieber et al. 2011; Baev et al. 2014). Ces molécules peuvent agir en agents simples ou en combinaison d'autres thérapies.

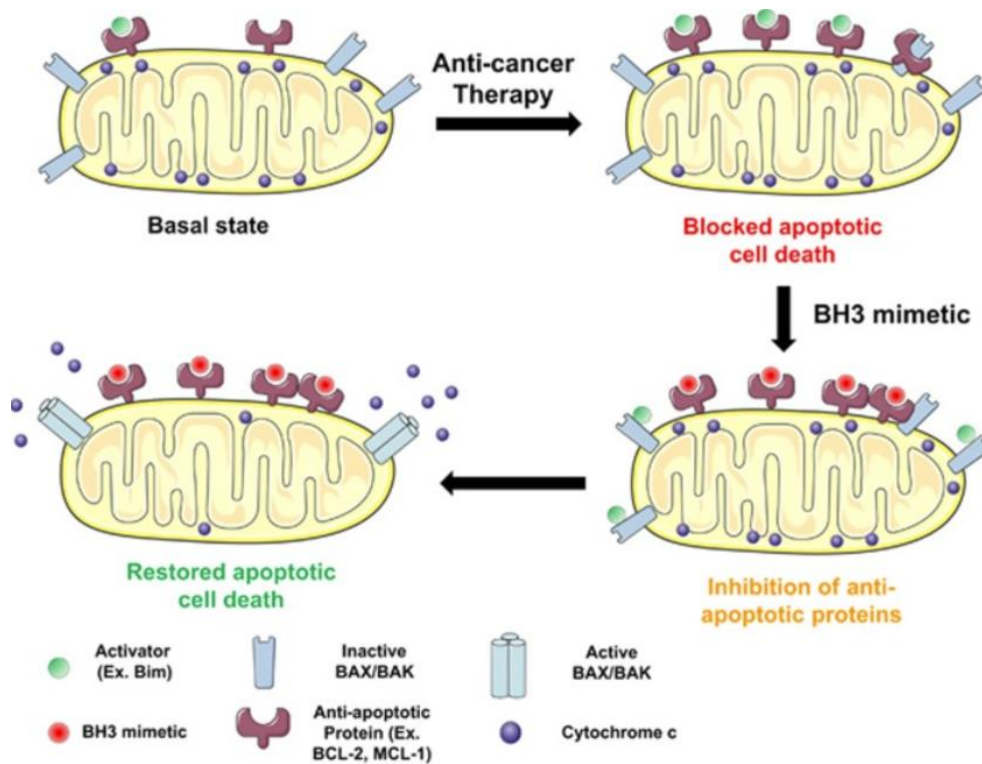


Figure 14 Mécanisme d'action des BH3 mimétiques (Montero, Letai 2017)

Lorsque les cellules cancéreuses sont exposées à un traitement, elles peuvent adapter leur stratégie anti-apoptotique pour bloquer l'accumulation des protéines pro-apoptotiques (activatrices et effectrices) induite par le traitement. En bloquant la défense anti-apoptotique à l'aide d'un mimétique BH3 spécifique, les activateurs sont déplacés des protéines anti-apoptotiques ce qui restaure la mort cellulaire apoptotique.

Des fenêtres thérapeutiques adaptées semblent exister pour ces composés, mais elles sont limitées par leurs effets « *on-target* » sur les cellules normales et par le fait que l'inhibition des interactions engagées par des molécules hautement exprimées et intégrées dans les membranes subcellulaires est difficile à réaliser (Pécot et al. 2016; Vuillier et al. 2018). De plus, l'accumulation de preuves de fonctions supplémentaires des protéines de la famille BCL-2 indique que ces protéines peuvent contribuer à l'agressivité tumorale d'une manière qui résiste aux mimétiques BH3 car elle repose sur des interactions moléculaires non conventionnelles (Braun et al. 2013)

b. Ciblage de BCL-xL par L'ABT-737

L'expression élevée de BCL-xL dans les lignées de cellules cancéreuses a été associée à la chimiorésistance (Amundson et al. 2000). Les expériences *in vivo* ont confirmé le potentiel de l'ABT-737 pour inhiber la croissance tumorale et induire l'apoptose, dans différents types de cancers, seul ou en combinaison avec des chimiothérapies (Mason et al. 2008; Hikita et al. 2010; Baev et al. 2014). Cependant, cette molécule est peu soluble et n'est pas compatible avec une prise orale ce qui limite son utilisation chez l'homme. Pour pallier à cela, un dérivé de cette molécule, l'ABT-263 aussi appelé Navitoclax, a été développé (Park et al. 2008). Cette dernière possède les caractéristiques clefs qui lui ont permis d'être évalué en clinique contre les leucémies myeloides chroniques (Kipps et al. 2011; 2015). Les

résultats de la phase I et II de l'essai clinique a établi que l'ABT-263, en combinaison avec le rituximab, montre une réponse clinique positive. Malgré cela, la phase III de l'essai clinique a conclu à la toxicité de cette molécule en raison d'une atteinte sévère à la quantité de plaquettes ainsi que des dérèglements de la coagulation. En effet, la perte de BCL-xL, induit l'apoptose des plaquettes et des phénomènes de thrombocytopénie de manière dose-dépendante (Mason et al. 2007). Il est à noter que BCL-xL n'est pas la seule cible de l'ABT-737 et de l'ABT-263, ces molécules antagonisent également BCL-2 et BCL-w. Les résultats de ces essais cliniques soulignent la nécessité d'améliorer le ciblage des protéines de la famille BCL-2 et de mieux comprendre les processus de dépendance à BCL-xL développés par certaines cellules cancéreuses.

c. Ancrage membranaire de BCL-xL et résistance aux BH3mim

Les connaissances acquises sur la structure des protéines de la famille BCL-2, dans leurs mécanismes d'actions ainsi que dans leurs modes de régulation, permettent de développer des molécules efficaces pour induire la mort des cellules cancéreuses. L'identification des molécules BH3mim a été réalisée à partir d'une partie soluble de BCL-xL qui ne possède pas deux domaines, le domaine C-terminal et un domaine intrinsèquement non-structuré. Or les complexes protéiques intracellulaires ciblés sont en partie membranaires et impliquent leur domaine TM.

Nous l'avons vu, BCL-xL est transloqué et rétro transloqué du cytoplasme à la MOM. Cet évènement demeure mal étudié. Il joue toutefois un rôle majeur dans la force des interactions qu'il engage. En étudiant des variants de mobilité de BCL-xL nous avons établi un lien entre sensibilité aux BH3mim et mobilité intracellulaire de BCL-xL. Nos dernières données indiquent que l'ancrage membranaire de BCL-xL via son extrémité C-terminale renforce son interaction avec les protéines pro-apoptotiques qui, comme PUMA, sont elles-mêmes intrinsèquement ancrées aux membranes subcellulaires par leur propre extrémité C-terminale. L'interaction engageant les anti- et pro-apoptotiques de la famille BCL-2 est très réfractaire aux inhibitions lorsque chacun des deux partenaires est membranaire.

L'état de « mito-priming » se fonde donc sur des assemblages protéiques intracellulaires moins simples que prévus, tant au niveau des interfaces de liaison que de l'identité des protéines qui y participent ou la régulent. De plus, ce phénotype ne sera exploitable thérapeutiquement et n'est sensible aux BH3mim que dans des conditions où les partenaires présentent une localisation dynamique, allant et venant entre cytosol et membranes intracellulaires par des mécanismes actuellement inconnus. Nous venons de réaliser une avancée majeure dans ce domaine en identifiant le facteur E2F-1 comme influençant la dynamique subcellulaire de BCL-xL (Vuillier et al. 2018).

Des données récentes tendent à incriminer certains mécanismes de contrôle qualité mitochondrial dans la résistance à des signaux cytotoxiques. En effet, la mitochondrie, organite central dans la décision de vie ou de mort des cellules, fait intervenir des phénomènes complexes et encore peu connus jusqu'alors pour maintenir son intégrité.

III. Processus de survie influencés par le contrôle qualité mitochondrial

En plus de son rôle vital dans l'apoptose par voie intrinsèque, la mitochondrie est un compartiment cellulaire crucial dans le maintien de l'homéostasie métabolique. Elle participe à la production d'ATP mais également à une batterie de

voies de biosynthèse et de dégradation nécessaires à l'homéostasie cellulaire (Friedman et Nunnari 2014; Murphy et al. 2016). Pour se faire, la mitochondrie a besoin de protéines pouvant être codées par l'ADN nucléaire ainsi que par l'ADN mitochondrial (West et Shadel 2017; Russell et al. 2020). Ce compartiment joue également un rôle dans la réponse inflammatoire (West et Shadel 2017; Riley et Tait 2020). Les mitochondries dysfonctionnelles ou endommagées peuvent causer des dommages au niveau cellulaire, notamment par une production accrue de ROS ou par la libération d'ADN mitochondrial dans le cytoplasme (Lohard et al. 2020; M. Zhao et al. 2021). Au vu des conséquences délétères d'une accumulation de mitochondries endommagées, les cellules ont acquis au cours de l'évolution plusieurs mécanismes de contrôle qualité mitochondrial. Cependant, les cellules cancéreuses peuvent tirer avantage de ces mécanismes pour résister aux traitements induisant la MOMP.

a. Perméabilisation partielle de la membrane mitochondriale

La MOMP a longtemps été considérée comme une décision cellulaire synchronisée, rapide et complète, sans retour possible (Goldstein et al. 2000). Mais, une hétérogénéité intracellulaire dans l'engagement des mitochondries dans la MOMP a été reportée dans plusieurs études des cellules rendant possible une réversibilité de la MOMP (Martinou et al. 1999; Deshmukh et Johnson 1998; Ichim et Tait 2016). Deux scénarios de MOMP partielle sont aujourd'hui décrits. Le premier est la MOMP incomplète, c'est-à-dire qu'au sein d'une cellule la MOMP est engagée par la majorité des mitochondries mais pas toutes. Le deuxième est appelé la « *minority MOMP* » (MOMP minoritaire), c'est-à-dire qu'une minorité des mitochondries au sein d'une cellule ont enclenché une libération du Cytochrome C. Le destin de la cellule dépend alors de l'activité des CASPASES (Tait et al. 2010; Monian et Jiang 2012). Les protéines de la famille BCL-2 seraient donc inégalement réparties au niveau des MOMs, favorisant la survie de certaines mitochondries et en condamnant d'autres. Ces mécanismes seraient induits par des niveaux de stress différents et impactent la survie des cellules mais également et leur différenciation (Kalkavan et Green 2018).

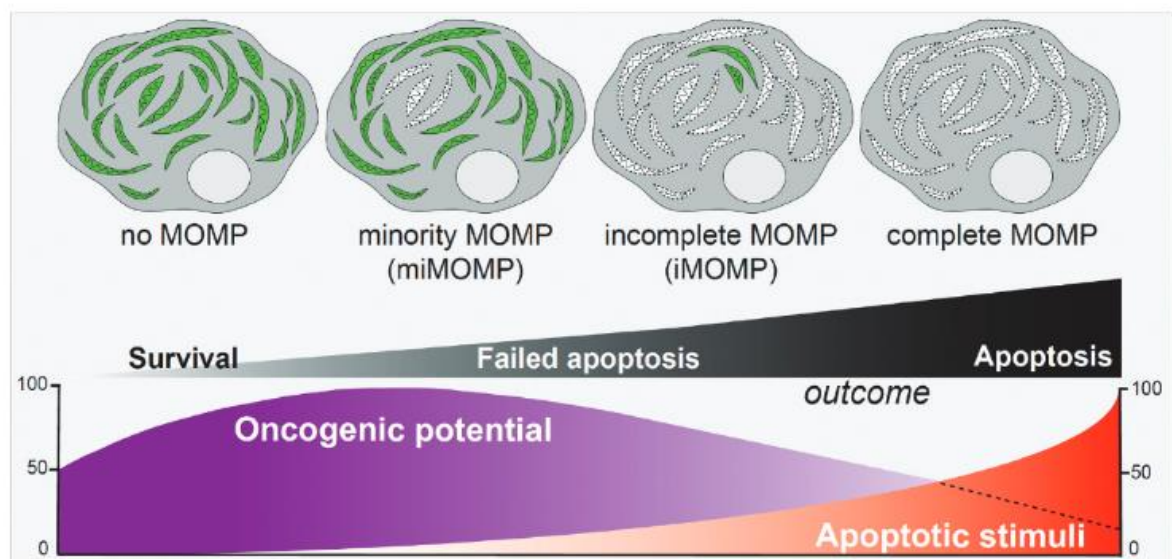


Figure 15 Repositionnement du point de non-retour de l'apoptose (Berthenet, Weber and Ichim, 2020)

Représentation des différents scénarios relatifs à la MOMP en fonction de l'intensité des stimuli apoptotiques. Ces différents scénarios sont corrélés au potentiel oncogénique qui en découle.

b. Dynamique mitochondriale

La morphologie mitochondriale est le résultat d'un équilibre entre la fission et la fusion du réseau mitochondrial. En effet, les mitochondries sont des organites dynamiques, qui se déplacent, changent de forme et de taille pour s'adapter aux différents besoins de la cellule (Tilokani et al. 2018). La protéine DRP1 (*Dynamamin-related protein-1*) peut induire la division d'une mitochondrie en deux, plus petites mitochondries arrondies. Les protéines MNFs (*Mitochondrial fusion proteins*) et OPA1 (*Optic atrophy 1*) peuvent, à l'inverse, fusionner des mitochondries aboutissant à leur allongement (MacVicar et Langer 2016). En réponse à différents signaux cellulaires, ces protéines peuvent subir des modifications régulatrices et ces phénomènes ont été reliés aux mécanismes de résistance aux thérapies dans les cellules cancéreuses (Tomková et al. 2019). Par exemple, la résistance au tamoxifen de lignées cellulaires de cancer du sein a été associée à l'état sur-fragmenté des mitochondries. Ces modifications morphologiques sont le résultat de la phosphorylation de DRP1 sur la sérine 637 et la dé-phosphorylation de la sérine 616. La morphologie et la structure des mitochondries sont étroitement liées (Chang et al. 2019; 2020). La régulation de la dynamique mitochondriale est l'un des leviers cellulaires participant à l'échec des thérapies.

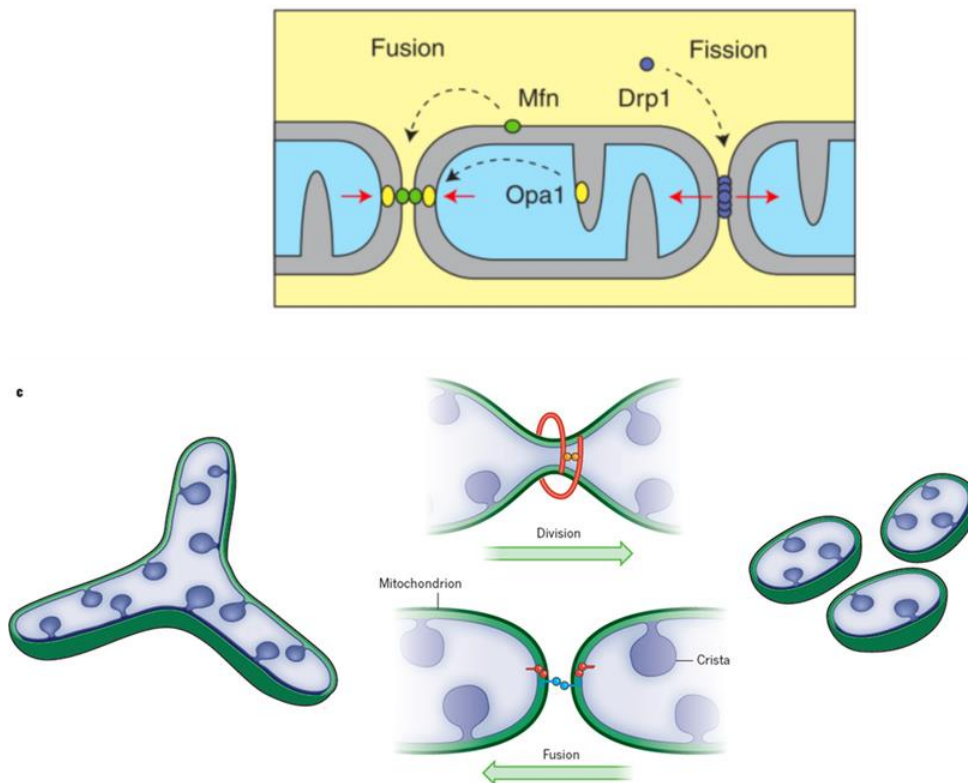


Figure 16 Principaux acteurs régissant la dynamique du réseau mitochondrial (inspiré de Van der Bliek et al. 2013)

Les mitofusines (MFN) et OPA1 contribuent respectivement à la fusion des membranes externes et internes. DRP1 régit la fission des membranes mitochondriales. Ces mécanismes participent à la morphologie du réseau mitochondrial qui peut être fusionné et allongé (à gauche) ou fissionné (à droite).

a. La Mitophagie

La mitophagie est un mécanisme conservé au cours de l'évolution permettant aux cellules de se débarrasser sélectivement des mitochondries endommagées ou superflues via la machinerie autophagique (Pickles, Vigié, et Youle 2018; Palikaras, Lionaki, et Tavernarakis 2018). Dans les cellules normales, une mitophagie dite « basale » permet de réguler la quantité et la qualité des mitochondries. Une balance finement régulée entre biosynthèse et dégradation des mitochondries maintient la demande énergétique de manière tissu-spécifique (Sun et al. 2015; McWilliams et al. 2018). Ce processus est impliqué dans différentes maladies humaines telles que les maladies neurodégénératives, cardiaques, liées à l'âge ou encore dans le cancer (M. Song et al. 2015; Shi, Guberman, et Kirshenbaum 2018; Vara-Perez, Felipe-Abrio, et Agostinis 2019; Kingwell 2019).

La mitophagie induite par un stress cellulaire est un mécanisme en quatre étapes (Zuo et al. 2020):

- L'initiation : plusieurs signaux peuvent induire l'initiation de la dégradation mitochondriale tel que l'augmentation de ROS. Cette étape recrute plusieurs acteurs au niveau de la mitochondrie tel que DRP1. DRP1 permet de séparer la mitochondrie dysfonctionnelle au reste du réseau sain, soutenant ainsi la sélectivité de ce mécanisme dégradatif.

- La reconnaissance par la machinerie autophagique : cette étape nécessite l'exposition de protéines, parfois modifiées par ubiquitinylation ou ajout de lipides, jouant le rôle de signaux « *eat me* » attirant la machinerie autophagique au niveau de la mitochondrie endommagée.

- L'emballage dans une vésicule appelée « l'autophagosome » : la mitochondrie endommagée est maintenue par des interactions protéines-protéines avec la membrane de l'autophagosome. Celui-ci va entourer la mitochondrie et la séquestrer.

- La dégradation par les enzymes hydrolytiques lysosomales : l'autophagosome ainsi formé va fusionner avec un lysosome. Les enzymes concentrées dans les lysosomes vont pouvoir dégrader les différents composants mitochondriaux.

Plusieurs voies de régulation de la mitophagie sont décrites et sont classées en deux catégories, la mitophagie PINK1/Parkin-dépendante et la mitophagie médiée par des récepteurs (ou mitophagie Parkin-indépendante).

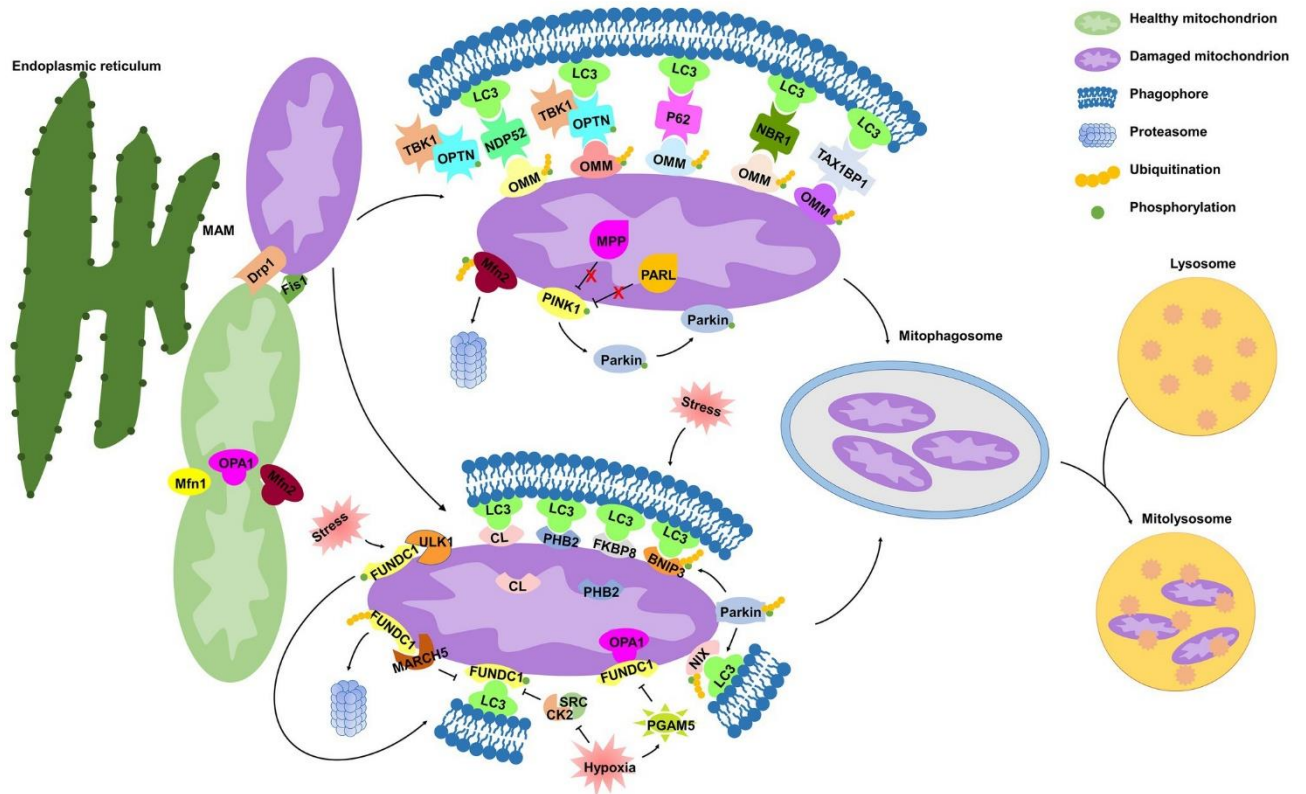


Figure 17 Mécanismes moléculaires des voies de dégradations des mitochondries par mitophagie Parkin-dépendante et Parkin-indépendante (Zuo et al. 2020)

En cas de stress cellulaire, la protéine DRP1 est recrutée du cytoplasme vers les sites de contacts entre membranes du RE et OMM (MAM), tandis que la fusion mitochondriale est inhibée. La partie mitochondriale endommagée se dissocie du reste du réseau, initiant ainsi le processus mitophagique.

Voie de dégradation Parkin-dépendante : au sein des mitochondries endommagées, la dégradation de PINK1 par MPP et PARL, est inhibée. PINK1 est ainsi stabilisé au niveau de l'OMM, d'où il phosphoryle la Parkin d'une part et d'où il phosphoryle l'ubiquitine d'autre part. Cette modification de la Parkin entraîne son recrutement aux mitochondries et contribue à l'ajout de chaînes d'ubiquitine phosphorylées sur plusieurs protéines de l'OMM. Les protéines adaptatrices (p62, OPTN, NDP52, NBR1 et TAX1BP1) reconnaissent les chaînes de poly-ubiquitine phosphorylées sur les protéines de l'OMM et initient la formation du mitophagosome via leur liaison avec LC3.

Voie de dégradation Parkin-indépendante : La protéine PHB2 (initialement à l'IMM) ainsi que les cardiolipines (CL) sont externalisées vers l'OMM suite à des dommages mitochondriaux. En réponse à différents stimuli, PHB2, CL et d'autres récepteurs de mitophagie (FUNDC1, NIX, BNIP3 et FKBP8) interagissent directement avec LC3 pour former le mitophagosome.

Une fois le mitophagosome formé, il fusionne avec le lysosome pour générer le mitolysosome, ce qui permet l'élimination des mitochondries.

Dans les cellules cancéreuses, la mitophagie participe de deux manières à la survie des cellules. D'une part, la régulation négative de ce processus contribue à moduler le métabolisme soutenant notamment l'effet Warburg. Dans les MCF7, une lignée cancéreuse mammaire, ayant acquis une résistance aux inhibiteurs de RTK, on observe une diminution de l'expression de BNIP3 (*BCL2 Interacting protein 3*), une diminution des processus mitophagiques et l'accumulation de mitochondries

endommagées induisant une augmentation de la production de ROS et la production d'ATP via la glycolyse (Lyons et al. 2017). D'autre part, l'augmentation de la mitophagie promeut la résistance aux traitements cytotoxiques (Yao et al. 2019). L'équipe de P.Czabotar en 2018 décrit un mécanisme dépendant de la PARKIN soutenant la résistance à l'apoptose via l'inhibition de la fonction de BAX et BAK (Bernardini et al. 2019). Dans cette étude, des cellules Hela déficientes pour BAX et BAK sont modifiées pour surexprimer respectivement BAX ou BAK et à cela s'ajoute la surexpression ou non de la PARKIN. Ces cellules sont soumises à un traitement combinant de l'antimycine A et de l'oligomycine (AO), deux agents perturbant la chaîne respiratoire et induisant un stress mitochondrial. La mort cellulaire est mesurée en fonction du temps par le relargage de la lactate déshydrogénase ou par la libération de cytochrome C. Dans les cellules surexprimant la PARKIN, les cellules BAX+ sont moins sujettes à la mort. Cependant, BAX n'est pas retrouvé dégradé par des mécanismes mitophagiques mais maintenu dans le cytoplasme. Un traitement de ces cellules par le MG132, un inhibiteur du protéasome, restaure la localisation mitochondriale de BAX et la mort des cellulaires traitées par l'AO. L'hypothèse amenée est la dégradation PARKIN-dépendante de VDAC2, lors d'un traitement par l'AO, évitant la stabilisation de BAX à l'OMM et l'activation sous-jacente de l'apoptose. L'effet de l'activation de la PARKIN par l'AO a un tout autre effet sur la protéine BAK. En effet, BAK est un substrat direct de la PARKIN, cette protéine est donc directement poly-ubiquitinylées sous effet de l'AO et subit une dégradation protéasome-dépendante. Cette dégradation limite donc la capacité de BAK à former des pores au niveau de l'OMM et à induire l'apoptose. L'équipe de Jean-Ehrland Ricci a également décrit, dans des cellules cancéreuses mammaires Hela, une voie mitophagique indépendante de la PARKIN promouvant la résistance au Cisplatine (Villa et al. 2017).

Un autre mécanisme participant à la résistance aux traitements dans les cellules cancéreuses est le transfert mitochondrial.

b. Transfert mitochondrial

Sous certaines conditions, les cellules peuvent s'échanger des mitochondries, saines ou endommagées, soit pour augmenter la capacité OXPHOS, soit pour profiter de la machinerie mitophagique des cellules receveuses. Ce dernier point est appelé la « transmitophagie » (Davis et al. 2014; Hayakawa et al. 2016). Dans un modèle murin de mélanome, des cellules privées de leurs ADN mitochondrial ont été injectées à des souris qui ont rapidement incorporées des mitochondries entières de leur hôte pour maintenir leur métabolisme (Dong et al. 2017). D'autre part, en étudiant *in vivo* et *in vitro* l'impact du transfert de mitochondries pendant et après traitement contre la leucémie myéloïde aigüe, l'équipe d'Emmanuel Griessinger a montré que ce processus fourni un avantage pro-survie significatif pendant et après traitement (Moschoi et al. 2016).

Plusieurs mécanismes de transfert de mitochondries sont proposés (Zampieri et al. 2021). Parmi eux l'on retrouve:

- le transfert via les jonctions communicantes (ou jonctions *gap*). Ces jonctions mettent en contact le cytoplasme de deux cellules adjacentes.
- le transfert via des nanotubes. Ces tunnels sont formés par une excroissance fine de la membrane plasmique d'une cellule jusqu'à au moins une autre cellule, leur permettant d'échanger du matériel cellulaire.
- le transfert via les vésicules extracellulaires.

Voyons plus en détail les vésicules extracellulaires qui peuvent transporter, en fonction de leur taille, des mitochondries entières mais également des constituants mitochondriaux spécifiques.

c. Vésicules extracellulaires cellulaires issues des mitochondries

i. Vésicules extracellulaires

Les vésicules extracellulaires (EVs) forment une classe hétérogène de structures « cargo » naturellement sécrétées par les cellules dans l'environnement extracellulaire. Ces structures participent à la communication inter-cellulaire. Elles sont constituées d'une ou plusieurs bicouches lipidiques et transportent des protéines, de l'ADN, de l'ARN, des métabolites, des lipides et parfois même des mitochondries entières. Leurs contenus et leurs rôles font l'objet de nombreuses études, notamment leur rôle dans la communication entre cellules et dans l'élimination de matériel indésirable (Devhare et Ray 2018; Mathieu et al. 2019). Ces structures sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques tels que la réponse immunitaire, la neurodégénération et la progression du cancer (Shanmughapriya, Langford, et Natarajaseenivasan 2020; Ma et al. 2020; She et al. 2020). Ces vésicules sont également retrouvées dans les fluides biologiques et l'intérêt diagnostique de la détection du contenu des EVs circulants dans le sang de patients constitue un champs d'investigation particulièrement prometteur (An et al. 2015).

On distingue plusieurs catégories d'EVs en se basant sur leur taille, leur densité, leur composition et leur origine . Les catégories aujourd'hui décrites sont :

- Les exosomes. De 50 à 100nm de diamètre, ils dérivent de vésicules intracellulaires appelées les MVBs (*Multi-vesicular bodies*) libérés dans l'environnement extracellulaire.
- Les microvésicules. De 100 à 1000nm de diamètres, celles-ci se forment directement par invagination de la membrane plasmique.
- Les corps apoptotiques. De 50 à 5000nm, ces vésicules sont des débris de cellules ayant engagés une mort cellulaire par apoptose.

Microvesicles and Apoptotic bodies

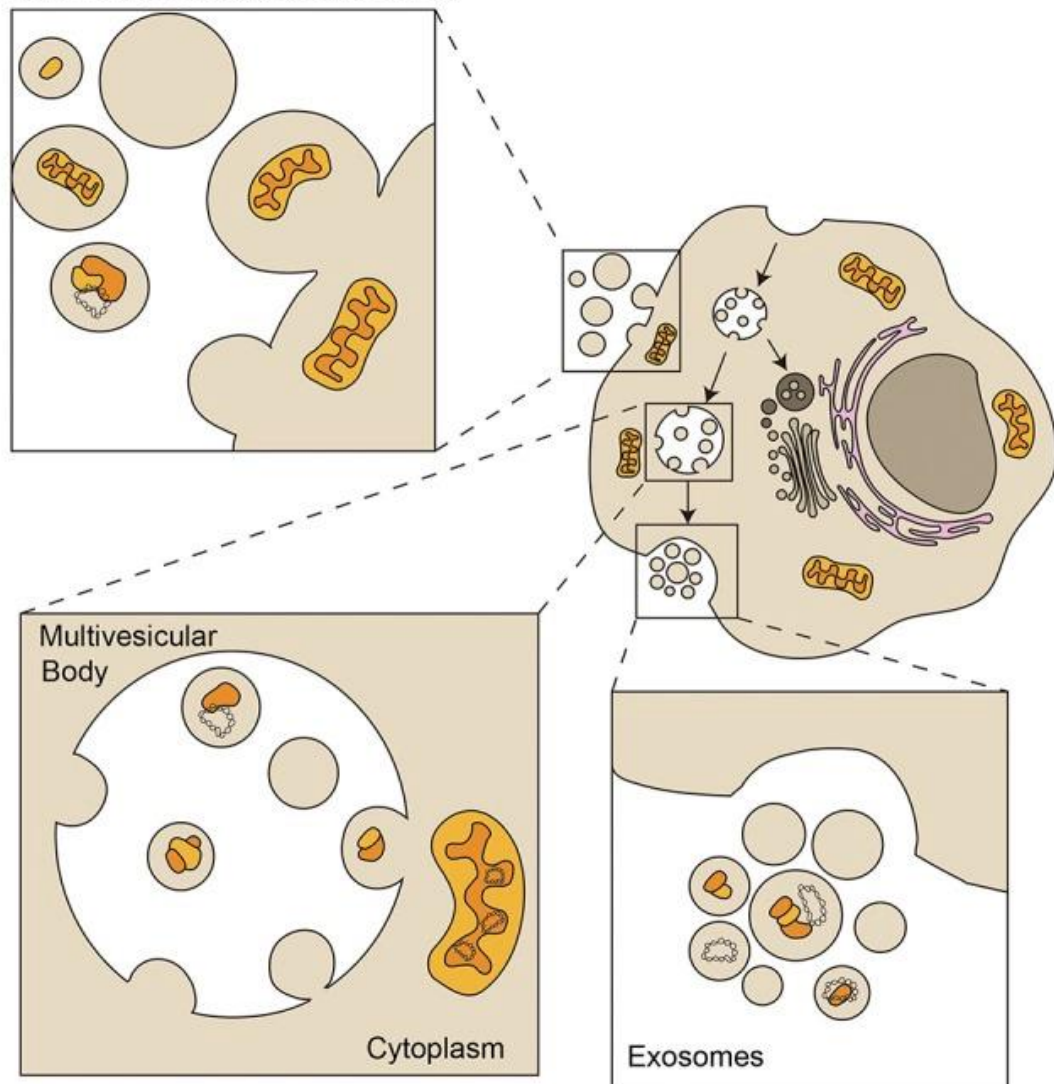


Figure 18 Inclusion de mitochondries entières ou de contenu mitochondrial dans les vésicules extracellulaires (Torralba, Baixauli, Sanchez-Madrid, 2016)

Les microvésicules, également appelées ectosomes, se détachent directement de la membrane plasmique et sont très hétérogènes en taille et en composition. Les corps apoptotiques ont une taille supérieure à 1 μm et sont libérés par les cellules apoptotiques qui se débarrassent de certaines parties de leur cytoplasme et de leurs organites entourés de membrane plasmique. Les exosomes sont de petites vésicules de 50 à 150 nm ayant une origine endocytaire.

Les vésicules extracellulaires peuvent contenir des fragments de mitochondries, notamment des protéines mitochondriales et de l'ADNmt (représentés en jaune et en orange). Les particules plus grosses peuvent être chargées de mitochondries entièrement fonctionnelles.

Par bourgeonnement vers l'intérieur, des endosomes tardifs ou des vésicules dérivées de mitochondries, sont intégrés dans des corps multivésiculaires (MVB) qui sont libérées dans l'environnement extracellulaire sous forme d'exosomes par fusion des MVB avec la membrane plasmique.

Cette classification reste succincte et d'autres catégories sont en cours de description et de classification. Certaines vésicules peuvent transporter des mitochondries entières telles que les microvésicules et les corps apoptotiques. Certaines EVs transportent seulement du contenu mitochondrial tels que des protéines ou de l'ADN mitochondrial. Parmi les découvertes récentes dans ce

domaine, des vésicules plus petites, et dont les membranes sont enrichies en cardiolipines, viennent d'être isolées et nommées « mitovésicules » (ou MitoEVs) (D'Acunzo et al., s. d.). Ces MitoEVs pourraient modifier le métabolisme et la réponse inflammatoire des cellules donneuses et receveuses.

i. Les Mitovésicules

Très récemment, plusieurs études se sont penchées sur des composants spécifiques des mitochondries au sein des EVs et une hypothèse a été proposée quant à l'origine mitochondriale de ces petits cargos (Crewe et al. 2021; Todkar et al. 2021; Vasam et al. 2021). Ces vésicules appelées des MitoEVs feraient entre 50 et 150 nm et des expériences d'imagerie en directe de cellules souches mésenchymales suggèrent que le contenu mitochondrial serait d'abord incorporé dans des autophagosomes avant d'être libérés hors des cellules (Phinney et al. 2015) mettant donc en jeu des mécanismes connus du système endolysosomal/exosomal. En effet, plusieurs études suggèrent que le contenu mitochondrial des EVs transiterait de la mitochondrie, via les MDVs (*Mitochondrial derived vesicles*) (Todkar et al. 2021; Vasam et al. 2021), qui seraient ensuite incluses dans les MVBs (*Multi-vesicular bodies*) puis excrétées hors des cellules. Les MDVs sont de petites vésicules intracellulaires permettant de livrer du contenu mitochondrial à d'autres organites tels que les peroxisomes ou les endosomes (Sugiura et al. 2014). Certaines de ces données suggèrent que le contenu mitochondrial empaqueté est finement sélectionné. En effet, les composants mitochondriaux détectés varient selon les études. Par exemple, TOM20 (*Translocase of outer membrane 20*) ne fut détecté que dans une étude (Todkar et al. 2021) et VDAC1 a été détecté dans l'étude (D'Acunzo et al., s. d.) mais pas dans l'étude de (Torralba et al. 2018). On notera par exemple que parmi les protéines de la famille BCL-2, seul BAX est retrouvé au sein des MitoEVs (D'Acunzo et al., s. d.). Cela dit, les méthodes de séparation des EVs est un point clé de la caractérisation du contenu de ces vésicules et un effort collectif d'homogénéisation de ces méthodes est permis par la mise en place du projet *MISEV2018 guidelines* (Théry et al. 2018).

Le rôle, le contenu et le mécanisme par lequel la sécrétion s'opère restent à être détaillés dans différents contextes pathologiques. Cela dit, le relargage de contenu mitochondrial dans les EVs semble participer à la survie des mitochondries endommagées. Certaines données suggèrent que la quantité de vésicules contenant du matériel mitochondrial peut varier selon l'état des cellules. Par exemple, le traitement des cellules par l'Antimycine A, un inhibiteur du Complexe III de la chaîne respiratoire, favorisant un stress énergétique augmente le relargage de contenu mitochondrial dans les EVs (Crewe et al. 2021). D'autre part, dans cette étude, il est montré que lorsque l'activité des lysosomes est inhibée, on observe une augmentation du relargage de contenu mitochondrial dans les EVs. D'autre part, il a été montré que l'activation de la mitophagie Parkin-dépendante favorise la dégradation mitochondriale limitant l'inclusion des protéines mitochondriales dans les EVs (Todkar et al. 2021). Ces résultats suggèrent une balance entre les processus autophagiques/mitophagiques et le relargage du contenu mitochondrial dans les EVs, l'inhibition de l'un de ces processus favorisant l'autre.

c. Système endosomal et élimination mitochondriale

i. *Bref descriptif du système endosomal*

Le transport de matériel au sein des cellules est opéré par le système endosomal. Les endosomes se forment par invagination de la membrane plasmique et ce mécanisme permet d'encapsuler du matériel extra-cellulaire ou présent au sein de la membrane plasmique dans une vésicule. Une fois internalisés, ces vésicules sont appelées les endosomes précoces (ou EE pour « *early endosomes* ») et peuvent se déplacer au sein des cellules pour délivrer leur contenu aux différents organites. Le transfert de contenu nécessite la participation de différents acteurs pour former des zones de contact entre les endosomes et les différents organites. Le destin des EE peut alors être leur recyclage à la membrane plasmique, leur fusion avec des MVB, ou leur évolution en endosomes tardifs (aussi appelés LE pour « *Late Endosome* »). Les LEs sont destinés à fusionner avec des lysosomes ce qui aboutit à une dégradation de leur contenu. Les MVBs sont de plus grosses structures pouvant contenir de nombreux EE mais également d'autres vésicules tels que des MDVs. Les MVBs peuvent externaliser tout ou partie de leur contenu hors des cellules, mais peuvent également fusionner avec des lysosomes et être dégradés. Une famille de protéines est particulièrement impliqué dans la régulation de ces phénomènes, les GTPases Rab.

Les petites GTPases Rab décorent les membranes des vésicules intracellulaires et contrôlent ce système de transport. Chez l'humain, il existe une soixantaine de protéines membres de la famille Rab. Elles permettent d'identifier les vésicules, participent à la formation des vésicules et contribuent à assurer leur transport jusqu'à leur destination. Comme les autres GTPases, l'activité des protéines de la famille Rab repose sur leur capacité à être activées et désactivées par des GEFs et des GAPs, leur permettant via une régulation spatiale et temporelle d'assurer leur fonction de transport. Parmi les plus citées, Rab5, qui est retrouvée à la surface des EE et qui participe à la fusion de la vésicule néoformée. Rab5 est activée par des GEFs tels que Rabex-5 et RIN1 et inactivée par des GAPs tels que Rab-GAP5.

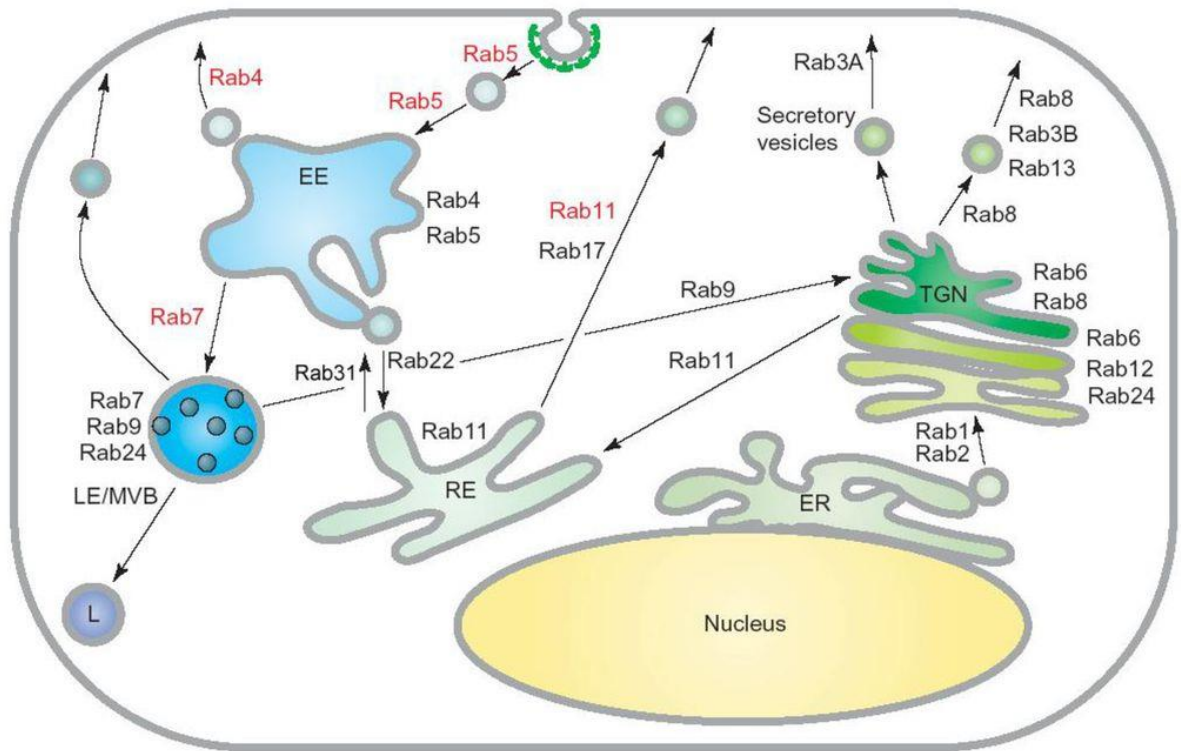


Figure 19 Système de transport vésiculaire intra-cellulaire

Les mécanismes de transport de cargaisons sont médiés par des protéines RAB spécifiques. RAB5 assure la médiation du transfert des cargaisons de la membrane plasmique aux endosomes précoces (EE). RAB4 et RAB11 assurent les mécanismes de recyclage des endosomes et sont impliqués dans le transport vésiculaire vers la membrane plasmique. Les endosomes tardifs (LE) et les corps multivésiculaires (MVB), sont notamment décorés de RAB7 qui régule la dégradation des cargaisons via les lysosomes ou le relargage du contenu des MVBs à l'extérieur des cellules.

ii. Participation du système endosomal à l'élimination mitochondriale

Plusieurs études ont établi un rôle du système endosomal dans l'élimination des mitochondries endommagées. Après traitement des cellules par un agent découplant, le FCCP, une équipe de recherche Californienne a démontré, par des approches de microscopie, l'augmentation des contacts entre des vésicules Rab5+ et CoxIV, une protéine exclusivement mitochondriale, associés à une diminution de la masse mitochondriale (Hammerling et al. 2017). Des résultats similaires ont été observés dans des cellules déficientes pour les processus autophagiques. Par des méthodes de microscopie plus résolutive, cette équipe a été capable d'observer des mitochondries incluses dans des endosomes Rab5+. Dans ce contexte, l'extraction des membranes lourdes enrichies en membranes mitochondriales, montre un enrichissement de Rab5 et de protéines participant aux complexes ESCRT au niveau mitochondrial après traitement au FCCP. L'extinction par siARN de plusieurs protéines de la machinerie ESCRT (complexes protéiques participant au remodelage des membranes biologiques) interfère avec le phénomène d'élimination mitochondrial et induit la mort des cellules sous FCCP. De plus, cette étude identifie

la voie lysosomale comme responsable de la dégradation des mitochondries après leur inclusion dans les lysosomes. En effet, sous FCCP, un co-marquage des mitochondries avec des protéines de LEs (Rab7) et de lysosomes (Lamp2) expose une augmentation de la colocalisation Rab7-CoxIV et de Lamp2/mitoDsRed après traitement des cellules au FCCP. Une autre étude plus récente, étudiant l'implication de l'E3-ubiquitine ligase possédant un domaine 2xFYVE, la rififyline (RFFL), présente des résultats similaires, renforçant ce rôle émergent du système endosomal sur l'élimination des mitochondries endommagées (Ravindran et al. 2022). De manière intéressante, ces deux études démontrent la participation non-canonique de la PARKIN dans ces phénomènes. La seconde étude présente notamment des preuves de l'antériorité des contacts entre les endosomes et mitochondries vis-à-vis de l'activation de la PARKIN. D'autre part, ce mécanisme d'élimination endo-lysosomal des mitochondries semble protéger les cellules de la mort, puisque lorsque ce mécanisme est inhibé, la mort cellulaire est déclenchée.

Les traitements cytotoxiques ont pour effet collatéral d'épargner les clones tumoraux présentant une forte expression en BCL-xL en raison de l'implication de cette protéine dans les phénomènes de résistance à la MOMP. Ceci participe à l'un des frein majeurs du traitement contre les cancers : l'hétérogénéité tumorale.

IV. Hétérogénéité tumorale, frein aux thérapies conventionnelles

Le tissu tumoral est, depuis quelques décennies, appréhendé comme une structure complexe. Un premier niveau de complexité réside dans le fait qu'il existe près de deux cents de types de cancers différents qui possèdent chacun, en leur sein, une classification établie en sous-types de cancers (Q. Song, Merajver, et Li 2015). Un premier exemple d'hétérogénéité inter-patients réside dans l'origine des cellules cancéreuses. A titre d'illustration, l'épithélium de la glande mammaire normale est composé de deux types de cellules épithéliales : 1) les cellules contractiles basales (principalement myoépithéliales) qui sont en contact direct avec la membrane basale et 2) les cellules luminales sécrétoires qui font face à la lumière des canaux/lobules. Ces deux types cellulaires peuvent donner lieu à des sous-types de cancers différents. On parlera donc des sous-types de cancer du sein « *basal-like* » ou luminal par exemple. Ces différents cancers ne présentent pas les mêmes récepteurs hormonaux à la surface des cellules et l'arsenal thérapeutique pour cibler ces cancers est différent.

De plus, une tumeur n'est plus considérée comme un amas de cellules cancéreuses mais est constituée de plusieurs types cellulaires qui participent activement à la progression et au maintien de la niche tumorale (Bissell et Radisky 2001). Ce qui est appelé le microenvironnement tumoral est composé de cellules de soutien tels que les fibroblastes associés au cancer (*Cancer Associated Fibroblast* ou CAF), des cellules permettant d'afflux de sang dans la tumeur tels que des cellules endothéliales et des péricytes, des cellules immunitaires ainsi que des cellules souches cancéreuses. L'ensemble de ces cellules communiquent et participent de concert à la progression de la maladie et à la résistance aux traitements (Maida et al. 2016; Nocquet, Juin, et Souazé 2020).

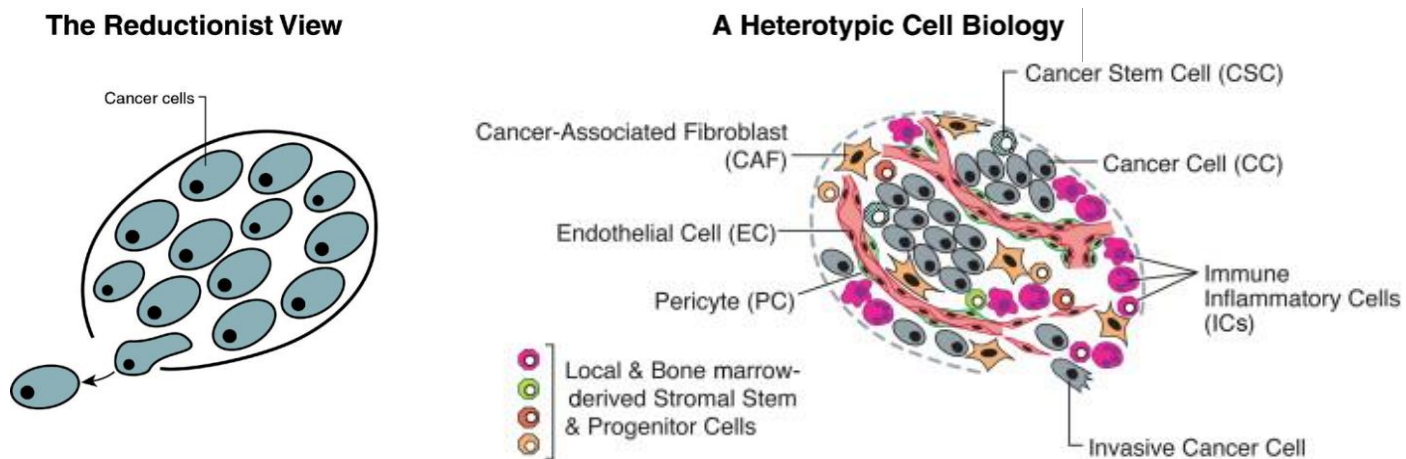


Figure 20 Complexité du tissu tumoral (D'après Hanahan, Weinberg, 2000 et 2011)

Longtemps perçue comme une structure constituée uniquement de cellules cancéreuses (Reductionist view), la tumeur est pourtant constituée de nombreux types cellulaires dont des cellules immunitaires, des cellules souches et des cellules de soutien (Heterotypic cell biology).

Les hypothèses convergent et soutiennent l'idée que les échecs thérapeutiques restent fréquents en raison de l'incapacité des traitements cytotoxiques à éliminer toutes les cellules cancéreuses. Ceci résulte de l'hétérogénéité génomique (Dagogo-Jack et Shaw 2018) à l'origine d'une hétérogénéité phénotypique (Meacham et Morrison 2013) permettant l'existence de clones plus adaptés à la survie. L'étude de la dynamique des populations tumorales apparaît désormais d'une importance majeure pour le développement de thérapies efficaces.

a. L'hétérogénéité génomique

Un niveau d'hétérogénéité réside entre les cellules cancéreuses elles-mêmes au sein d'une même tumeur (Kreso et Dick 2014). Plusieurs phénomènes concourent à l'émergence de sous-populations distinctes au cours de la tumorigénèse. Tout d'abord, l'accumulation de mutations en raison de l'instabilité génétique intrinsèque aux cellules cancéreuses promeut la coexistence de sous-populations différentes de cellules cancéreuses. L'instabilité génomique est un caractère intrinsèque commun des cellules cancéreuses en raison de leur nombre aberrant de cycles réplicatifs. Ainsi, les sous-populations de cellules cancéreuses au sein d'une même tumeur présentent des différences en termes de prolifération, de capacité à résister aux traitements ainsi que de propriétés invasives.

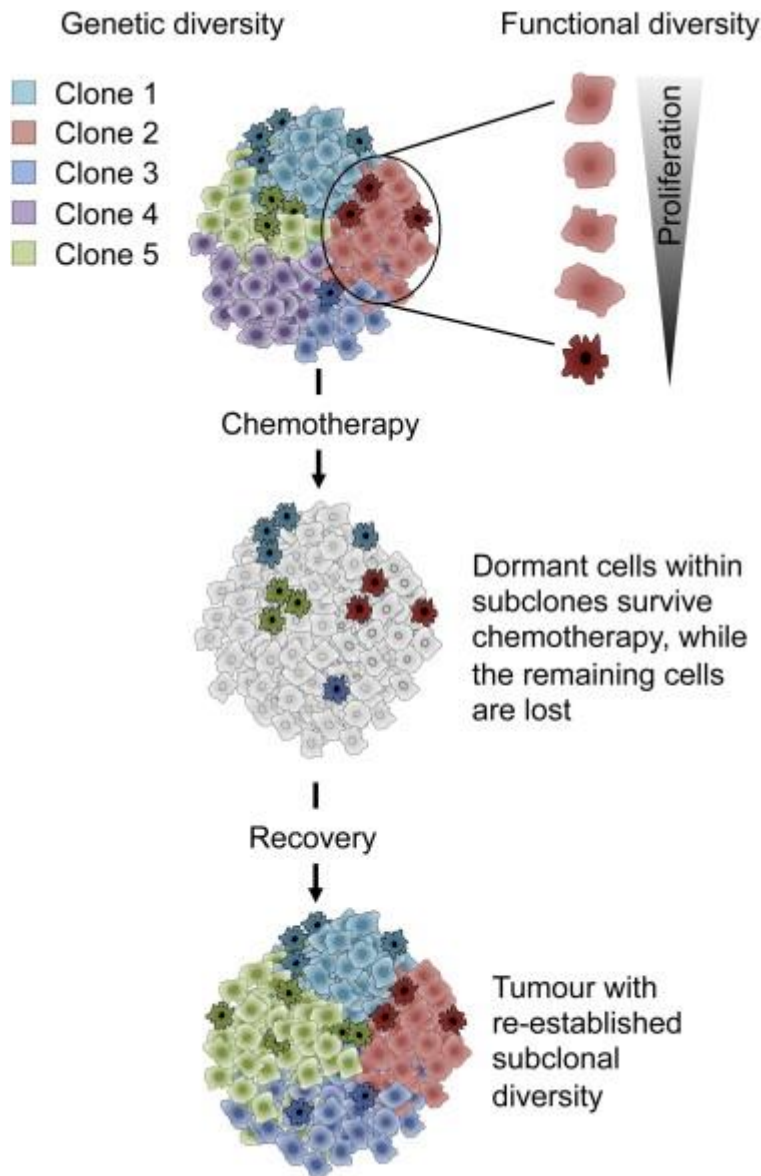


Figure 21 Hétérogénéité génétique et ses répercussions en cas de rechute après traitement (Kreso et Dick, 2014)

Chaque clone (représenté par les différentes couleurs) contient un mélange de cellules qui varient quant à leur capacité de prolifération et leur capacité « souche » relativement en dormance. Ensemble, ces facteurs représentent la diversité fonctionnelle présente au sein de sous-clones génétiques uniques.

La chimiothérapie peut réduire la charge tumorale en éliminant les cellules hautement prolifératives, tout en épargnant les cellules relativement dormantes ; après le traitement, ces cellules peuvent engendrer un nouveau cancer.

Ainsi, la diversité sous-clonale peut être modifiée par la chimiothérapie et permettre la sélection de cellules présentant des mutations génétiques supplémentaires qui confèrent un avantage en termes de survie.

Ce schéma n'illustre pas le concept selon lequel des cellules résistantes à la chimiothérapie peuvent exister avant le traitement et être sélectionnées après la chimiothérapie.

Au cours du développement d'une tumeur, à chaque division cellulaire, l'acquisition d'une mutation peut aboutir à la diversification génétique de la tumeur (M. Lynch 2010). En effet, la plupart des tumeurs solides adoptent un modèle d'évolution ramifié qui offre l'opportunité de créer un plus grand niveau

d'hétérogénéité au sein d'une tumeur (Gerlinger et al. 2014). Un autre degré de modification du génome est également porté par l'épigénétique. Ce phénomène entraîne des changements dans l'expression des gènes sans atteintes à la séquence d'ADN mais par l'ajout de groupements méthyl au niveau des bases des séquences régulatrices ainsi que par des modifications biochimiques au niveau des histones, protéines qui régulent l'architecture du génome (Allis et Jenuwein 2016). Au sein des tumeurs, l'étude des marques épigénétiques fait état de la régulation de nombreux gènes par hypo- ou hyper-méthylations au niveau de leur promoteur ou par modification des histones (A. Youn et al. 2018). L'aspect pléiotropique des sources de l'hétérogénéité génomique contribue aux difficultés rencontrées en clinique malgré les efforts de classification et de ciblage pharmaceutique des certaines protéines cibles.

b. L'hétérogénéité phénotypique

L'hétérogénéité génomique participe, au cours du développement de la tumeur et au cours d'un traitement cytotoxique, à l'émergence de cellules présentant des phénotypes différents. La variabilité génétique soutient la coexistence de différents clones, au sein d'une tumeur, présentant des caractéristiques phénotypiques différentes. Il s'agit notamment de caractéristiques prolifératives, invasives, « souches » et de résistance au traitement. Un exemple de la plasticité phénotypique au sein d'une même tumeur est reflété par les mécanismes de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). Ce programme biologique transitoire et réversible fait l'objet de nombreux travaux de recherches, notamment dans le but de caractériser les acteurs maintenant la résidence stable de cellules cancéreuses dans un état épithélial (E) ou mésenchymal (M). Une étude récente de l'université de Cambridge a toutefois bouleversé les connaissances actuelles dans ce domaine en démontrant l'existence d'un état hybride E/M stable (Kröger et al. 2019). Ces travaux démontrent que dans une population de cellules épithéliales mammaires immortalisées, il est possible via l'évaluation de l'expression combinée de seulement deux marqueurs (CD104 et CD44) d'isoler les populations E, M et E/M. Ainsi, l'expression des différents acteurs de l'EMT, que sont Snail/Twist/Zeb1, a été évaluée dans chacune des sous-populations et leurs rôles respectifs ont été éclaircis en utilisant la méthode CRISPR-Cas9. Les résultats de cette étude montrent que l'expression du facteur de transcription Snail dans un fond cellulaire déplété en Zeb1 maintient les cellules cancéreuses mammaires dans un état hybride E/M favorisant les propriétés souches de ces cellules. Il est de plus en plus évident qu'il est nécessaire d'intégrer ces éléments dans la démarche thérapeutique afin de cibler l'ensemble des sous-clones tumoraux et éviter les phénomènes de rechute.

c. La plasticité phénotypique et cellules souches cancéreuses

Un petit sous-ensemble de cellules au sein des tumeurs, présentant des propriétés de type souche, caractérisées par leur capacité à soutenir la croissance tumorale (J. Zhou et al. 2019; Bhat, Allan, et Raouf 2019; Schwitalla et al. 2013), à s'auto-renouveler et à donner naissance à des cellules différenciées (Pece et al. 2010; Visvader et Lindeman 2012; Ponti et al. 2005) participe en soi à un autre niveau d'hétérogénéité. Ces cellules dites CIC sont donc capables de régénérer une tumeur hétérogène totalement différente de sa tumeur d'origine. Ces cellules participent donc à la plasticité des tumeurs.

Les progrès réalisés dans le domaine de la biologie des CIC ont mis en évidence une série de mécanismes à plusieurs échelles impliqués dans la transformation et le maintien des CIC. Une première étape de ce phénomène repose

sur une adaptation métabolique intra-cellulaire globale dont les conséquences sont une résistance aux agents cytotoxiques, un ralentissement de la prolifération, des capacités de renouvellement avec des propriétés de recyclage accrues (Sancho, Barneda, et Heeschen 2016). Une seconde étape, portée par la communication extra-cellulaire (à travers les molécules sécrétées, les cellules du microenvironnement ou le contenu des EVs) influence la suppression immunitaire, le maintien de l'état et la migration de ces cellules (López de Andrés et al. 2020). Ces adaptations de l'homéostasie cellulaire contribuent à la plasticité phénotypique de ces cellules. En effet, les cellules souches cancéreuses possèdent la capacité de résister aux traitements conventionnels et de donner naissance à une nouvelle tumeur, participant activement aux phénomènes de rechute des cancers. Ces phénomènes adaptatifs sont étudiés avec une attention particulière pour établir des profils ciblés, et pour certains d'entre eux, des biomarqueurs pronostiques, avec un bénéfice thérapeutique prometteur.

V. Conclusion

Les connaissances sur les phénomènes soutenant la résistance aux traitements actuels s'étoffent. Malgré cela, la diversité des mécanismes biologiques mis en jeu restent un frein à la rémission complète des patients atteints. Dans ce domaine, il est capital de caractériser les fonctions non-canoniques de BCL-xL dans la progression tumorale. Il s'agit d'une part, de comprendre les mécanismes imputables à la surexpression de BCL-xL et d'autre part, de comprendre les événements provoqués par la déplétion de BCL-xL afin de concevoir des thérapies efficaces pour bloquer les premiers et mimer les deuxièmes.

D'autre part, et au vue de la variété de localisation et de partenaires d'interaction de la protéine KRAS, il est nécessaire pour comprendre l'influence de BCL-xL sur ces réarrangements d'aborder cette question avec un angle dynamique, global et en cellule entière. Pour cela, les méthodes de détection directe de la dynamique spatio-temporelle des interactions intracellulaires semble fournir des bases solides.

F. Méthodes naissantes de marquage de proximité à la biotine

La complexité des phénomènes d'adaptation du vivant implique le développement de méthodes d'exploration ayant une portée spatio-temporelle. Au niveau cellulaire, l'étude de des processus de signalisation et de régulation repose sur la mise en relation de différents types de données sur un large réseau de protéines. Ces données relèvent de la structure d'une protéine donnée, de son expression relative, des modifications biochimiques qui lui sont apportées, de sa localisation subcellulaire, de ces partenaires d'interaction et enfin ses fonctions. Les méthodes de marquage de proximité (dites SRET pour *Spatially Restricted Enzymatic Tagging*) permettent d'appréhender plusieurs de ces informations dans leur contexte dynamique.

I. Les méthodes de marquage de proximité par des systèmes enzymatiques

Le SRET repose sur l'utilisation détournée d'enzymes initialement découvertes chez les bactéries ou les plantes afin de laisser une trace chimique sur un constituant cellulaire donné permettant ainsi son identification. Ces constituants peuvent être de nature protéique, lipidique ou nucléotidique. Ce marquage est dépendant de la proximité entre l'enzyme et le constituant à identifier dans son contexte physiologique, c'est-à-dire, en cellule entière. D'autre part, ces méthodes nécessitent d'être couplées à des techniques biochimiques de purification puis d'identification des différents composés marqués.

L'ancêtre de ces techniques, nommée la DamID, fut développée en 2000 afin de caractériser les sites de fixation des facteurs de transcription sur l'ADN (Steensel et Henikoff 2000). Pour cela, la séquence de la DNA adénine méthyltransférase (Dam) d'*Escherichia Coli* est fusionnée à la séquence codant pour le domaine de liaison à l'ADN d'une protéine nucléaire d'intérêt. Une fois ce mutant exprimé dans une cellule eucaryote, la Dam induit une sur-méthylation de la zone de contact entre l'ADN et le domaine de liaison choisi. Cette méthode permet ainsi de laisser une trace chimique sur l'ADN par l'activité de méthylation naturelle de la Dam et donc d'identifier les zones de liaison des protéines nucléaires se liant à l'ADN. L'approche de cette technologie biochimique a permis d'envisager, à l'échelle moléculaire, un rapprochement spatial entre un appât, c'est-à-dire ici le domaine de liaison à l'ADN, et sa proie, un site spécifique de l'ADN à identifier. La Dam sert, quant à elle, à marquer chimiquement la proie, ce qui permet par la suite son identification. Cette méthode a été à l'origine des méthodes de marquages à la biotine et de leur application dans l'étude des interactions protéines-protéines.

Les méthodes de marquage de proximité à la biotine (*Biotin-SRET*) tirent avantage des propriétés du couple biotine/(strept)avidine ainsi que d'enzymes dont la réaction catalytique et la séquence génétique ont été adaptées au fur et à mesure du développement de ces méthodes. Faisons tout d'abord un point sur ce qu'est la biotine et comment son affinité pour la streptavidine a permis d'élaborer différentes méthodes d'explorations en biochimie.

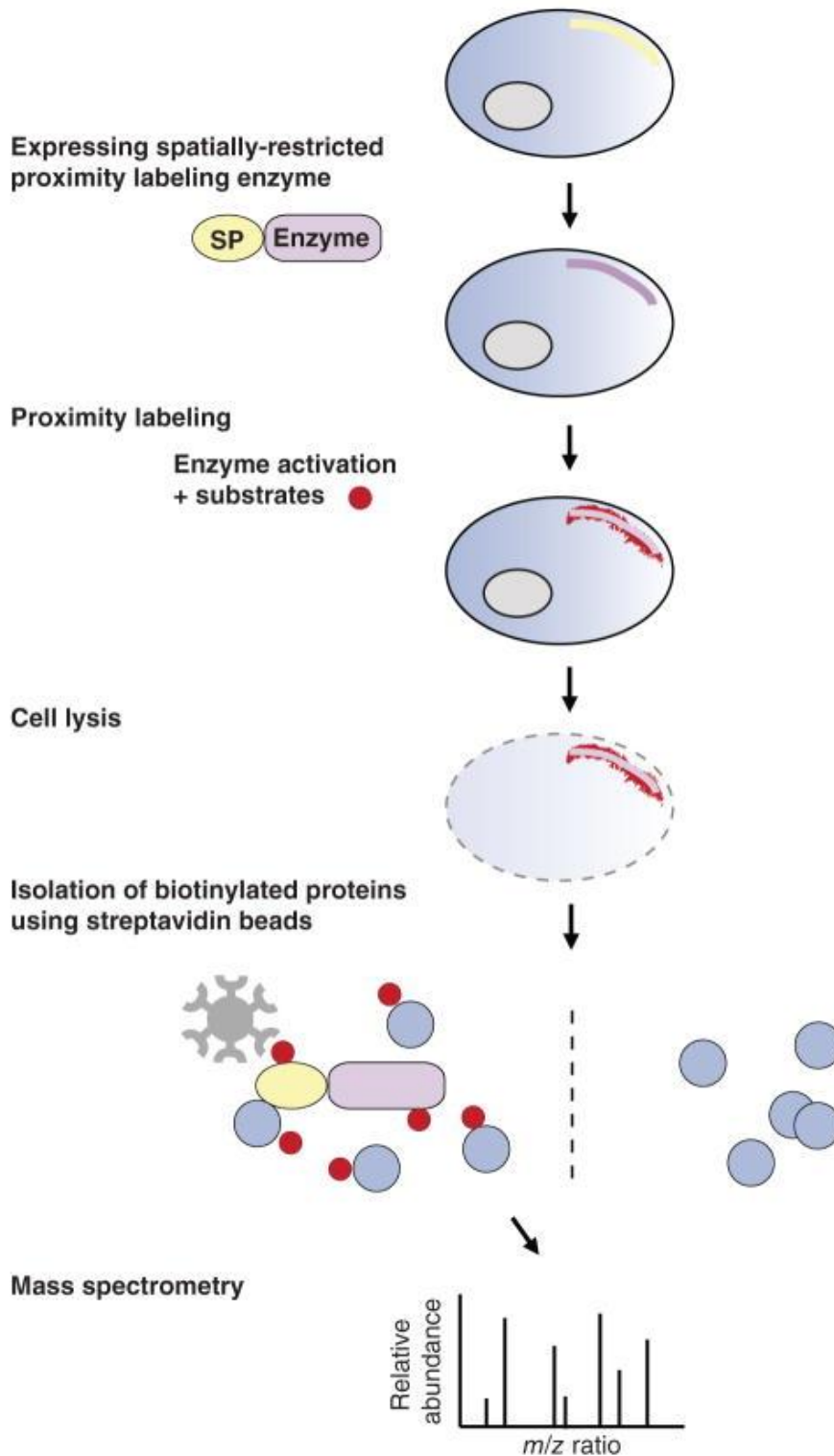


Figure 22 Principe des méthodes de marquage de proximité (C.-L. Chen et Perrimon 2017)

Pour obtenir un marquage localisé de protéines, les enzymes sont généralement fusionnées avec un peptide de ciblage ou à une protéine à restriction spatiale (SP). Les enzymes peuvent également être fusionnées avec toute protéine d'intérêt pour les études d'interactome protéique. Après avoir effectué le marquage de proximité dans des cellules vivantes, les cellules sont lysées et les protéines endogènes biotinylées sont isolées à l'aide de billes de streptavidine. Les protéines enrichies sont ensuite fragmentées en petits peptides par digestion à la trypsine et ensuite ionisés pour une analyse par spectrométrie de masse. Le rapport masse/charge (m/z) de chaque peptide est ensuite utilisé pour identifier la séquence peptidique généralement par comparaison informatique avec des bases de données établies.

a. La mise à profit du couple biotine-streptavidine

i. La biotine

La biotine est une petite molécule soluble aussi appelée vitamine H ou vitamine B8. Produite par les microorganismes et les plantes, elle est ingérée dans le bol alimentaire des mammifères et participe au métabolisme cellulaire en tant que coenzyme de cinq carboxylases impliquées dans le cycle de Krebs et le métabolisme des acides gras notamment (Tong 2013). Sa structure chimique et les moyens de l'isoler et de la synthétiser sont maîtrisés depuis les années 1940. Cette petite molécule est largement utilisée pour sa capacité à lier avec une très forte affinité ($K_d \approx 10^{-14}$) la streptavidine et ces homologues.

ii. La streptavidine

La streptavidine est un homotétramère protéique isolé de la bactérie *Streptomyces avidinii*. Cette protéine présente de nombreux avantages pour son utilisation dans des conditions expérimentales. Nous citerons notamment sa résistance à la dénaturation par différents facteurs (pH extrêmes, températures extrêmes, agents dénaturants, dégradation enzymatique) ainsi que sa capacité à lier jusqu'à 4 molécules de biotine (Dundas, Demonte, et Park 2013). Des protéines homologues à la streptavidine, dites les avidines, ont été identifiées dans différents autres organismes (Helppolainen et al. 2007; Tanaka et al. 2012), et les technologies actuellement disponibles prédisent qu'il en existe encore beaucoup d'autres. Bien que pouvant présenter un intérêt antibiotique, par sa capacité à priver un environnement de la vitamine essentielle qu'est la biotine, ces protéines ont principalement été étudiées comme paradigmes pour comprendre les caractéristiques physico-chimiques d'interactions protéines-ligand de très haute affinité (Weber et al. 1989) puis génétiquement modifiées pour façonner leur propriétés à différentes applications dans le domaine des biotechnologies (Laitinen et al. 2007). A titre d'exemple, une équipe de recherche Pékinoise a très récemment développé une méthode d'identification rapide de composés inhibiteurs de la protéine KRAS conjuguant l'affinité du couple biotine-streptavidine avec une méthode biochimique connue sous le nom d'ELISA (S. Liu et al. 2022).

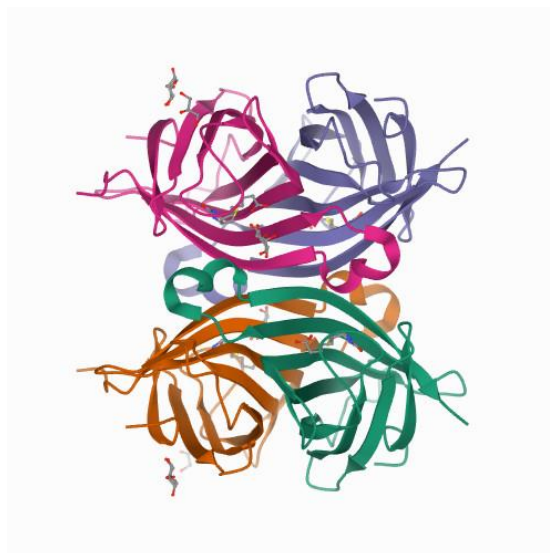


Figure 23 Structure tridimensionnelle du tétramère de streptavidine et de son ligand, la biotine (3RY2, DOI: 10.2210/pdb3RY2/pdb)

Les propriétés biologiques et physico-chimiques du couple biotine-(strept)avidine sont couramment exploitées dans de nombreux domaines de l'étude du vivant avec des applications tant en imagerie, en protéomique qu'en pharmacologie (Dundas, Demonte, et Park 2013). Un exemple de l'utilisation de ce couple en tant que marqueur fluorescent est le développement de fluorophores couplées à l'avidine. Ceci permet de visualiser et localiser, en microscopie confocale, les protéines biotinylées au sein des cellules. D'autres méthodes telles que le « Pull Down » permettent, grâce à l'utilisation de billes magnétiques couplées à la streptavidine, de purifier les protéines biotinylées d'un mélange de milliers d'autres protéines (Maryáš et al. 2018). Tout comme les méthodes de marquages de proximité, les techniques de purification et d'identification des composants cellulaires font l'objet d'optimisation constante (Rafiee et al. 2020). Les propriétés de ce couple pour visualiser ou purifier des protéines sont à la base des méthodes de marquage de proximité à la biotine.

b. Les méthodes basées sur les biotine-ligases - BiID

La BiID est un diminutif de *proximity-dependent biotinylation identification* soit en français, identification par biotinylation dépendante de la proximité. La BiID met à profit l'activité enzymatique de la biotine-ligase BirA afin de révéler des interactions protéines-protéines dans un contexte de cellule entière vivante.

BirA est une enzyme de 35-kDa qui a deux fonctions. Elle régule la biotinylation d'une sous-unité de l'acétyl-CoA carboxylase et agit comme un répresseur de l'opéron de synthèse de la biotine chez *Escherichia Coli* (Chapman-Smith et Cronan 1999).

La réaction de biotinylation par BirA est un processus en deux étapes :

- la première consiste l'activation de la biotine par sa combinaison avec une molécule d'ATP pour former le biotinoyl-5'-AMP (ou bioAMP). La biotine activée, fortement réactive, est retenue dans le site catalytique de BirA.
- BirA établit une liaison covalente entre le biotinoyl-5'-AMP et un résidu lysine contenu dans une séquence spécifique de son substrat. Cette séquence est connue sous le nom de BAP pour *biotin acceptor peptide* ou peptide accepteur de biotine.

Des modifications ont été apportées à cette enzyme afin de rendre son champ de biotinylation plus large. Le mutant BirA^{R118G} a été sélectionné pour sa capacité à relâcher prématurément le bioAMP de son site catalytique (Kwon et al. 2000) et pour être déficient dans l'homodimérisation et dans la liaison à l'ADN (Kwon et Beckett 2000; Streaker et Beckett 2006). Le bioAMP ainsi libéré pourra se lier de manière covalente aux protéines environnantes sans distinction, au niveau de résidus lysines. Le rayon maximal que peut parcourir le bioAMP avant de se lier à une lysine environnante ou d'être hydrolysé est estimé à 10nm (Choi-Rhee, Schulman, et Cronan 2004; Cronan 2005). Cette réactivité permettra donc d'assurer la spécificité spatiale de cette méthode.

La BioID repose sur la fusion de la séquence de BirA^{R118G} avec une protéine d'intérêt qui devient la proie. Une fois cette protéine recombinante exprimée dans une cellule supplémentée en biotine, BirA va biotinyler toutes protéines se trouvant à moins de 10nm de la proie, autrement dit le proximitome de cette proie. Ces interactants pourront ensuite être purifiés et visualisés en utilisant les propriétés physico-chimiques du couple biotine-(strept)avidine.

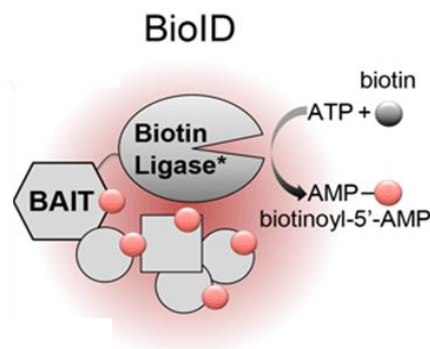


Figure 24 Marquage de proximité à la biotine – BioID

La biotine ligase fusionnée à sa proie (Bait) va modifier par ajout de groupements biotinoyl-5'-AMP les protéines environnantes.

Cette méthode a été développée et appliquée pour la première fois en 2012, dans des cellules humaines, les HEK293, avec comme proie la Lamine-A, un élément important de la structure de l'enveloppe nucléaire (Roux et al. 2012). Ces chercheurs ont ainsi identifié des partenaires connus, comme preuve de concept, ainsi que des partenaires encore inconnus de la Lamine-A. La fraction d'histones biotinylées s'est révélée particulièrement faible malgré leur abondance dans le noyau, ce qui participe à un gage de sélectivité spatiale. Leur étude identifie tout de même plusieurs limites à la BioID, qui serviront de base au développement des différentes méthodes de marquage de proximité à la biotine qui ont suivi.

i. Les limites et améliorations de la bioID

L'une des limites majeures de la bioID est la taille de BirA. En effet, une fois fusionnée à sa proie, cette protéine peut être trop prépondérante et perturber l'activité physiologique de sa proie. Pour pallier à ce problème, une version plus petite (25 kDa) a été optimisée à partir d'une biotine-ligase mutée d'un autre organisme, *Aquifex aeolicus*, et la méthode nommée BioID2 (D. I. Kim et al. 2016). Cette nouvelle version présente plusieurs autres avantages, dont le fait d'être thermostable jusqu'à plus de 50C° et aussi de nécessiter une addition de biotine réduite pour une activité accrue.

Une seconde limite repose sur l'activité de BirA. En effet, l'activité de BirA pour la méthode BioID est définie par la durée de mise en contact des cellules avec de la biotine pour obtenir un signal suffisant pour être révélé par western blot. La BioID nécessite une mise en contact de 6 à 24h selon le type cellulaire et l'abondance de la protéine étudiée. Une durée trop longue peut entraîner différentes toxicités, dues à l'accumulation de protéines biotinylées ou à la perte de charge des lysines modifiées. Une nouvelle version de BirA possédant 15 mutations a permis de réduire à 10 minutes la durée d'incubation de la biotine pour obtenir la même intensité de signal qu'en 18 heures avec la BioID (Branon et al. 2018). Cette nouvelle méthode a été baptisée TurboID et une version plus petite a été développée et nommée miniTurboID. Ces méthodes ont été utilisées avec succès dans plusieurs organismes entiers, tels que la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la drosophile *Drosophila melanogaster* ou le vers *Caenorhabditis elegans*.

D'autres méthodes basées sur les biotine-ligases ont été développées. La méthode RaPID, par exemple, permet l'identification de protéines se liant à des ARNs spécifiques. Cette méthode a été utilisée pour déterminer les acteurs protéiques de l'hôte participant au cycle viral de ZIKA (Ramanathan et al. 2018). Un autre exemple est le Split-BioID. Cette seconde méthode est basée séparation en deux sous unités de BirA afin d'être fusionnées séparément à deux protéines proies différentes. La réaction de biotinylation ne pourra avoir lieu *in cellulo* que si les deux proies sont assez proches pour interagir et ainsi rapprocher les deux sous- unités de BirA (Schopp et al. 2017). Une version Split-TurboID a été également développée (K. F. Cho et al. 2020).

c. Les méthodes basées sur les peroxydases - APEX

i. Structure et fonction de l'ascorbate peroxydase

La méthode de marquage de proximité nommée APEX utilise les propriétés d'une oxydo-réductuase, l'Ascorbate Peroxidase dont la séquence a été initialement

isolée du petit pois (*Pisum sativum*). Cette enzyme de 28kDa appartient à la famille des peroxydases de classe I. Cette classe d'enzymes participe à la défense anti-oxydante chez les plantes, les algues et certaines cyanobactéries (Raven 2003). Pour cela, elle réduit le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau, en oxydant le L-ascorbate. Bien que la spécificité de cette enzyme pour l'ascorbate soit forte, cette classe d'enzyme peut également oxyder d'autres substrats organiques (Sharp, Moody, et Raven 2003; Macdonald et al. 2006). En effet, ces enzymes possèdent deux sites d'interaction avec ces substrats, un site spécifique au L-ascorbate et un second site de liaison à des substrats aromatiques.



Figure 25 Structure de l'Ascorbate peroxydase des graines de soja (PDB 10AF)

ii. Principe et évolutions de la méthode APEX

Comme la méthode BiLD, la méthode APEX a pour but de marquer une large partie du protéome environnant une protéine d'intérêt (la proie) fusionnée à l'ascorbate peroxydase. Pour cela, l'activité de cette enzyme a été détournée pour, en présence d' H_2O_2 , soit :

- oxyder la biotine-phénol en un radical biotine-phénoxy. Ce radical, une fois libéré du site catalytique, peut réagir avec différents acides aminés environnants (particulièrement les Tyrosines mais également les Tryptophanes, Histidines et Cystéines). La demi-vie des radicaux biotine-phénoxy est très faible (1ms) ce qui impose un court rayon de biotinylation (20 nm). L'utilisation de biotine-phénol comme substrat permet ainsi de marquer les protéines présentes dans l'environnement proche de la proie (Rhee et al. 2013; Hung et al. 2014).
- catalyser la polymérisation et précipitation localisée du diaminobenzidine (DAB). La précipitation du DAB crée un contraste en microscopie électronique après une fixation au tétraoxyde d'osmium (Martell et al. 2012). L'utilisation du DAB comme substrat de l'APEX permet donc de visualiser avec une très haute résolution les protéines marquées.

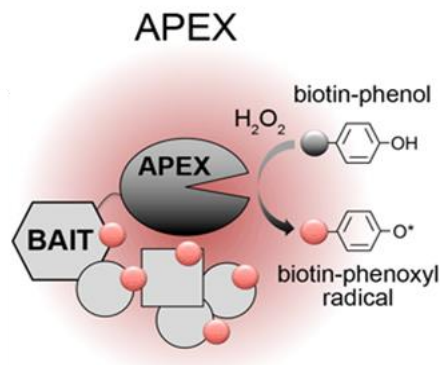


Figure 26 Méthode de marquage de proximité à la biotine – APEX

La méthode APEX est basée sur la fusion de l'Ascorbate Peroxidase (APEX) à une proie (Bait). APEX est activée par la présence d'H₂O₂ ce qui entraîne la transformation de la biotin-phénol en un radical qui va rapidement se fixer sur les protéines environnantes.

La méthode APEX a été initialement développée pour son application en microscopie électronique (Martell et al. 2012). Pour cela, la séquence de l'APEX extraite des graines de soja a été optimisée en y intégrant trois mutations (K14D, E112K et W41F) pour augmenter son activité. Pour la première fois, l'équipe d'Alice Ting a démontré l'utilité de cette méthode pour visualiser à très haute résolution différents organites mais également pour déterminer l'orientation des extrémités C- et N-terminales du transporteur mitochondrial MCU (*mitochondrial calcium uniporter*). Cette version de l'APEX a été ensuite utilisée pour cartographier le protéome des sous-compartiments mitochondriaux (matrice mitochondriale et espace intermembranaire) en tirant avantage du marquage à la biotine (Rhee et al. 2013).

iii. Limites et Améliorations

Une des premières limites reportée pour l'utilisation de cette version de l'APEX (APEX^{K14D E112K W41F}) est sa faible sensibilité. En effet, lorsque l'APEX est faiblement exprimé, le signal est indétectable. D'autre part, une surexpression au niveau de l'OMM ou de la membrane du RE s'est révélé délétère, causant l'agrégation de cette protéine (Lam et al. 2015). Une librairie de 10⁶ mutants d'APEX ont été évalués afin d'obtenir un nouveau variant, plus actif. Le mutant sélectionné possède une seule mutation supplémentaire donnant lieu à l'appellation APEX2 (APEX^{K14D E112K W41F A134P}). L'APEX2 est la version couramment utilisée aujourd'hui, notamment dans notre étude, et pour diverses applications allant de la cartographie sub-cellulaire, à l'étude des proximitomes de protéines cibles, la détermination de localisations subcellulaires de constituants ainsi que de profilage transcriptomique.

iv. Terme proximitome

Nous favorisons l'utilisation du terme proximitome pour définir l'ensemble des protéines marquées par la méthode APEX. En effet, nous estimons que le rayon d'action de cette enzyme (20nm) ne permet pas de distinguer entre les interactions directes et les protéines se trouvant dans l'environnement de la proie étudiée. Certains contrôles de localisation peuvent être utilisés pour affiner les résultats obtenus par l'APEX si l'on s'intéresse particulièrement aux interactants spécifiques d'une protéine cible et ce point sera abordé en discussion.

v. Applications diverses

Outre ces applications dans la visualisation et dans l'identification du proximitome de protéines dans différents contextes, l'APEX2 a également été utilisé pour établir la localisation sub-cellulaire de brins d'ARNs. Pour cette application, une première méthode nommée APEX-RIP a été développée reposant sur le marquage à la biotine de protéines au niveau de différents compartiments sub-cellulaires suivi de la formation de ponts au Formaldéhyde afin de figer les protéines et les ARN se trouvant à proximité. La purification des protéines marquées par affinité de la streptavidine pour la biotine permet ainsi d'isoler les ARNs fixés sur les protéines. La libération des ARN et leur séquençage s'est avéré efficace pour discriminer les ARNs marqués au sein des organites entourés par une membrane (Kaewsapsak et al. 2017). Cependant, la spécificité spatiale s'est révélée faible lorsque APEX-RIP est exposée au cytoplasme. De plus, la capacité de l'APEX à biotinyler directement l'ARN a été démontrée quelques années après et a donné lieu à un nouveau nom, APEX-seq (Fazal et al. 2019). Cette étude a fourni un atlas des positions des ARN endogènes. Ils ont notamment établi qu'il existe une concordance entre la localisation des protéines et celle de leur ARNm. Ils ont également mis en évidence la localisation différentielle des transcrits d'isoformes différents.

Une autre application, mettant en jeu la microscopie électronique, repose sur la fusion de l'APEX avec la protéine GBP (*GFP Binding Protein*). La protéine GBP est connue pour se lier spécifiquement à la GFP (*Green Fluorescent protein*), une protéine fluorescente souvent utilisée en biochimie. La co-expression de la protéine d'intérêt fusionnée à la GFP et de l'APEX-GBP permet, après marquage par le DAB, de déterminer précisément la localisation de la protéine cible (Ariotti et al. 2015). Un des avantages majeurs de cette méthode est qu'une seule protéine fusion (APEX-GBP) permet de marquer toute une banque, déjà existante dans la majorité des laboratoires, de protéines d'intérêts fusionnées à la GFP. Cette méthode a été utilisée pour caractériser les acteurs du transfert lipidique entre organites et, plus particulièrement, le rôle de STARD3 (*StAR Related Lipid Transfer Domain Containing 3*) dans le maintien des contacts entre les lysosomes et différents organites intra-cellulaires tels que le RE et les mitochondries (Höglinger et al. 2019, 1).

vi. Conclusion

Les méthodes de marquage de proximité à la biotine permettent d'observer des changements dans l'organisation spatiale de protéines d'intérêt. Les fonctions des protéines étant intrinsèquement liées à leur localisation et aux interactants qu'elles rencontrent, ces méthodes permettent d'aborder la mécanistique des événements affectant KRAS en présence et en absence de BCL-xL. Pour cela, nous avons optés pour la méthode APEX, nécessitant un temps de marquage plus court ce qui limite le bruit de fond et étant une protéine plus petite ce qui limite l'encombrement stérique autours de la petite GTPase KRAS. Les résultats extraits

de ces méthodes apportent des bases solides à la compréhension de cette mécanistique d'évènements dynamiques et des rapports de cause à effet qu'elles sous-tendent. Ces données pourront servir à la conception de thérapies ciblées permettant de réguler certaines fonctions spécifiques par des agents thérapeutiques

G. Objectifs

Alors que des possibilités thérapeutiques pertinentes sont développées pour certains sous-types histopathologiques de cancer du sein, d'autres sous-types demeurent réfractaires à tous les traitements, qu'ils soient généraux ou ciblés. Pour cette raison, le cancer du sein demeure la première cause de mortalité par cancer chez la femme de par le monde. La moitié des cancers du sein de sous-type triple négatif (TNBC : *Triple Negative Breast Cancer*) sont susceptibles de développer une résistance aux traitements de chimiothérapie classique. Le taux de récurrence est également très élevé dans les deux ans qui suivent le traitement. Ces cancers n'ont pas de marqueurs prédictifs connus ni de traitement spécifique associé à leur sous-type comme c'est le cas dans le sous-type ER+. Dans ce contexte, une meilleure compréhension des mécanismes biologiques qui participent à ces résistances sont nécessaires pour développer des outils thérapeutiques efficaces. Et nous l'avons vu des efforts doivent encore être déployés pour cibler la voie de signalisation KRAS dans les cancers.

Notre thématique scientifique est centrée sur l'étude des résistances tumorales orchestrées par les membres de la famille de BCL2, dont le rôle le plus décrit est le contrôle de la mort cellulaire par apoptose. De manière générale les niveaux de BCL-xL sont élevés dans les cellules épithéliales mammaires transformées par KRASG12V et présentent une activation du programme d'EMT (Keitel et al. 2014). Nous avons montré que dans ce contexte BCL-xL, par son interaction avec KRAS, contribue activement à l'émergence d'une population de CIC via une régulation positive de la voie de signalisation RAS (Carné Trécesson et al. 2017).

En effet, BCL-xL, à travers une fonction non-canonique, influence positivement la fréquence de formation des mammosphères induite par KRAS, et donc la fréquence des CIC à l'origine de ces sphères. Nous avons également établi que l'interaction entre BCL-xL et KRAS participe à la modulation de l'activité de la voie de signalisation MAPK, dépendante de KRAS. Bien que cet oncogène ne soit que très peu activé spontanément par mutation dans le cas de la plupart des cancers du sein, la surexpression de l'EGFR dans les tumeurs TNBC favorise une activité soutenue de la voie RAS.

Nous émettons l'hypothèse que, dans ces conditions, BCL-xL participe à l'activation KRAS en modulant sa localisation et son profil d'interaction avec ces partenaires. Nous avons pour cela choisi de mettre à profit les méthodes de marquage à la biotine afin de répondre à nos objectifs.

Ses objectifs se décrivent en trois parties :

- appréhender la dynamique de localisation intracellulaire de KRAS en fonction de la présence ou non de BCL-xL,
- décrire dans ce contexte, en utilisant une approche globale, le profil d'interaction de KRAS à chacune de ces étapes.
- déduire les effets biologiques de KRAS que BCL-xL module (positivement ou négativement)

Nous avons choisi d'explorer la base mécanistique de cette fonction non-canonique de BCL-xL par une approche protéomique de marquage à la biotine restreinte dans l'espace, l'APEX, conçue pour caractériser les protéines dont la proximité avec KRAS, utilisé comme appât, dépend de BCL-xL.

BCL-xL antagonizes the deleterious effects of KRAS on mitochondrial scaffolding

BELAID NM¹, BASSEVILLE A², ANDRE-GREGOIRE G⁴, FETIVEAU A¹, MAILLET L¹, GUILLONEAU F³, GUETTE C², DESAUBRY L⁴, GAVARD J.⁵, GAUTIER F^{1,6} and JUIN PP^{1,6}

¹ CRCI2NA, Team 7, INSERM, CNRS, Nantes Université, Univ Angers France.

² ICO, Angers, France.

³ Institut Cochin - Bâtiment Méchain Inserm U1016 - Cnrs UMR8104 - Université de Paris 22, rue Méchain - 75014 PARIS

⁴ Laboratory of Regenerative Nanomedicine (RNM), INSERM U 1260, University of Strasbourg, CRBS, Strasbourg 67000, France

⁴ CRCI2NA, Team 6, INSERM, CNRS, Nantes Université, Univ Angers France

⁵ ICO, Nantes, France

In addition to its canonical role as a regulator of mitochondrial outer membrane permeabilisation, BCL-xL exerts diverse non canonical functions contributing to cancer cell aggressiveness, and in particular it regulates KRAS intracellular activation levels. We herein explored the mechanistic basis for this effect by a spatially restricted biotin-labelling proteomic approach designed to characterize proteins whose proximity to KRAS, used as a bait, is BCL-xL dependant. BCL-xL loss, which destabilizes KRAS, relocalizes it to the vicinity of mitochondrial proteins as mitochondrial mass decreases. Proximal proteins include the mitochondrial scaffold prohibitin 2 (PHB2), which also interacts with BCL-xL and the downregulation of which prevents BCL-xL sensitive effects of KRAS on mitochondrial mass. BCL-xL loss leads to KRAS accumulation at contact sites between mitochondria and endosomes and to an increase in the production of exosomes carrying KRAS itself and mitochondrial proteins such as PHB2. These results argue that BCL-xL prevents a negative feedback regulation of KRAS intracellular stability by KRAS interference with mitochondrial quality control.

Introduction

Anti-apoptotic proteins of the BCL-2 family (BCL-2, BCL-XL or MCL-1) are frequently up-regulated in cancers (Philippe Juin et al. 2013). BCL-2 homologues negatively regulate mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) and resulting apoptosis by preventing activation and/or activity of multi-domain BAX/BAK downstream of BH3-only proteins, by sequestering the BH3 domains of these pro-apoptotic counterparts. Among, BCL-2, BCL-XL and MCL-1, which exert complementary survival activities BCL-xL binds to the widest spectrum of pro-apoptotic counterparts and this is considered to contribute, at least in part, to its potent anti-apoptotic activity. Its overexpression often correlates with chemoresistance, in particular triple negative breast cancer (Wei et al. 2012). Due to the canonical anti-apoptotic role of BCL-xL, the presence of malignant cells with high BCL-xL expression is conceived to reflect the negative selection of low expressors by apoptotic stress. MOMP is indeed the primary way by which cancer cells die in response to radiotherapy, chemotherapy and to diverse stress stimuli cancer cells encounter as tumors progress (Philippe Juin et al. 2013). Additionally, malignant cells may also be selectively advantaged (even in the absence of pro-apoptotic pressure) as a result of non-canonical functions of BCL-xL. These functions include, non-exhaustively, the regulation of calcium signaling and of autophagy or, some interference with transcriptional pathways. These effects were ascribed to BCL-xL ability to interact with proteins beyond the BCL-2 family, contributing to tumor growth and dissemination by modulating the activity of these interactants (Braun et al. 2013).

We recently reported a non-canonical oncogenic effect of BCL-xL, related to its ability to favour full activation of signalling downstream of KRAS (Carné Trécesson et al. 2017). RAS pathway activation frequently occurs in solid tumours. Activation of RAS and of its downstream pathways MAPK/ERK and PI3K/AKT have well documented effects on cell proliferation and, in the case of epithelial cancers, on the conversion to a more migratory and invasive phenotype . We established that BCL-xL is critical for the induction by KRAS of the expression of stemness regulators and maintenance of a cancer initiating cell (CIC) phenotype. We reported that BCL-xL interacts with KRAS, resulting in its stabilization and full activation in breast cancer cell models. The molecular mechanisms underlying this functional cooperation remain to be characterized. As BCL-xL favours the activity of constitutively GTP-bound mutant KRAS and of wild type KRAS, a regulation at the level of GTP/GDP exchange is unlikely. KRAS activity is critically determined by post translational modifications leading to the anchoring of its hydrophobic C-terminal end in subcellular membranes. While KRAS molecules are mostly localized at the plasma membrane, they are subject to intracellular trafficking events with evidence of localization on the early/late endosomal or recycling endosomal pathways (Lu et al. 2009; K. Cho et al. 2012). KRAS was also reported to reside at mitochondria and at contact sites between mitochondria and the ER (Bivona et al. 2006; Sung et al. 2013). It is currently unclear how exactly this compartmentalization influences the duration and output of canonical and non-canonical KRAS signals.

To unravel which elements of the complex regulation of KRAS signaling are influenced by BCL-xL we sought to characterize changes in the intracellular context of the former upon modulation of the latter. We reasoned that assumption-free mapping of endogenous proteins in the vicinity of KRAS in a cellular context expressing BCL-xL or not would be highly informative in this context. We thus

developed a site restricted enzymatic tagging approach using KRAS as a bait introduced in CRISPR edited breast cancer cells to identify KRAS proximal proteins by quantitative proteomic analysis. Our results put forth that the cooperation between KRAS and BCL-xL stems from the latter's ability to antagonize a previously unforeseen tumor suppressive effect of the former, related to interference with mitochondrial scaffolding.

RESULTS

A unbiased proteomic approach reveals a major impact of BCL-xL on KRAS proximitome.

BCL-xL influence on KRAS signaling may stem from the ability of the former to influence elements of the intracellular context which are critically required for the latter to sustain downstream signaling (and maintain protein expression levels). To gain insight into these, we used a KRAS construct fused at its N-terminal end with APEX, an ascorbate peroxidase derivative relying on hydrogen peroxide for catalyzing the oxidation of biotin-phenol to a short-lived and reactive biotin-phenol free radical which reacts with electron-rich amino acids on neighboring proteins resulting in their biotinylation (S.-Y. Lee et al. 2016). KRAS proximitomes were identified by quantitative mass spectrometric analysis of endogenous proteins specifically present in streptavidin pull downs following transient transfection of the APEX-KRAS bait in MCF-7 cells, APEX enzymatic activation by treatment of resulting cells with H₂O₂ (1 min), in the presence of biotin-phenol, prior to cell lysis (Figure 1A). We used MCF-7 cells as these cells showed optimal transfection under the conditions used (80% of cells positive for YFP fluorescence following transfection with YFP-KRAS), and since we established that BCL-xL interferes with KRAS signaling in this context (Carné Trécesson et al. 2017). To investigate the influence of BCL-xL on KRAS proximitome, we performed experiments using MCF-7 where BCL-xL was deleted by CRISPR/CAS9, together with control cells. As shown in Supplementary Figure 1, BCL-xL deleted MCF-7 showed enhanced sensitivity to cytochrome c release induction (as judged by flow cytometry) by treatment with the MCL-1 antagonist S63845. This indicates that endogenous BCL-xL exerts in these cells its canonical function to preserve MOMP together with its complementary homolog MCL-1. Further validating our deletion strategy, BCL-xL deleted cells proved unable to transmit signals from transiently transfected KRAS (as judged by phosphorylation of ERK) at baseline or in response to EGF, even when comparable amounts of YFP-KRAS were obtained by the transduction procedure (Figure 1B).

To characterize the BCL-xL dependent KRAS proximitome, we performed four independent transient transfection assays in two distinct cell contexts (BCL-xL proficient or deficient). Resulting cells were treated with H₂O₂ for one minute or left untreated to provide for each context four pairs of tests with their matched negative controls. The presence of a bit more than 3 400 proteins was quantified in each of the 16 assays. Proteins were dubbed as being specifically part of the KRAS proximitome when following one of these three criteria:

- i) their presence was detected in four positive tests compared to none or only one in the negative controls
- ii) their presence was detected in three positive tests compared to none in the negative control
- iii) if they were quantified at significantly higher levels in the tests compared to the negative control by Volcano plot analysis (Figure 1C)

In a last step, we deleted from the two KRAS proximitome lists protein members of the “crapome” (Mellacheruvu et al. 2013), as the promiscuous ability of the latter to be pulled down by numerous baits renders their identification as KRAS proximal proteins by our approach doubtful.

As a result, we identified 150 proteins specifically present in the vicinity of KRAS in control MCF-7 cells and 454 ones in BCL-xL deleted cells (Figure 1C). While 119 proteins were commonly found in each condition, 31 were specific for the control condition and 335 were specifically found in BCL-xL deficient cells (Figure 1D) indicating a major qualitative change in the proteomic context of KRAS when BCL-xL is absent. Gene ontology analysis indicated that proteins specifically found in the vicinity of the KRAS bait in BCL-xL deleted cells are enriched for proteins involved in the following processes: cell cycle, catabolism, transport of virus and cellular localization. Moreover, bait localization prediction by Gene Set enrichment analysis hinted on a preferential localization at the plasma membrane of the KRAS proximitome in control cells (as indicated by biotin labelling of E-cadherin, CDH1), and at nuclear membranes, early endosomes and mitochondria in BCL-xL deleted cells.

These qualitative modifications indicates that steady state localization of KRAS is modified upon BCL-xL loss. To test this, we used confocal microscopy to perform by immunofluorescence colocalization analysis of APEX-KRAS and biotinylated proteins, (following APEX activation). We reasoned that the localization of proteins which are closest to APEX-KRAS would reflect where, within the cell, KRAS molecules spend most of their time. As shown in Figure 1F, whereas this approach revealed a stable plasma membrane localization of APEX-KRAS in control cells, it revealed an intracellular localization for APEX-KRAS in BCL-xL deficient cells.

Figure 27 A unbiased proteomic approach reveals a major impact of BCL-xL on KRAS proximitome.

A Representation of APEX protocol analysis. APEX biotinylation reaction is induced by H₂O₂ addition in cell medium in MCF7 Empty CRISPR or in MCF7 BCL-xL CRISPR cell lines. To exclude non-specific partners, H₂O was added in parallel as a negative control. Biotinylated proteins were purified using streptavidin-coupled magnetic beads and detected by mass spectrometry (nanoLC-TIMS-TOF).

B Western Blot analysis of KRAS activity in MCF7 Empty CRISPR or in MCF7 BCL-xL CRISPR cell lines expressing YFP-KRAS. Representative of three independent experiments.

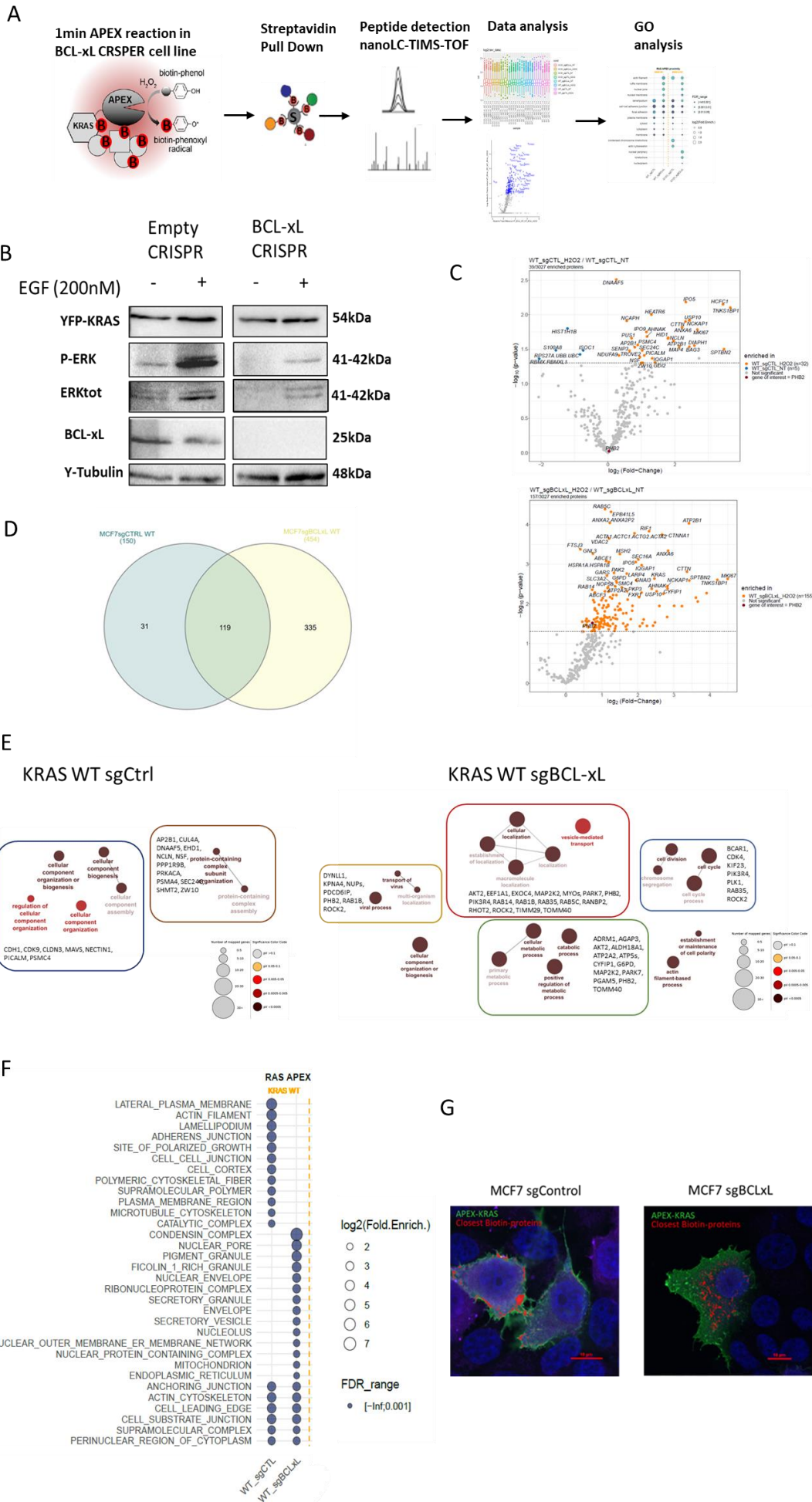
C Vulcano Plot visualization of selected proximitome in MCF7 Empty CRISPR or in MCF7 BCL-xL CRISPR cell lines after Fold-change analysis.

D Venn Diagram visualization of selected protein lists.

E ClueGo representation of Gene Ontology biological processes. For each cell line, only non-common partners were analysed using GO enrichment analysis.

F Comparative analysis of KRAS localization prediction. For each cell line, subcellular enrichment analysis with GSEA were performed on each specific protein list.

G Confocal microscopy in MCF7 Empty CRISPR or in MCF7 BCL-xL CRISPR cell lines after APEX-KRAS biotinylation reaction. APEX-KRAS is labeled in green through anti-Flag antibody, Biotinylated Proteins in DeepRed using Streptavidin coupled to Alexa647 and a colocalization analysis was performed using Nikon Software, represented in Red. Representative of three independent experiments.



Upon BCL-xL deletion, KRAS accumulates to mitochondria in the vicinity of PHB2

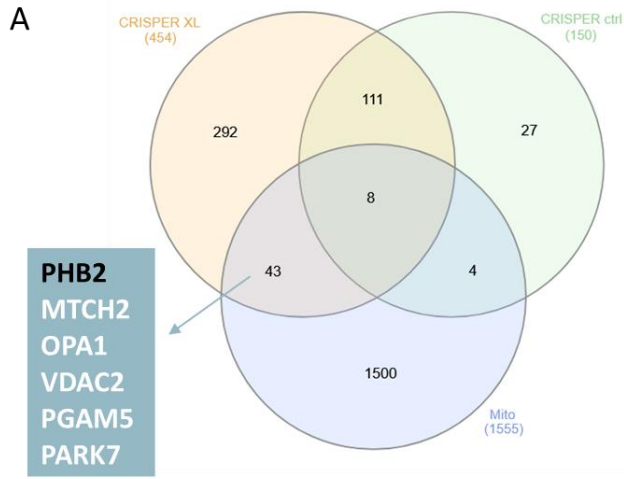
We focused on the enhanced mitochondrial localization of KRAS inferred by our proteomic approach. Indeed, 51 out of the 454 proteins characterized in the vicinity of KRAS in BCL-xL deleted cells are in the list of 1 555 proteins referenced as possible mitochondria residing ones (Morgenstern et al. 2017) as opposed to 12 proteins (out of 150) in control cells (Figure 2A left). This corresponds to a net enrichment in the proportion of mitochondrial proteins in the proximity of KRAS upon BCL-xL loss (Figure 2A, right). Enhanced localization of transiently transfected YFP-KRAS in BCL-xL deleted cells to mitochondria was consistent with its accumulation in heavy membrane fractions (where BCL-xL localizes in control cells, and marked by COX IV expression) obtained by subcellular fractionation assays (Figure 2B). These assays revealed that endogenous KRAS also accumulates at heavy membrane fractions in the absence of BCL-xL. To further confirm that KRAS exhibits an enhanced mitochondrial localization upon BCL-xL loss, we performed confocal microscopic analysis of transiently transfected cells and measured localization indexes between YFP-KRAS and mitotracker staining. Distance map analysis using Saito's method (Saito et Toriwaki 1994) was performed to calculate two channels-pixels proximity. This method revealed that KRAS was closer to mitochondria in BCL-xL deficient cells than in BCL-xL proficient cells (Figure 2C).

String database analysis of the 43 mitochondrial proteins that were specifically detected in the proximity of KRAS in BCL-xL deficient cells (Figure 2A left) revealed a group of proteins known to interact with each other and involved in mitochondrial scaffolding and function with a critical contribution of PHB2 (Supplementary Figure 2). Confocal microscopy analysis of the colocalization of biotinylated proteins, following APEX-KRAS transfection and APEX activation and of endogenous prohibitins was performed. This revealed enhanced vicinity between KRAS proximal proteins and prohibitins (potentially at subcellular membranes) upon BCL-xL loss (Figure 2D). This indicates that under these conditions the steady state localization of the KRAS bait is more frequently in the proximity of prohibitins. PHB2 seemed to us of particular interest in this study as we also specifically identified it following mass spectrometric analysis of YFP-BCL-xL immunoprecipitates from MCF-7 cells stably expressing this fusion protein (not shown), together with ATP5C1, ATP5L and VDAC2 (which were reported to interact with PHB2 and which are, akin to the latter, in the list of 43 KRAS proximal mitochondrial proteins identified in BCL-xL deficient cells). Candidate site restricted enzymatic tagging assays, based on western blot analysis of PHB2 in streptavidin pull downs from APEX-KRAS transfected YFP-BCL-xL or YFP expressing MCF-7 cells revealed that overexpressed YFP-BCL-xL prevents KRAS-PHB2 proximity. (Figure 2E).

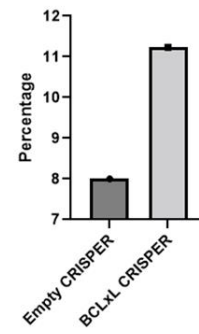
Figure 28 Upon BCL-xL deletion, KRAS accumulates to mitochondria in the vicinity of PHB2

- A** Venn Diagram of KRAS proximitomes in both Empty CRISPR and BCL-xL CRISPR cell lines with known mitochondrial proteins. Proportion of mitochondrial proteins in each list is represented as an histogram
- B** Western Blot analysis of Light (L) or Heavy (H) fractions after digitonin extraction in MCF7 Empty CRISPR or in MCF7 BCL-xL CRISPR cell lines expressing YFP-KRAS. Representative of three independent experiments.
- C** Confocal microscopy in MCF7 Empty CRISPR or in MCF7 BCL-xL CRISPR cell lines expressing YFP-KRAS. YFP-KRAS (green), Rab5 (Red) and Mitotracker (DeepRed). Distance Map analysis of KRAS distance from Mitotracker. Representative of three independent experiments.
- D** Confocal Microscopy in MCF7 Empty CRISPR and MCF7 BCL-xL CRISPR cell lines after APEX-KRAS biotinylation reaction. Biotinylated proteins (DeepRed), Colocalization of Biotinylated proteins and PHB2 (Red) using Nikon software. Representative of three independent experiments..
- E** Western Blot analysis of biotinylated proteins after APEX-KRAS biotinylation in cells over-expressing YFP-BCL-xL or YFP-BCL-xL. Representative of three independent experiments.

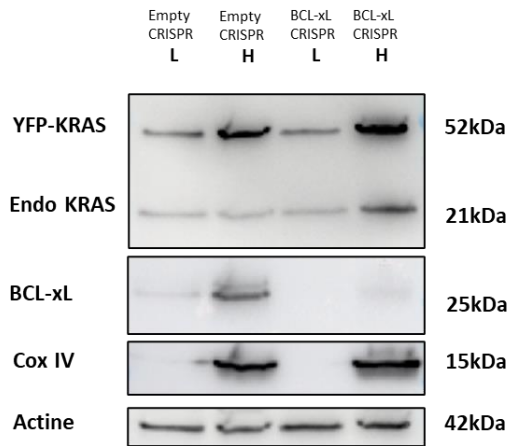
***: P value $<0,0001$



Proportion of Mitochondrial Proteins

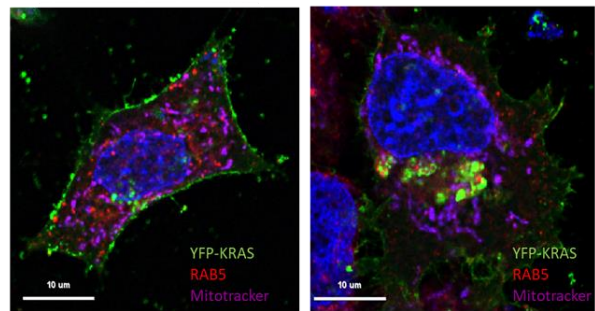


B

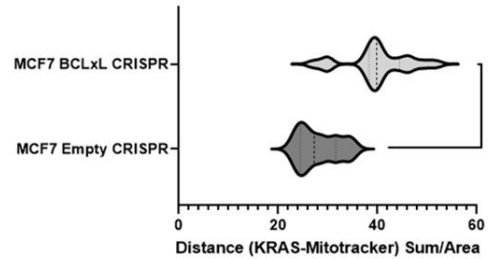


C

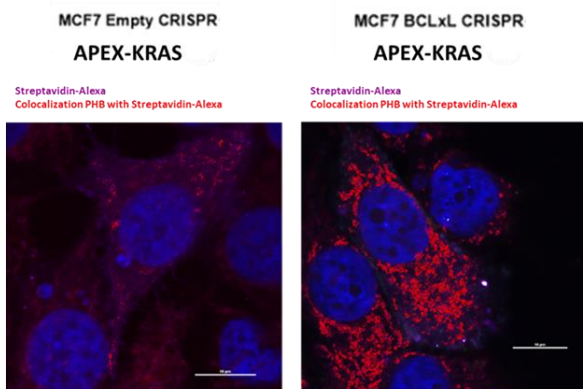
MCF7 Empty CRISPR MCF7 BCLxL CRISPR



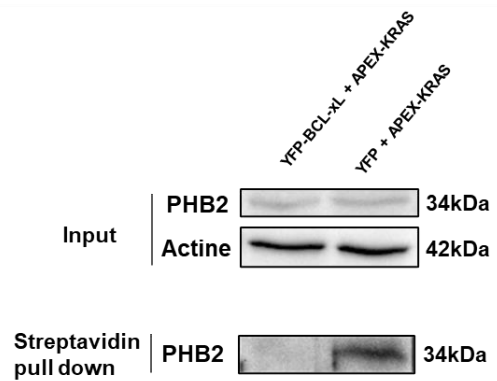
In KRAS expressing cells



D



E



BCL-x loss enhances the presence of KRAS at the interface between mitochondria and endosomes in a PHB2 dependent manner

Our detection of an enhanced proximity between RAB5 and KRAS upon BCL-xL loss in proteomic analysis led us to investigate KRAS contacts with endosomes further. Microscopic analysis revealed an increase of transiently transfected YFP-KRAS colocalization with RAB5 upon BCL-xL loss, as judged by an enhanced Pearson coefficient between YFP and RAB stainings in BCL-xL deleted cell populations. In sharp contrast, YFP-KRAS was not detected in the vicinity of the recycling endosome marker Rab11, regardless of BCL-xL expression (Figure 3A).

We inferred that the coincidence of KRAS localization at mitochondria and at endosomes in BCL-xL deleted cells might be due to enhanced contact between the two organelles as seen by triple staining for YFP-KRAS, Rab5 and Mitotracker (Figure 3B). Thorough measurement of RAB5-Mitotracker contacts in cell populations indicated that BCL-xL loss significantly increased them and that they were further, and dramatically, increased, upon YFP-KRAS expression in the absence of BCL-xL (Figure 3C).

We explored a role for PHB2 in KRAS contacts with mitochondria and endosomes. To do this, we downregulated its expression by siRNA in control and BCL-xL deficient cells, prior to a proximity labelling assay based on the transient transfection of APEX-KRAS. Western blot analysis in streptavidin pull downs for mtHSP70 expression revealed that KRAS proximity with this mitochondrial marker, which was enhanced in BCL-xL deleted cells, was decreased by PHB2 downregulation (Figure 3D). PHB2 downregulation also decreased the BCL-xL deletion sensitive proximity between KRAS and RAB5 (Figure 3D). Pharmacological modulation of prohibitins using Rocaglamide (Polier et al. 2012) recapitulated the effects of siPHB2 on KRAS presence in the vicinity of mtHSP70 and Rab5 (Figure 3D). Preliminary investigation, by distance mapping analysis of confocal microscopic images, of transiently transfected KRAS, endogenous RAB5 and TOM20 localizations confirmed that rocaglamide treatment antagonized the enhanced mitochondria to endosomes contacts (Figure 3E) as well as KRAS at mitochondria (Figure 3E). Taken together, these observations argue that KRAS interactions with PHB2 contribute to its localization to mitochondria, and that the latter is necessary for its recruitment in the vicinity of endosomal RAB5.

Figure 29 BCL-x loss enhances the presence of KRAS at the interface between mitochondria and endosomes in a PHB2 dependent manner

A Colocalization analysis of KRAS with the early endosomal marker Rab5 and with the recycling endosome marker Rab11. Pearson Coefficient was obtained using ICY software. N=200 cells per condition.

B Confocal microscopy in MCF7 Empty CRISPR or in MCF7 BCL-xL CRISPR cell lines expressing YFP-KRAS. YFP-KRAS (green), Rab5 (Red) and Mitotracker (DeepRed). Representative of three independent experiments.

C. Distance Map analysis of Rab5 distance from Mitotracker in MCF7 Empty CRISPR or in MCF7 BCL-xL CRISPR cell lines expressing or not YFP-KRAS . N=200 cells per condition.

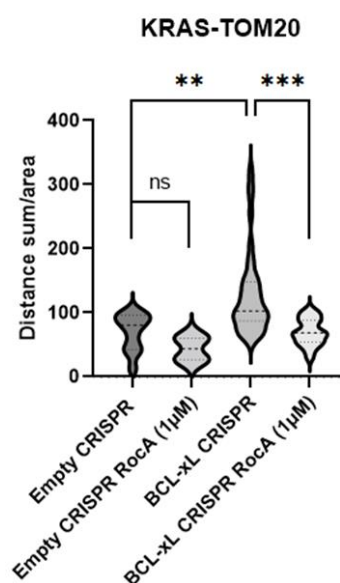
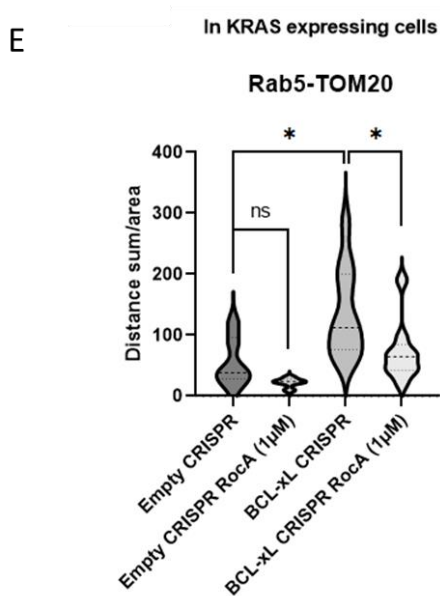
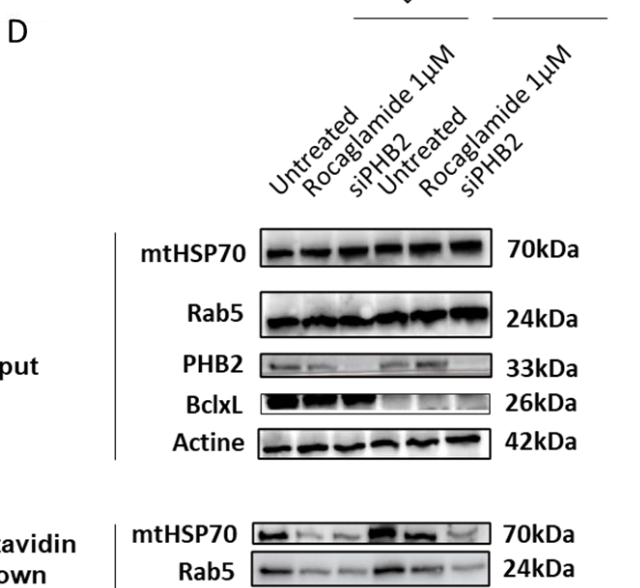
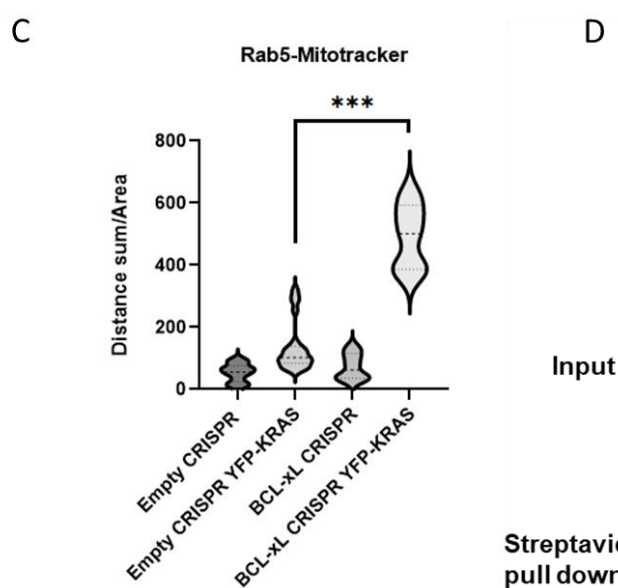
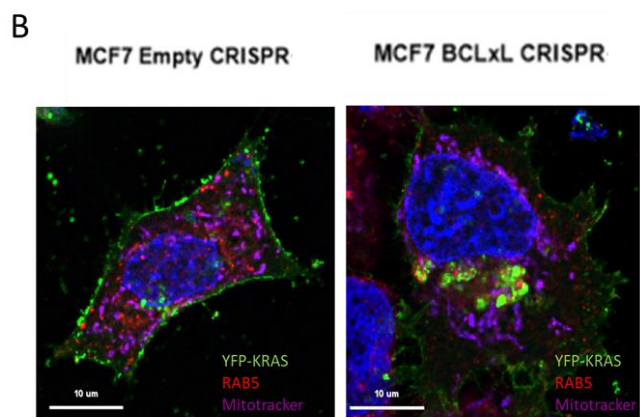
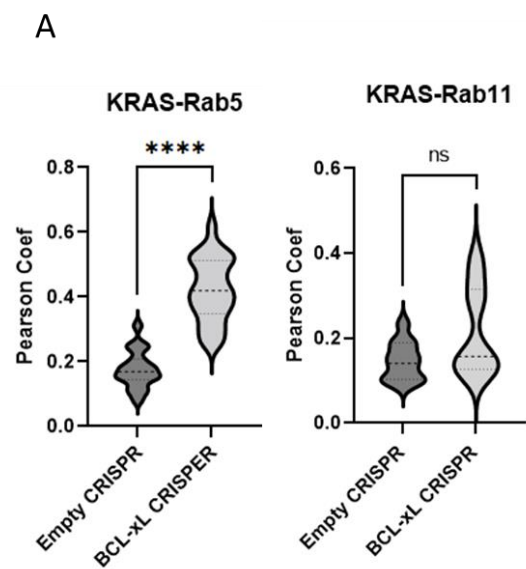
D Western Blot analysis of biotinylated proteins after APEX-KRAS biotinylation in MCF7 Empty CRISPR and MCF7 BCL-xL CRISPR and Streptavidin pull down. Representative of three independent experiments.

E Distance Map analysis of Rab5 and KRAS distance from the mitochondrial marker TOM20 in MCF7 Empty CRISPR and MCF7 BCL-xL CRISPR expressing YFP-KRAS and treated or not with 1 μ M Rocaglamide for 18h. N=50 cells per condition.

ns: P value > 0,05

***: P value < 0,0001

****: P value < 0,0001



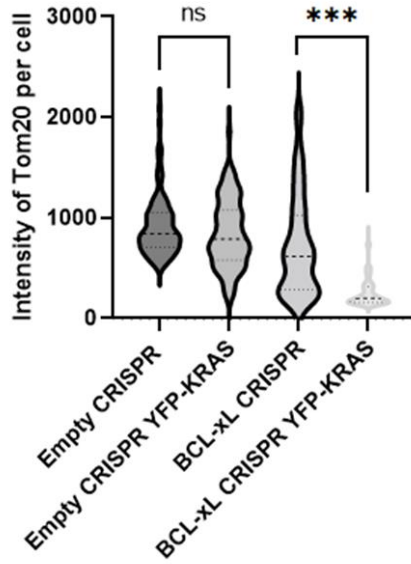
KRAS promotes PHB2 dependent mitochondrial clearance and increases mitovesicle production

Mitochondrial prohibitin complexes contribute to mitochondrial quality control. Moreover, a Rab5 endosomal pathway is involved in sensing mitochondrial stress (Hammerling et al. 2017). We thus hypothesized that the aforementioned observations result from some mitochondrial damage induced by KRAS. In contrast, evaluation of TOM20 staining intensity (as a readout of mitochondrial mass) indicated that KRAS expression slightly decreased it in control cells, that BCL-xL deficiency by itself lead to the appearance of a subpopulation of cells with low TOM20 expression, and that KRAS expression in BCL-xL deficient had a major inhibitory effect on TOM20 expression (Figure 4A). FACS analysis of TOM20 expression under the same conditions led to a similar conclusion (Figure 4B). This argues that KRAS promotes BCL-xL sensitive mitochondrial clearance without inducing overt MOMP.

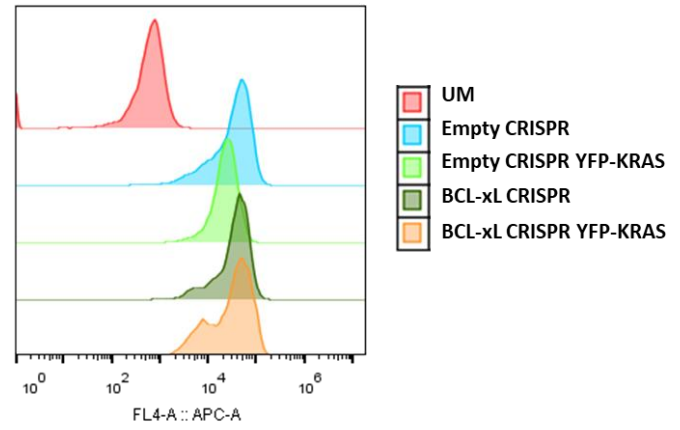
To investigate a role for prohibitins in KRAS induced loss of mitochondrial mass, we investigated TOM20 staining intensity in YFP-KRAS expressing BCL-xL proficient and deficient cells treated or not with rocaglamide. This prohibitin ligand induced TOM20 expression in BCL-xL deficient cells (Figure 4C). Interestingly, it also induced mitochondrial mass increase in KRAS expressing BCL-xL overexpressing cells, indicating that mitochondrial clearance is antagonized by BCL-xL, but that it can occur even in its presence. Consistent with this, cells overexpressing BCL-xL and transiently transfected with KRAS showed enhanced mitochondrial mass compared to KRAS transfected control cells (Figure 4D). To address the role for PHB2 by a genetic approach with confocal microscopy, we attempted to delete the PHB2 gene in control and BCL-xL deleted cells by CRISPR/CAS9 (to ensure that each analyzed cell is deleted). This deletion proved lethal to these cells in the long term and we thus could only investigate cells at early stages, setting aside for the analysis these with overt morphological damage. Consistent with the rocaglamide treatment results, investigation of healthy PHB2 deleted cells revealed their resistance to KRAS induced TOM20 decrease in the absence of BCL-xL (Figure 4E).

We failed to detect inclusion of mitochondria into lysosomes under the above conditions (not shown). We were also unable to detect proximity between YFP-KRAS and the late endosomal marker RAB7 by confocal microscopy. As inclusion of mitochondrial material in extracellular vesicles (EVs) is another pathway to outsource mitochondrial degradation, we explored whether KRAS would influence this process in a BCL-xL sensitive manner. To this end, BCL-xL proficient and deficient cells were transfected with YFP-KRAS or no transfection, and grown in EVs free medium for three days. EVs were then collected by differential centrifugation and submitted to a thorough investigation of their size and concentration (Supplementary Figure 3). EVs were of similar median diameter across conditions (approximately 200 nm) and concentrations were similar. Western blot analysis of EV protein content showed however major qualitative changes: while classical markers such as CD9 and ALIX were detected under all conditions, KRAS expression was associated with the presence of VDAC, TOM20 and PHB2 as well as KRAS itself, in EV fractions. Enhanced ratios of mitochondrial markers (normalized to CD9 and ALIX expression) and of KRAS were found in EVs produced by BCL-xL deficient cells (Figure 4F). Thus, KRAS promotes inclusion of mitochondrial proteins, and is coincidentally included, in EVs and endogenous BCL-xL antagonizes this effect.

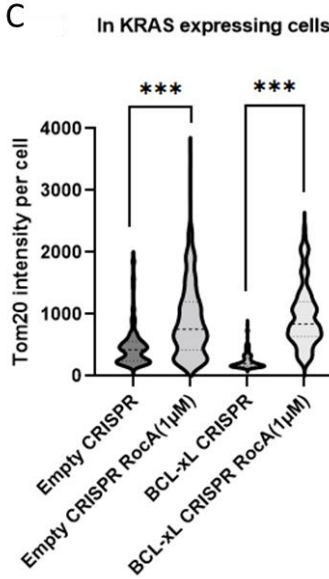
A



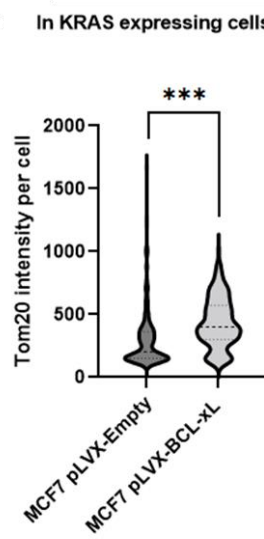
B



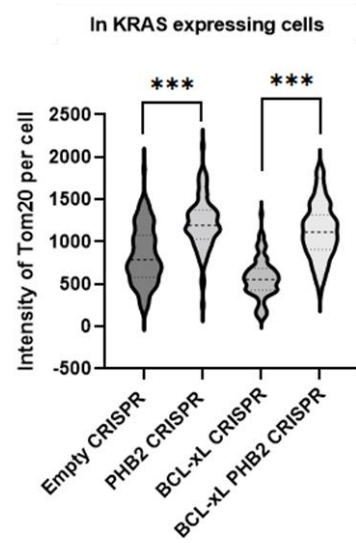
C



D



E



F

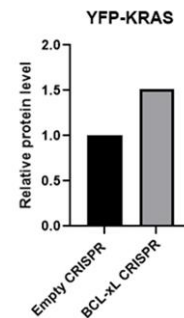
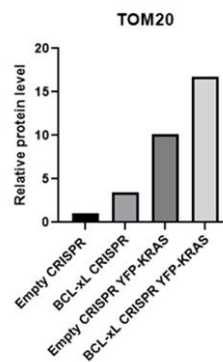
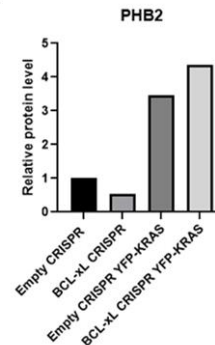
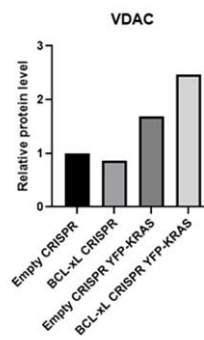
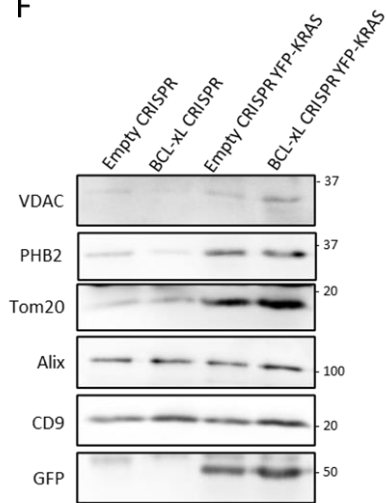


Figure 30 KRAS promotes PHB2 dependent mitochondrial clearance and increases mitovesicle production

A Confocal image analysis of TOM20 intensity per cell, obtained using ICY software, in MCF7 Empty CRISPR or in MCF7 BCL-xL CRISPR cell lines expressing or not YFP-KRAS. N=200 cells per condition.

B Mitochondrial Mass estimated by TOM20 fluorescent intensity measured by Flux Cytometry. Representative of three independent experiments.

C. Confocal image analysis of TOM20 intensity per cell, obtained using ICY software, in MCF7 Empty CRISPR or in MCF7 BCL-xL CRISPR cell lines expressing YFP-KRAS and treated or not 18h with 1 μ M of Rocaglamide. N=100 cells per condition.

D Confocal image analysis of TOM20 intensity per cell, obtained using ICY software, in MCF7 stably expressing pLVX-Empty or pLVX-BCL-xL cell lines expressing YFP-KRAS. N=200 cells per experiment.

E Confocal image analysis of TOM20 intensity per cell, obtained using ICY software, in MCF7 Empty CRISPR, MCF7 PHB2 CRISPR, MCF7 BCL-xL CRISPR or MCF7 double Knock Out BCL-xL and PHB2 CRISPR cell lines expressing YFP-KRAS. N=100 cells per condition.

F Western blot analysis of whole EVs content extracted by differential centrifugation in media after 3days of cell growth with MCF7 Empty CRISPR and MCF7 BCL-xL CRISPR expressing or not KRAS. Protein levels were normalized on ALIX/CD9 quantification. Representative of three independent experiments.

ns: P value > 0,05

***: P value < 0,0001

Discussion

In this work our investigation of the consequence of BCL-xL depletion on KRAS proximitome led us to unravel an influence of KRAS on mitochondria, with which it can directly interact. Preceding reports have established that KRAS4b can localize at this organelle upon phosphorylation of S181 within its polybasic region . This leads to a mitochondrial interaction with BCL-xL that promotes mitochondrial outer membrane permeabilization (Bivona et al. 2006). This favors also an interaction, presumably at contact sites between mitochondria and ER, with inositol triphosphate receptors (Sung et al. 2013) . Even if we detected biotinylation of ITPR3 following expression of APEX-KRAS in BCL-xL depleted MCF-7 cells, (data not shown), it should be noted that used KRAS4a does not harbor a phosphorylable S181 residue. In our study, moreover, KRAS mitochondrial localization occurs in the absence of BCL-xL, and not through a direct interaction with this protein, suggesting that the mechanism is different. The consequence of KRAS localization at the mitochondria in the absence of BCL-xL is also different from that reported in preceding studies as we detected a decrease in mitochondrial mass (as judged by TOM20 expression) but failed to detect MOMP triggering under these conditions (as judged by the maintenance of mitochondrial cytochrome c expression, data not shown). KRAS-4a was already described to interact in a depalmitoylation dependent manner with mitochondrial hexokinases and with VDAC (Amendola et al. 2019). Whether hexokinases are involved, and whether the mitochondrial localization of KRAS in our experiments coincided with a metabolic effect, remain to be characterized.

Mitochondrial proteins identified in the vicinity of KRAS upon BCL-xL-depletion present different sub-localizations, including outer membrane (TOMM40, MTCH2, VDAC2), inner membrane (PHB2, STOML2) and matrix (mtHSP70). This suggests profound rearrangements in the architecture of mitochondria under these conditions and is consistent with the eventual mitochondrial mass decrease observed. Mitochondrial damage under these conditions would explain induced proximity of KRAS and Rab5 at contacts sites between mitochondria and endosome as a Rab5 endosomal pathway is involved in sensing mitochondrial stress and promoting an adaptative response (Hammerling et al. 2017). Other BCL-xL dependent KRAS proximal proteins are known actors of mitochondrial quality control. PARK7 is a direct effector of autophagy (D.-H. Lee et al. 2018) while PHB2 was established to bind to the autophagosomal membrane-associated protein LC3 (MAPLC3) through an LC3-interaction region (LIR) domain and to play an essential role in Parkin dependent mitophagy by a PGAM5 dependent process (C. Yan et al. 2020, 2).

While our data strongly advocate that BCL-xL prevents KRAS from directly inducing mitochondrial dysfunction, linked to mitochondrial clearance, the exact mechanisms accounting for mitochondrial mass decrease upon KRAS expression remain to be determined. We used a model cell line that notoriously exhibits low PARKIN expression (J. Liu et al. 2017). However, a process similar to that through which mitochondrial Aurora Kinase A triggers mitophagy in a PARKIN independent yet PHB2/MAP1LC3B dependent manner might be involved (Bertolin et al. 2021). Our preliminary data do not support this hypothesis. Using the mitoTandem probe in BCL-xL depleted MCF-7 transiently transfected with KRAS (data not shown), we were unable to detect inclusion of mitochondria in lysosomes, which is a necessary

final step for mitochondrial degradation by (PARKIN dependent or independent) mitophagy or by the Rab5 endosomal pathway. We were also unable to detect MAP1LC3 in the proximity of KRAS in any of the conditions used. It should be noted that induction of autophagy by phosphorylated KRAS was found to be lost in BCL-xL knock out mouse embryonic fibroblasts (Sung et al. 2013). This is somehow consistent with the reported pro-autophagic role for BCL-xL in KRAS mutant colorectal cancer cells (Muriel Priault et al. 2010) and suggests that cells used in our study may not be fully equipped to target mitochondrial components to lysosomes. They are nevertheless able to promote mitochondrial clearance in response to mitochondrial dysfunction, as indicated by the decrease in TOM20 levels we could detect by flow cytometry upon mitochondrial potential collapse induced by CCCP (not shown).

Mitochondrial dysfunction also favors the production of extracellular vesicles (EVs) containing mitochondrial proteins (so called “mitovesicles”)(Phinney et al. 2015; D’Acunzo et al. 2021). There are differing reports about the identities of EV contained mitochondrial proteins but these include strikingly, some we identified as in contact with KRAS upon BCL-xL loss (PHB2, VDAC, mtHSP70, OPA1 in the KRASV12 proximitome). Extracellular vesicles produced by KRAS expressing cells show a BCL-xL sensitive enhancement in their content of mitochondrial proteins. It is thus tempting to speculate that extracellular vesicles contribute to outsource mitochondrial degradation upon KRAS induced mitochondrial stress. Current evidence indicate that Mitochondria derived vesicles (MDVs), which were reported to compensate for mitophagy defects (Towers et al. 2021) may be critical for the production of “mitovesicles” reviewed in (Amari et Germain 2021). The influence of KRAS and of BCL-xL on these vesicle needs further characterization, as does the characterization of the exact intracellular trafficking pathways involved and that of role played by endosomal Rab5. One interesting aspect here is the involvement of cytoskeleton dynamics, hinted by the induced proximity of KRAS with proteins involved in actin based processes , and in particular of ROCK2, which was already identified as a KRAS proximal protein (see Biogrid) and which regulates mitochondrial degradation (Moskal et al. 2020) possibly by regulating encapsulation of damaged mitochondria by F actin cages.

A stable relocation of KRAS to intracellular membranes upon BCL-xL loss may directly contribute to decrease its canonical signaling output. In the context of EGFR stimulation in particular, activation of downstream effectors critically occurs, indeed, at the plasma membrane (S. V. Surve et al. 2019). It is also plausible that the decrease in RAS activation is also fueled by a destabilization of intracellular KRAS expression. Consistent with this, we found by cytometry that YFP-KRAS tends to be expressed at lower levels in BCL-xL depleted cells (not shown). Our study puts forth the following hypothesis to account for this effect, which we already reported (Carné Trécesson et al. 2017): BCL-xL may not regulate baseline KRAS turnover, but BCL-xL would instead mitigate deleterious effects of KRAS on mitochondria, that would lead to a decrease of mitochondrial proteins together with KRAS itself (through mitochondrial damage induced degradation processes that may differ depending on cellular contexts). KRAS has already been described to be in extracellular vesicles, but our detection of its presence under the conditions of this study, coincidentally with that of mitochondrial proteins, advocate for a role, which requires to be established, of mitochondrial extracellular vesicles in decreasing intracellular KRAS levels, by externalization.

PHB2, which is found in the vicinity of KRAS, and which tightly colocalizes to APEX-KRAS biotinylated proteins, upon BCL-xL loss seems to play a central role in mitochondrial damage induced under these conditions. Indeed, its downregulation prevents proximity between KRAS and mtHSP70, with Rab5 and concomitantly prevents mitochondrial mass decrease. Mitochondrial prohibitins PHB and PHB2 belong to the stomatin/prohibitin/flotillin/HflKC (SPFH) family of membrane anchored proteins. In addition to the role for PHB2 as an actor of mitophagy mentioned above, PHB/PHB2 heterodimers play a key role in mitochondrial quality control through regulating mtDNA maintenance, protein synthesis and degradation, assembly of the OXPHOS complexes and maintenance of cristae structures reviewed in (Hernando-Rodríguez et al. 2018). PHB complexes have a rich interactome of intermembrane space proteins contributing to mitochondrial scaffolding and dynamics, and complex assembly critically relies on a coiled-coil region in PHB2 (Yoshinaka et al. 2019). KRAS may interfere with these complexes to promote mitochondrial dysfunction. We think that this occurs regardless of the GTP binding state of KRAS. Indeed, assumption free investigation of APEX-KRASV12 in BCL-xL proficient or deficient MCF-7 cells also revealed enhanced proximity between KRASV12 and PHB2 upon BCL-xL deletion (note that we observed enhanced proximity with OPA1, a known interactant of PHB2). Moreover, preliminary flow cytometric analysis indicates that transiently transfected KRASV12 induces a decrease in TOM20 expression and that it does so all the more as BCL-xL is depleted (not shown).

Even though the molecular basis for KRAS recruitment to mitochondrial PHB complexes remains elusive, it may be similar to that involved in its recruitment to PHB complexes at the plasma membrane, that positively regulate downstream oncogenic signaling (Rajalingam et al. 2005). This similarity is suggested by the fact that rocaglamide, which interferes with plasma membrane PHB (H. Yurugi et al. 2017) also prevents KRAS proximity with mtHSP70 and Rab5 in the absence of BCL-xL. This effect recalls the inhibitory effect of another PHB ligand, xanthohumol, on Aurora Kinase A induced mitochondrial degradation (Bertolin et al. 2021). This underscores that modulation of RAS activity by prohibitin targeting may have ambiguous effects: inhibition of canonical RAS signaling may be balanced by the inhibitory effects on RAS induced mitochondrial dysfunction. As BCL-xL expression limits the latter, one may assume that BCL-xL will critically determine the net biological effect of prohibitin targeting.

The fact that mitochondrial extracellular vesicles might contribute to the negative control over intracellular protein expression that BCL-xL preserves KRAS from forces us to refine our view of the KRAS/BCL-xL interplay. Indeed, if the direct consequence of BCL-xL loss and related KRAS intracellular relocalization is to decrease RAS activation and intracellular expression, it remains formally possible that EVs might promote horizontal transfer of KRAS proteins to recipient cells. This might participate to maintain RAS oncogenic signaling over cell populations even though this process seems to be poorly efficient (T. H. Lee et al. 2016). Moreover, a selection of the mitochondrial content that is packaged on the way to extracellular vesicles appears to take place, preventing externalization of pro-inflammatory mitochondrial content that could act as damage associated molecular patterns (Todkar et al. 2021). If BCL-xL prevents such a selective packaging under the

conditions of KRAS induced mitochondrial stress in breast cancer cells, it might contribute to maintain mitochondrial mass despite this stress, while in the same time maintaining an inflammatory phenotype known to contribute to breast cancer aggressiveness (Bakhoun et al. 2018). Reappraisal of comparative proteomic analysis of MCF10KRASV12 cells following down regulation of BCL-xL (Carné Trécesson et al. 2017) is consistent with this, as BCL-xL coincidentally decreases mitochondrial proteins and actors of interferon signaling (not shown).

A more general implication of our study is that malignant cells rely, to fully support oncogenic RAS signaling, on robust mitochondrial homeostatic programs. How BCL-xL participates to such programs remains to be determined, as neither MOMP nor autophagy seem to be patently triggered under our conditions . In MCF-7 cells possible interactants of BCL-xL, include pro-apoptotic proteins of the BCL-2 family and a group of outer membrane (VDAC2) and inner membrane proteins (ATP5 subunits, PHB2) reminiscent of PHB2 containing mitochondrial complexes (Yoshinaka et al. 2019) in addition to PHB2 itself. BCL-xL might participate to such complexes in a similar manner to MAVS, a protein involved in inflammatory signaling with a comparable outer membrane anchoring by a C-terminal end, and somehow contribute to their stability and maintenance function. The presence of BCL-xL in these mitochondrial scaffolds also implies that the latter might reciprocally influence the canonical function of the former. In agreement with this, targeting mitochondrial structure was shown to enhance sensitization to antagonists of the BCL-xL homolog BCL-2 (X. Chen et al. 2019).

Methods and Material

Cell culture and reagents

MCF7 cells lines were obtained from ATCC and modified through viral infection of pLentiCRISPR V2 plasmid (with or without a guide sequence) and puromycin or hygromycin selection. MCF-7 stably overexpressing YFP-BCL-xL or YFP were obtained by transfection with peYFP-BCL-xL and selection with G418. Cells were cultured in RPMI 1640 (Gibco, Fisherscientific) supplemented in 10% SVF (Eurobio), 1% Glutamin and 1% Penicillin/Streptomycin. Cells were grown at 37C° in 5% CO₂. For several experiments, including siRNA experiments, transfections were performed using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions. For siRNA experiments, ON-TARGETplus Human PHB2 siRNA was purchased from Dharmacon and 5nM was transfected per condition in 6-well plates. Cells were treated with 1µM of Rocaglamide (HY-19356, MedChemExpress) in cell medium.

CRISPR Guide sequences:

BCL-xL: 5'-CACCGGCAGACAGCCCCGCGGTGAA-3

PHB2: 5'-CACCGGGCCCGAATGTCATAGATAACAAA-3'

APEX Biotinylation assay

The APEX2 reaction was done under previously published conditions (Hung et al. 2014, 2). Cells expressing APEX-KRAS construct were incubated in culture medium supplemented in 250µM Biotin-tyramide (A8011, APEX-BIO) for 30min at 37C°. 2 mM H₂O₂ was added and incubated for 1 min at room temperature. The reaction was quenched by three washes with PBS supplemented in 5mM Trolox (238813, Sigma Aldrich), 5mM of sodium ascorbate (PHR1279, Sigma Aldrich) and 1mM Sodium azide (S2002, Sigma Aldrich). A last wash was performed with PBS and the cells were immediately lysed on the dish with 150µL of RIPA (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) containing a EDTA-free protease inhibitor cocktail tablet (A32965, ThermoScientific) and phosphatase inhibitor tablet (A32957, ThermoScientific). Cell lysates were dosed with Pierce BCA Protein Assay Kit and conserved at -80C°.

Pull Down assay

For Pull down assays, 250 to 1000ng of proteins from cell lysates were incubated with 30 to 100 µL of RIPA-equilibrated Pierce Streptavidin magnetic beads (88816, ThermoScientific) at 4C° overnight. Supernatants were conserved at -80C°. For western blot analysis, beads were washed three times in RIPA. Elution was performed by adding Laemli buffer supplemented with 2mM Biotin and heated at 95C° for 5min.

For AP-MS assays, beads were washed twice with 1mL de RIPA, once with 1mL de KCL (1M), once with 1mL de Na₂CO₃ (0,1M), once with 1mL Urea (2M) diluted in Tris-HCl pH 8 (10mM) than once with TrisHCl pH7,5, NaCl 150mM, EDTA 1mM. Elution was performed by adding Laemli buffer supplemented with 2mM Biotin and heated at 95C° for 5min. 10% of the eluted sample were analysed by western blotting for sample validation.

Immunoblot analysis

Cells were resuspended in RIPA lysis buffer. For western blotting, following SDS-PAGE, proteins were transferred to 0.45 µM nitrocellulose membranes using Trans-BlotR Turbo™ Transfer System Cell system (Bio-Rad). The membrane was then blocked in 5% nonfat dry milk TBS 0.05% Tween 20 and incubated with primary antibody overnight at 4°C. Blots were incubated with the appropriate secondary antibodies for 1 h at room temperature and visualized using the Chemi-Doc XRS+ system (Bio-Rad).

Immunocytochemistry

Cells were cultured on glass slides then fixed in PBS containing 4% paraformaldehyde and 4% sucrose for 15min. Cells were permeabilized for 5 min at room temperature in 0.25% Triton-X-100 in PBS, washed twice with PBS, and incubated for 30 min at 37°C in PBS containing 10% BSA. Cells were incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in PBS containing 3% BSA. After washing, cells were incubated for 90 min at room temperature with the appropriate Alexa-conjugated secondary antibodies diluted in PBS containing 3% BSA. Cells were washed with PBS and mounted with ProLong Diamond Antifade Reagent with DAPI (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Fluorescence images were acquired with Nikon A1 Rsi Inverted Confocal Microscope (Nikon, Tokyo, Japan) with NIS-Elements software (Nikon).

Flow Cytometry assay

Cells were trypsinated then washed once in PBS. Cells were the fixed and permeabilized using BioLegend's FOXP3 Fix/Perm Buffer (00-5523-00, Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions. Cells were then sustained with recombinant APC coupled Anti-TOMM20 antibody (ab225341, Abcam) for 1h at room temperature. Celles were then washed once with perm-buffer and once with PBS. Flow cytometry analysis was performed just after staining on an Accuri C6 flow cytometer (BD biosciences). Flow cytometry data were analysed using FlowJo software (BD Biosciences).

Extracellular vesicles extraction

Cells were cultured in devesiculated medium (centrifugated 16h at 100 000g) during 3 days. EVs were purified by differential centrifugation (300g for 5min , 2000g for 10min, 10 000g for 30min) then 2h at 100 000g. on a Beckman Coulter ultracentrifuge using SW-32 Ti rotor. Pellets were washed in PBS-0,22µm filtrated and a small fraction was extracted for VideoDrop (Meritics) analysis. Pellets were then re-centrifuged at 100 000g for 2h. The supernatants were aspirated and pellets resuspended in Laemli buffer for direct content analysis.

Data analysis

Immunocytochemistry data were analyzed using an unbiased automatized program for colocalization analysis (SODA) (Lagache et al. 2018) and distance map analysis (Saito et Toriwaki 1994) using ICY software (de Chaumont et al. 2012) (<https://icy.bioimageanalysis.org>). For Distance Map analysis, the distance between

two channels is converted to a shade of gray image. Cell per cell intensity is then calculated. More the distance is low between those two channels, more the intensity is high. The sum of intensity per cell is then relativised by the area.

Primary Antibodies

Recombinant Anti-Bcl-XL antibody – Monoclonal Rabbit – (ab31370) Abcam

Anti-Rab5 antibody - Early Endosome Marker- Polyclonal Rabbit -(ab18211) Abcam

Anti-PHB2 (E1Z5A) - Monoclonal Rabbit- (#14085) Cell Signaling

Recombinant Anti-TOMM20 antibody - Mitochondrial Marker – Monoclonal Mouse (ab186734) Abcam

mtHSP70 Antibody – Mouse Monoclonal - (MA3-028) Invitrogen

p44/42 MAPK (Erk1/2) Antibody – Rabbit Polyclonal - (#9102) Cell Signaling

Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (197G2) - Rabbit Monoclonal- (#4377) Cell Signaling

anti-Actin antibody – Mouse Monoclonal - (MAB1501) Millipore

Anti- β -Tubulin antibody - Mouse monoclonal - Sigma-Aldrich

Secondary Antibodies

Horseradish Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) – Jackson IR

Horseradish Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) – Jackson IR

Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 568 (A-11036, Thermo Scientific)

Goat anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ Plus 647 (A32728, Thermo Scientific)

Fluorescent probes

Streptavidin, Alexa Fluor™ 647 conjugate (S21374, Thermo Scientific)

MitoTracker™ Deep Red FM (M22426, Thermo Scientific)

References

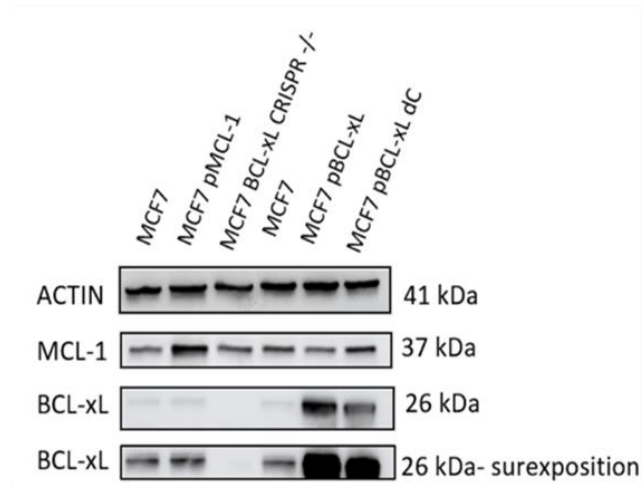
- Amari, L., and Germain, M. (2021). Mitochondrial Extracellular Vesicles - Origins and Roles. *Front. Mol. Neurosci.* *14*, 767219.
- Amendola, C.R., Mahaffey, J.P., Parker, S.J., Ahearn, I.M., Chen, W.-C., Zhou, M., Court, H., Shi, J., Mendoza, S.L., Morten, M., et al. (2019). KRAS4A Directly Regulates Hexokinase 1. *Nature* *576*, 482–486.
- Bertolin, G., Alves-Guerra, M.-C., Cheron, A., Burel, A., Prigent, C., Le Borgne, R., and Tramier, M. (2021). Mitochondrial Aurora kinase A induces mitophagy by interacting with MAP1LC3 and Prohibitin 2. *Life Sci. Alliance* *4*, e202000806.
- Bivona, T.G., Quatela, S.E., Bodemann, B.O., Ahearn, I.M., Soskis, M.J., Mor, A., Miura, J., Wiener, H.H., Wright, L., Saba, S.G., et al. (2006). PKC regulates a farnesyl-electrostatic switch on K-Ras that promotes its association with Bcl-XL on mitochondria and induces apoptosis. *Mol. Cell* *21*, 481–493.
- Braun, F., de Carné Trécesson, S., Bertin-Ciftci, J., and Juin, P. (2013). Protect and serve: Bcl-2 proteins as guardians and rulers of cancer cell survival. *Cell Cycle* *12*, 2937–2947.
- Carné Trécesson, S. de, Souazé, F., Basseville, A., Bernard, A.-C., Pécot, J., Lopez, J., Bessou, M., Sarosiek, K.A., Letai, A., Barillé-Nion, S., et al. (2017). BCL-XL directly modulates RAS signalling to favour cancer cell stemness. *Nat. Commun.* *8*, 1123.
- de Chaumont, F., Dallongeville, S., Chenouard, N., Hervé, N., Pop, S., Provoost, T., Meas-Yedid, V., Pankajakshan, P., Lecomte, T., Le Montagner, Y., et al. (2012). Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nat. Methods* *9*, 690–696.
- Cho, K., Park, J.-H., Piggott, A.M., Salim, A.A., Gorfe, A.A., Parton, R.G., Capon, R.J., Lacey, E., and Hancock, J.F. (2012). Staurosporines disrupt phosphatidylserine trafficking and mislocalize Ras proteins. *J. Biol. Chem.* *287*, 43573–43584.
- D'Acunzo, P., Pérez-González, R., Kim, Y., Hargash, T., Miller, C., Alldred, M.J., Erdjument-Bromage, H., Penikalapati, S.C., Pawlik, M., Saito, M., et al. (2021). Mitovesicles are a novel population of extracellular vesicles of mitochondrial origin altered in Down syndrome. *Sci. Adv.* *7*, eabe5085.
- Hammerling, B.C., Najor, R.H., Cortez, M.Q., Shires, S.E., Leon, L.J., Gonzalez, E.R., Boassa, D., Phan, S., Thor, A., Jimenez, R.E., et al. (2017). A Rab5 endosomal pathway mediates Parkin-dependent mitochondrial clearance. *Nat. Commun.* *8*, 14050.
- Hernando-Rodríguez, B., and Artal-Sanz, M. (2018). Mitochondrial Quality Control Mechanisms and the PHB (Prohibitin) Complex. *Cells* *7*, E238.
- Hung, V., Zou, P., Rhee, H.-W., Udeshi, N.D., Cracan, V., Svinkina, T., Carr, S.A., Mootha, V.K., and Ting, A.Y. (2014). Proteomic mapping of the human mitochondrial intermembrane space in live cells via ratiometric APEX tagging. *Mol. Cell* *55*, 332–341.
- Juin, P., Geneste, O., Gautier, F., Depil, S., and Campone, M. (2013). Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells. *Nat. Rev. Cancer* *13*, 455–465.

- Lagache, T., Grassart, A., Dallongeville, S., Faklaris, O., Sauvonnet, N., Dufour, A., Danglot, L., and Olivo-Marin, J.-C. (2018). Mapping molecular assemblies with fluorescence microscopy and object-based spatial statistics. *Nat. Commun.* *9*, 698.
- Lee, D.-H., Kim, D., Kim, S.T., Jeong, S., Kim, J.L., Shim, S.M., Heo, A.J., Song, X., Guo, Z.S., Bartlett, D.L., et al. (2018). PARK7 modulates autophagic proteolysis through binding to the N-terminally arginylated form of the molecular chaperone HSPA5. *Autophagy* *14*, 1870–1885.
- Lee, S.-Y., Kang, M.-G., Park, J.-S., Lee, G., Ting, A.Y., and Rhee, H.-W. (2016a). APEX Fingerprinting Reveals the Subcellular Localization of Proteins of Interest. *Cell Rep.* *15*, 1837–1847.
- Lee, T.H., Chennakrishnaiah, S., Meehan, B., Montermini, L., Garnier, D., D’Asti, E., Hou, W., Magnus, N., Gayden, T., Jabado, N., et al. (2016b). Barriers to horizontal cell transformation by extracellular vesicles containing oncogenic H-ras. *Oncotarget* *7*, 51991–52002.
- Liu, J., Zhang, C., Zhao, Y., Yue, X., Wu, H., Huang, S., Chen, J., Tomskey, K., Xie, H., Khella, C.A., et al. (2017). Parkin targets HIF-1 α for ubiquitination and degradation to inhibit breast tumor progression. *Nat. Commun.* *8*, 1823.
- Lu, A., Tebar, F., Alvarez-Moya, B., López-Alcalá, C., Calvo, M., Enrich, C., Agell, N., Nakamura, T., Matsuda, M., and Bachs, O. (2009). A clathrin-dependent pathway leads to KRas signaling on late endosomes en route to lysosomes. *J. Cell Biol.* *184*, 863–879.
- Mellacheruvu, D., Wright, Z., Couzens, A.L., Lambert, J.-P., St-Denis, N., Li, T., Miteva, Y.V., Hauri, S., Sardi, M.E., Low, T.Y., et al. (2013). The CRAPome: a Contaminant Repository for Affinity Purification Mass Spectrometry Data. *Nat. Methods* *10*, 730–736.
- Morgenstern, M., Stiller, S.B., Lübbert, P., Peikert, C.D., Dannenmaier, S., Drepper, F., Weill, U., Höß, P., Feuerstein, R., Gebert, M., et al. (2017). Definition of a High-Confidence Mitochondrial Proteome at Quantitative Scale. *Cell Rep.* *19*, 2836–2852.
- Moskal, N., Riccio, V., Bashkurov, M., Taddese, R., Datti, A., Lewis, P.N., and Angus McQuibban, G. (2020). ROCK inhibitors upregulate the neuroprotective Parkin-mediated mitophagy pathway. *Nat. Commun.* *11*, 88.
- Phinney, D.G., Di Giuseppe, M., Njah, J., Sala, E., Shiva, S., St Croix, C.M., Stolz, D.B., Watkins, S.C., Di, Y.P., Leikauf, G.D., et al. (2015). Mesenchymal stem cells use extracellular vesicles to outsource mitophagy and shuttle microRNAs. *Nat. Commun.* *6*, 8472.
- Polier, G., Neumann, J., Thuaud, F., Ribeiro, N., Gelhaus, C., Schmidt, H., Giaisi, M., Köhler, R., Müller, W.W., Proksch, P., et al. (2012). The Natural Anticancer Compounds Rocaglamides Inhibit the Raf-MEK-ERK Pathway by Targeting Prohibitin 1 and 2. *Chem. Biol.* *19*, 1093–1104.
- Priault, M., Hue, E., Marhuenda, F., Pilet, P., Oliver, L., and Vallette, F.M. (2010). Differential dependence on Beclin 1 for the regulation of pro-survival autophagy by Bcl-2 and Bcl-xL in HCT116 colorectal cancer cells. *PLoS One* *5*, e8755.
- Rajalingam, K., Wunder, C., Brinkmann, V., Churin, Y., Hekman, M., Sievers, C., Rapp, U.R., and Rudel, T. (2005). Prohibitin is required for Ras-induced Raf-MEK-ERK activation and epithelial cell migration. *Nat. Cell Biol.* *7*, 837–843.

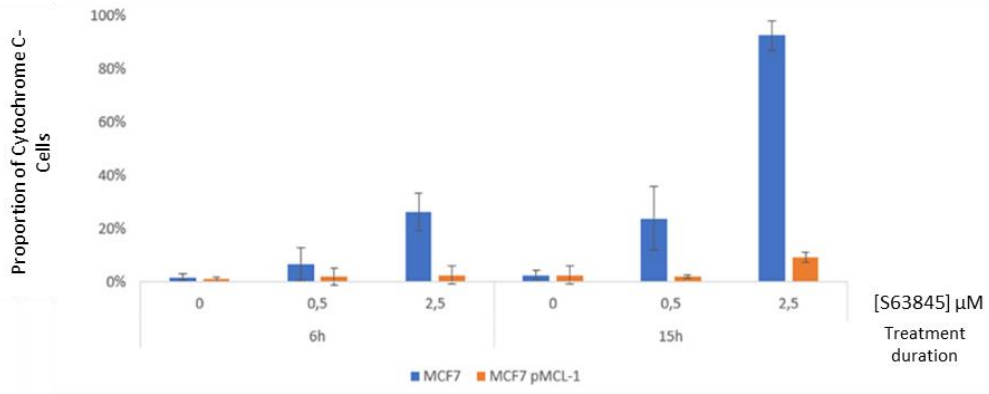
- Saito, T., and Toriwaki, J.-I. (1994). New algorithms for euclidean distance transformation of an n-dimensional digitized picture with applications. *Pattern Recognit.* 27, 1551–1565.
- Sung, P.J., Tsai, F.D., Vais, H., Court, H., Yang, J., Fehrenbacher, N., Foskett, J.K., and Philips, M.R. (2013). Phosphorylated K-Ras limits cell survival by blocking Bcl-xL sensitization of inositol trisphosphate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 20593–20598.
- Surve, S.V., Myers, P.J., Clayton, S.A., Watkins, S.C., Lazzara, M.J., and Sorkin, A. (2019). Localization dynamics of endogenous fluorescently labeled RAF1 in EGF-stimulated cells. *Mol. Biol. Cell* 30, 506–523.
- Todkar, K., Chikhi, L., Desjardins, V., El-Mortada, F., Pépin, G., and Germain, M. (2021). Selective packaging of mitochondrial proteins into extracellular vesicles prevents the release of mitochondrial DAMPs. *Nat. Commun.* 12, 1971.
- Towers, C.G., Wodetzki, D.K., Thorburn, J., Smith, K.R., Caino, M.C., and Thorburn, A. (2021). Mitochondrial-derived vesicles compensate for loss of LC3-mediated mitophagy. *Dev. Cell* 56, 2029-2042.e5.
- Wei, G., Margolin, A.A., Haery, L., Brown, E., Cucolo, L., Julian, B., Shehata, S., Kung, A.L., Beroukhi, R., and Golub, T.R. (2012). Chemical Genomics Identifies Small-Molecule MCL1 Repressors and BCL-xL as a Predictor of MCL1 Dependency. *Cancer Cell* 21, 547–562.
- Yan, C., Gong, L., Chen, L., Xu, M., Abou-Hamdan, H., Tang, M., Désaubry, L., and Song, Z. (2020). PHB2 (prohibitin 2) promotes PINK1-PRKN/Parkin-dependent mitophagy by the PARL-PGAM5-PINK1 axis. *Autophagy* 16, 419–434.
- Yoshinaka, T., Kosako, H., Yoshizumi, T., Furukawa, R., Hirano, Y., Kuge, O., Tamada, T., and Koshiba, T. (2019). Structural Basis of Mitochondrial Scaffolds by Prohibitin Complexes: Insight into a Role of the Coiled-Coil Region. *IScience* 19, 1065–1078.
- Yurugi, H., Marini, F., Weber, C., David, K., Zhao, Q., Binder, H., Désaubry, L., and Rajalingam, K. (2017). Targeting prohibitins with chemical ligands inhibits KRAS-mediated lung tumours. *Oncogene* 36, 4778–4789.

Supplementary Figure 1

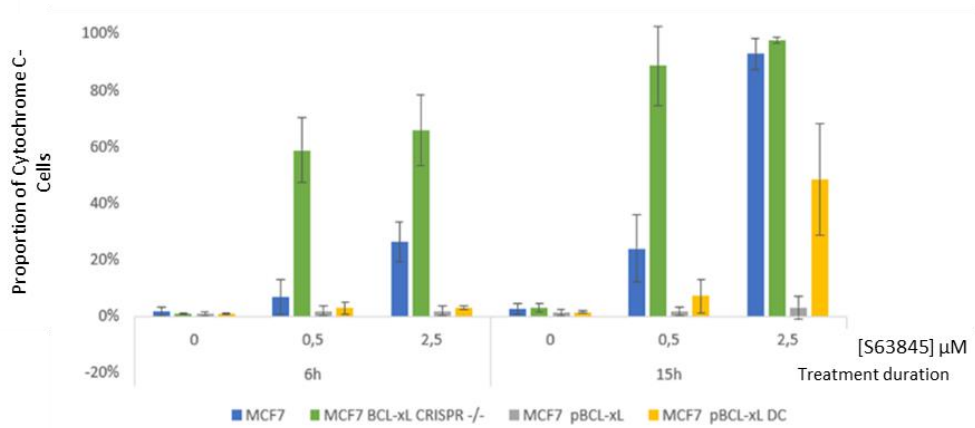
A



B



C



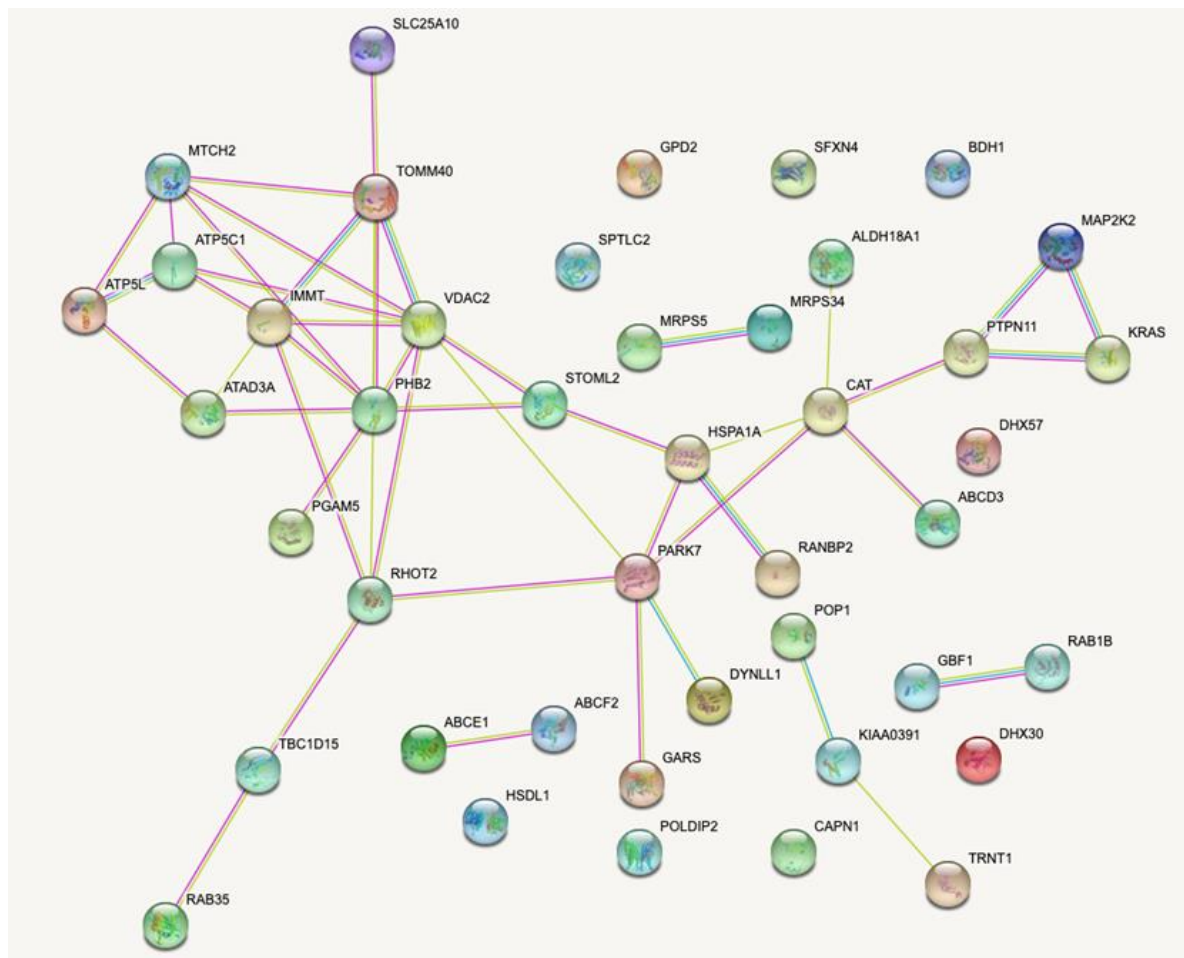
A Western blot analysis of BCL-xL and MCL-1 expression in MCF7, MCF7 pLVX-MCL-1, MCF7 BCL-xL CRISPR, MCF7pLVX-BCL-xL or MCF7pLVX-BCL-xL Δ C (C-terminal depleted BCL-xL, or BCL-xL Δ C) cell lines

B MOMP estimated by the proportion of cells harbouring Cytochrome C release measured by Flux Cytometry in the MCF7 and MCF7 pLVX-MCL-1. If MOMP is activated, Cytochrome-C is washed after cell permeabilization leaving a cell population with Cytochrome-C signal loss.

C. MOMP estimated by the proportion of cells harbouring Cytochrome C release measured by Flux Cytometry in the MCF7, MCF7 BCL-xL CRISPR, MCF7pLVX-BCL-xL or MCF7pLVX-BCL-xL Δ C cell lines. If MOMP is activated, Cytochrome-C is washed after cell permeabilization leaving a cell population with Cytochrome-C signal loss.

Supplementary Figure 2

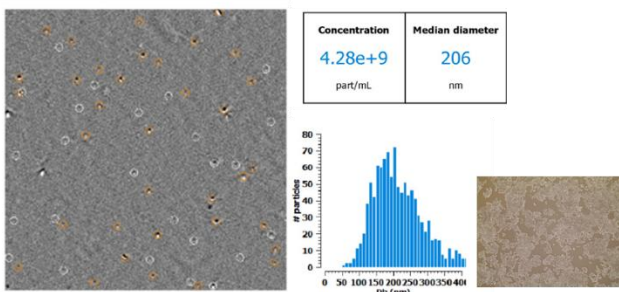
String Database analysis of the 43 mitochondrial APEX-KRAS proximitome in MCF7 BCL-xL CRISPR after Mass Spectrometry detection and Fold Change analysis



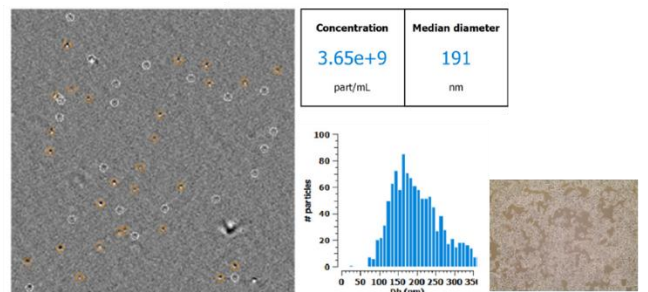
Supplementary Figure 3

Analysis of extracellular vesicles concentration and size in MCF7 Empty CRISPR and MCF7 BCL-xL CRISPR expressing or not YFP-KRAS using VideoDrop (Meritics) visualization and measurements.

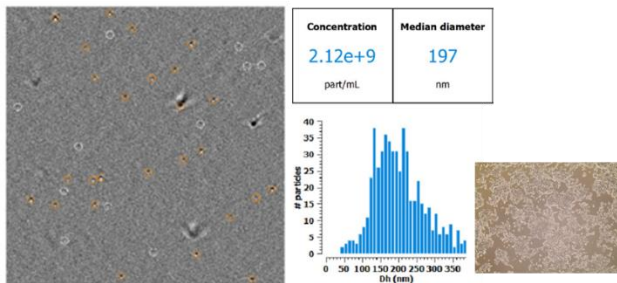
MCF7 Empty CRISPER



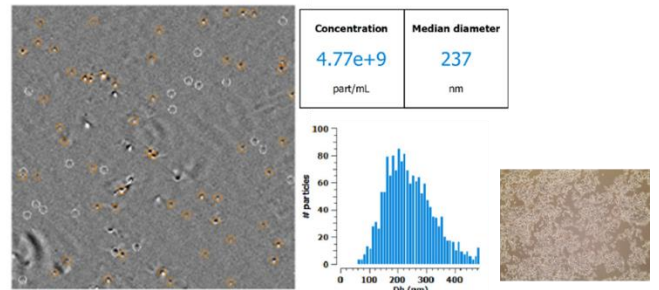
MCF7 BCL-xL CRISPER



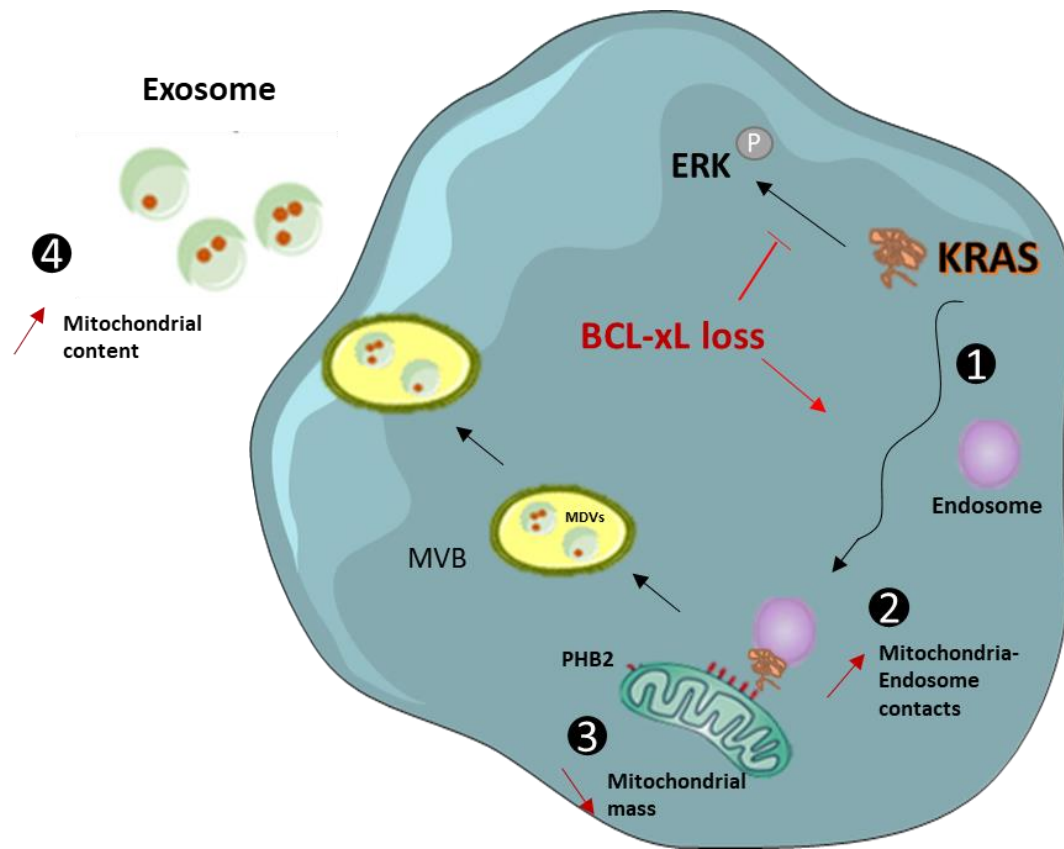
MCF7 Empty CRISPER
YFP-KRAS



MCF7 BCL-xL CRISPER
YFP-KRAS



Proposed Graphical abstract



Données annexes

L'une des forces de ce travail de thèse est d'avoir mis au point les méthodes APEX et BioID au sein de mon laboratoire. La mise au point de ces méthodes a constitué une part importante de l'effort technique de ce travail, tant d'un point de vue de la construction des différentes protéines recombinantes et de la validation de leur utilisation mais également dans l'optimisation des différentes méthodes biochimiques couplées au marquage de proximité à la biotine.

Données de validation

Au cours de ce travail de thèse de nombreuses séquences de protéines recombinantes ont été générées dans le but d'exprimer les protéines fusion suivantes : APEX-NES, APEX-ActA, APEX-Cytb5, APEX-BCLxL-ActA, APEX-BCLxL-Cytb5, APEX-BCLxL- Δ BH4, APEX-BCLxL Δ C (délétion du site d'ancrage aux membranes), APEX-BCLxL A221R (mutant du domaine C-terminal), APEX-KRAS WT, APEX-KRAS Δ XBD, APEX-KRAS K117A, APEX-KRASK128A, APEX-KRASG12V, APEX-2xFYVE, APEX-OMM, APEX-Lyn11, APEX-myc, BirA-BCL-xL.

Nous avons vérifié que l'ensemble de nos constructions sont fonctionnelles et que la fusion de l'APEX ne perturbe ni l'expression, ni la localisation, ni l'activité des protéines étudiées. Après transfection de nos différentes constructions dans des cellules tumorales mammaires de la lignée MCF7 et activation de l'APEX par du H₂O₂ nous avons mis en évidence que :

- les protéines fusionnées à l'APEX n'ont pas une localisation aberrante
- nos constructions sont exprimées par nos cellules
- la protéine APEX est fonctionnelle.

Un exemple ici avec les constructions APEX-OMM (ancrant la protéine APEX à la MOM) et APEX-2xFYVE (ancrant la protéine APEX à la membrane endosomale).

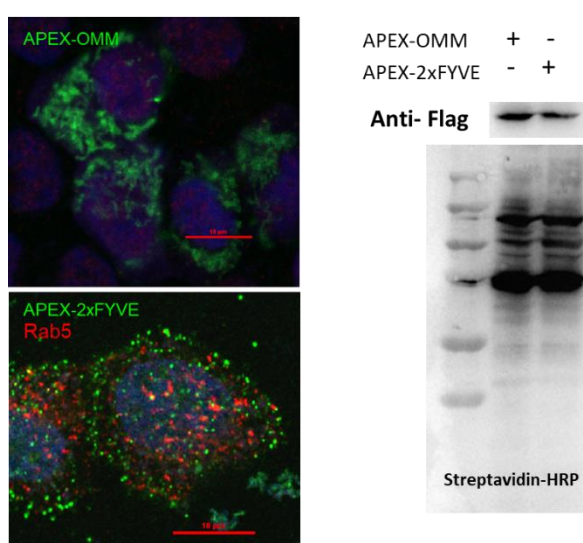


Figure 31 Validation des constructions APEX-OMM et APEX-2xFYVE

Nous avons également veillé à ce que les protéines fusionnées à l'APEX ne perdent pas leur activité canonique. A titre d'exemple ici, nous avons évalué la fonctionnalité de APEX-KRAS et de APEX-KRASG12V en analysant leur capacité à activer la voie de signalisation MAPK/ERK après activation de cette voie par l'EGF.

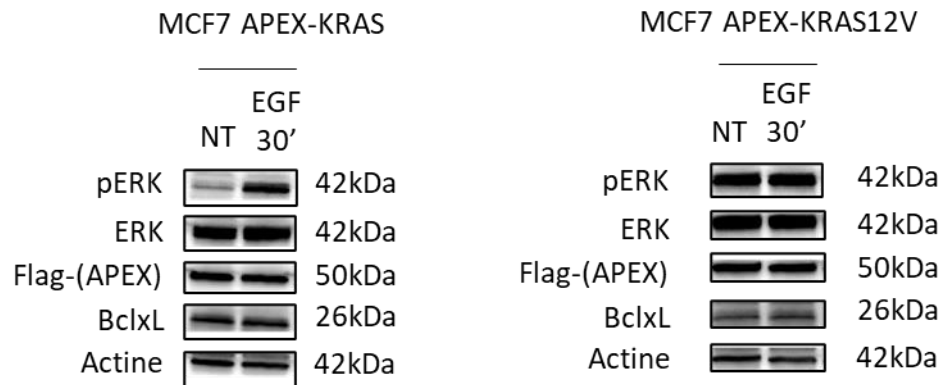


Figure 32 Activité de la voie MAPK-ERK dans la lignée MCF7 exprimant APEX-KRAS et APEX-KRASG12V

Nous avons particulièrement veillé à la qualité des échantillons envoyés en spectrométrie de masse. Pour cela, nous avons évalué que les protéines biotinylées étaient bien retenues sur les billes magnétiques couplées à la streptavidine. Pour cela, nous avons récupéré 10% de l'éluat après *pull down* et révélé par *western blot* l'ensemble des protéines biotinylées par échantillon.

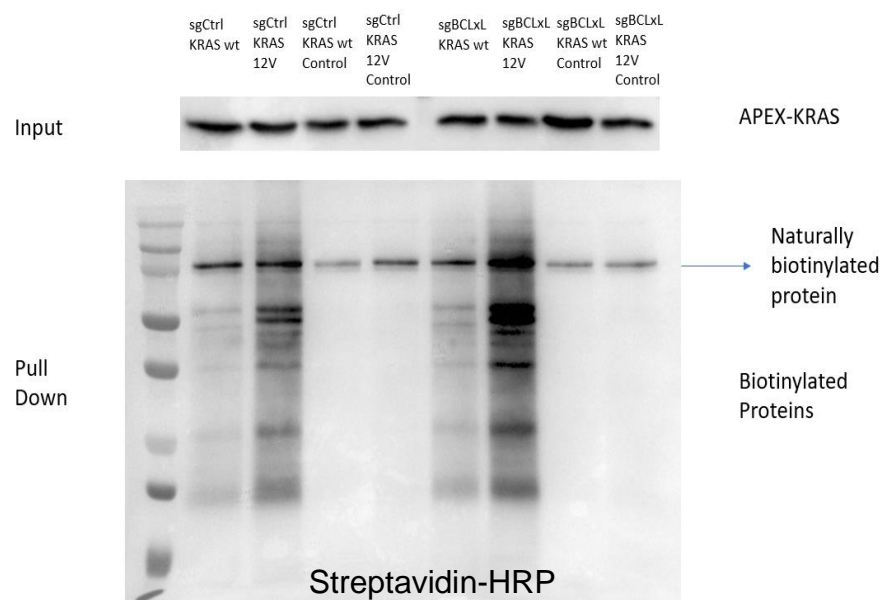


Figure 33 Validation du contenu en protéines biotinylées dans les échantillons envoyés en pour détection en spectrométrie de masse

Dans ce contexte, nous avons également évalué la qualité de nos quadruplicats. Afin de s'assurer que la quantité de protéines détectées par spectrométrie de masse ne soit pas plus forte ou plus faible dans un des réplicats, nous avons évalué la distribution de l'intensité de l'ensemble des protéines révélées par condition. Nous avons estimé nos quadruplicats comparables.

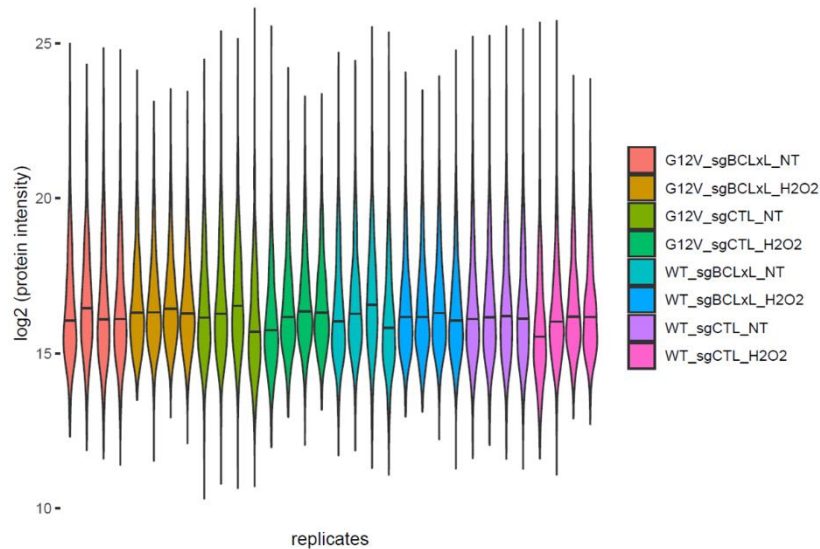
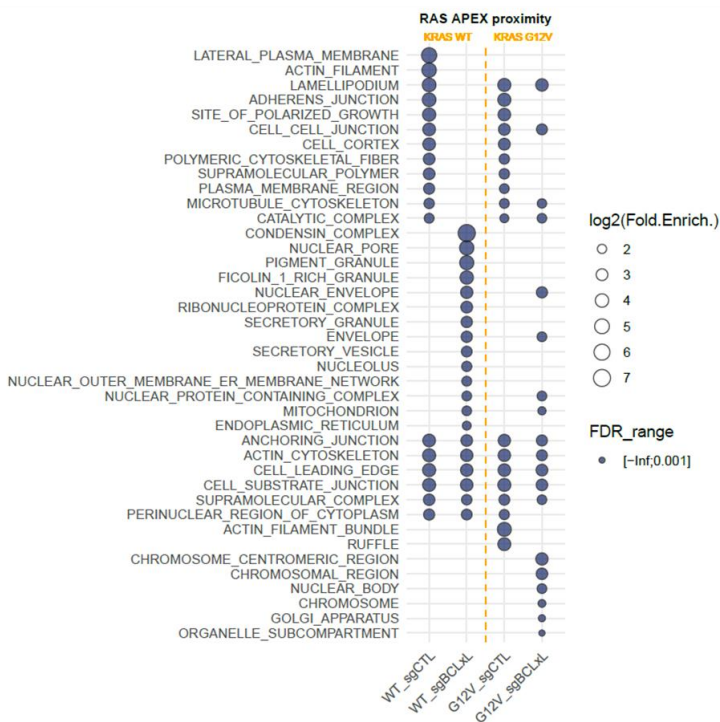


Figure 34 Distribution de l'intensité de l'ensemble des protéines détectées par spectrométrie de masse

Différences de l'influence de BCL-xL sur le proximitome de KRAS et de KRASG12V

Les résultats récoltés par l'analyse des données de spectrométrie de masse n'ont pas concerné uniquement KRAS mais également le mutant constitutivement actif KRASG12V. Ces résultats nous ont permis de faire une étude comparative de l'influence de la déplétion de BCL-xL sur les fonctions et les localisations préférentielles de ces deux formes de KRAS.

Localization



Biological processes

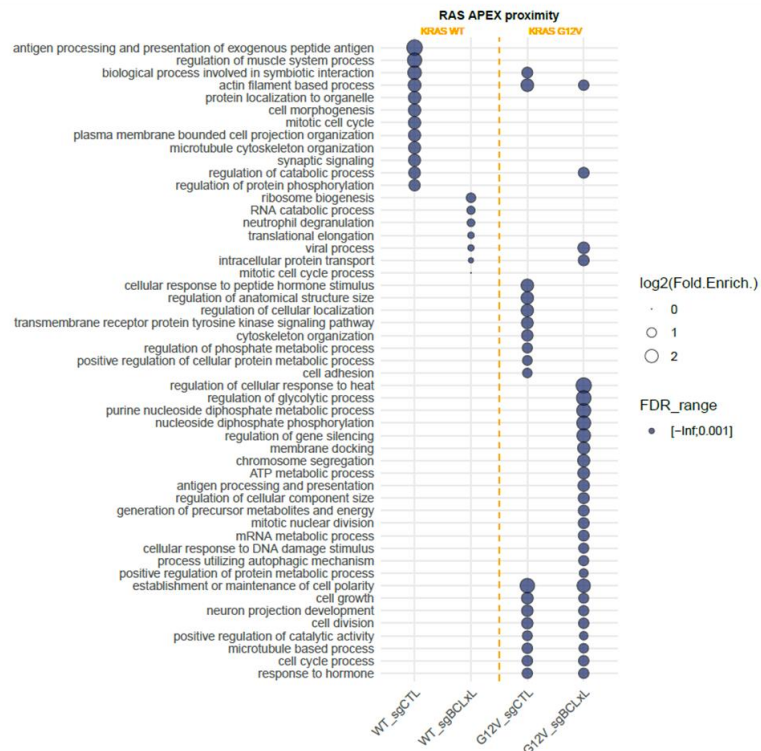


Figure 35 Comparatif de la prédiction des localisations et des fonctions de KRAS et de KRASG12V d'après l'analyse protéomique de leur proximitome dans les lignées cellulaires MCF7 exprimant ou non BCL-xL

Ces résultats mettent en valeur les différences entre la version sauvage de KRAS et le mutant ponctuel G12V, notamment quant à l'influence de BCL-xL sur chacune de ces protéines. Nous pouvons constater que la localisation mitochondriale de KRASG12V est également retrouvée enrichie dans les cellules déplétées en BCL-xL. Nous pouvons également noter que la fonction canonique de KRAS (RTK signaling pathway) est retrouvée sur-représentée dans la liste du proximitome de KRASG12V dans les cellules exprimant BCL-xL, ce qui coïncide avec les données préexistantes. Le fait que cette fonction ne soit pas retrouvée enrichie dans l'étude du proximitome de KRAS sauvage peut s'expliquer par le fait que son activité canonique n'est pas stimulée par l'ajout d'EGF. Le temps imparti n'a pas permis d'approfondir les différences existantes entre KRAS et KRASG12V au niveau basal d'une part ainsi que l'influence différentielle de BCL-xL sur ces deux formes de KRAS d'autre part. La liste des protéines proximales des différents isoformes de RAS mutés en G12V, obtenus par la méthode BioID, a récemment été publiée mais la comparaison des proximitomes de KRAS et KRASG12V ainsi que l'influence de BCL-xL nécessitent encore d'être exploitées, notamment dans le but d'améliorer le ciblage thérapeutique. (Adhikari et Counter 2018; Kovalski et al. 2019; Béganton et al. 2020; Adhikari et Counter 2021).

Interaction BCL-xL/KRAS

L'interaction entre BCL-xL et KRAS, mise en évidence dans plusieurs études, a notamment été caractérisée par notre équipe de recherche dans le travail de Sophie De Carné (Bivona et al. 2006; Sung et al. 2013; Carné Trécesson et al. 2017). Nous avons montré que cette interaction est dépendante du domaine BH4 de BCL-xL et qu'elle favorise l'activation optimale de la voie de signalisation KRAS. Nous avons également montré que cette interaction soutient la formation de cellules souches cancéreuses puisqu'elle participe à un *switch* transcriptomique et permet la formation de mammosphères. Le domaine de liaison de BCL-xL sur KRAS (appelé le domaine XBD pour *BCL-xL Binding Domain*) a également été étudié par notre équipe dans le but de développer un peptide inhibiteur de cette interaction.

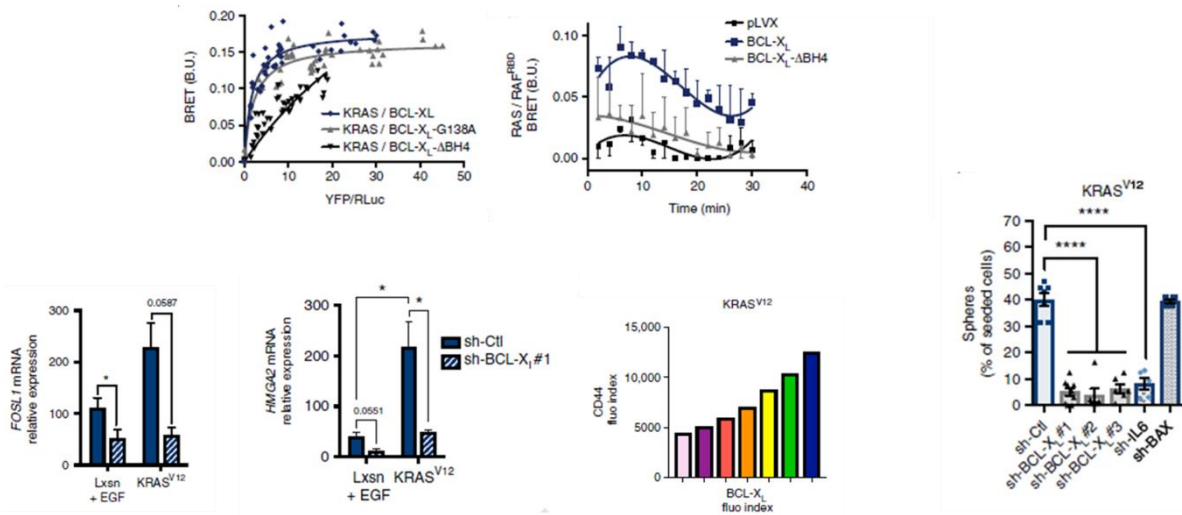


Figure 36 Caractérisation de l'interaction BCL-xL/KRAS (de Carné et al., 2017)

Une partie de mon travail de thèse s'est concentré sur cette interaction ainsi que sur l'étude d'un variant de KRAS déplété de son domaine de liaison à BCL-xL appelé KRAS Δ XBD. Nous avons mis en évidence par *pull down* après biotinylation par APEX-BCL-xL que l'interaction avec YFP-KRAS Δ XBD est déstabilisée par cette délétion.

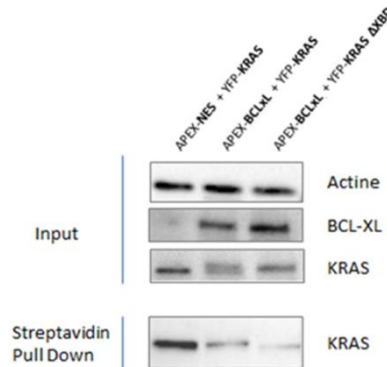


Figure 37 Interaction entre BCL-xL/KRAS et BCL-xL/KRAS Δ XBD par la méthode APEX

Cependant, nous avons observé que la délétion du domaine XBD de KRAS perturbe sa localisation. Bien que l'hypothèse que cette perturbation est due à la perte de sa capacité à interagir avec BCL-xL soit acceptable, il est également possible que, étant une petite protéine globulaire, la déplétion de ce domaine sur KRAS affecte particulièrement sa stabilité et sa localisation.

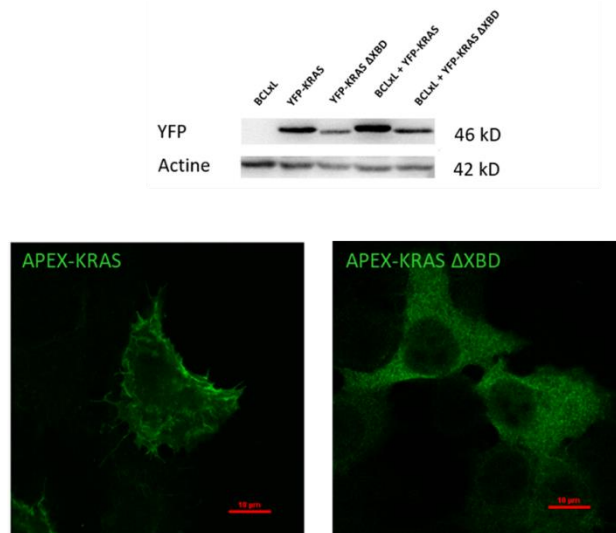


Figure 38 Stabilité de localisation de KRAS Δ XBD

Nous avons donc intensifié nos efforts sur la conception et la validation d'un peptide XBD-mimétique afin de cibler l'interaction BCL-xL/KRAS directement. Cependant, dans le temps imparti, nous n'avons pas pu obtenir un peptide fonctionnel.

Etude de la stabilité de KRAS dépendante de BCL-xL

Un autre versant de nos travaux nous ont mené à étudier la stabilité de KRAS dépendante de BCL-xL. En effet, nous avons publié antérieurement que, dans le fond cellulaire MCF10A, la stabilité de KRASG12V était influencée par BCL-xL (Carné Trécesson et al. 2017). De plus, un traitement par l'inhibiteur de la maturation des autophagosomes, la Bafilomycine A1 (10nM), ou un traitement par l'inhibiteur de la maturation des lysosomes, la Chloroquine (50 μ M), permet de restaurer la détection de KRASG12V par *western blot* dans des cellules déplétées en BCL-xL, ce qui n'est pas le cas pour le traitement par un inhibiteur du protéasome, le MG132 (3 μ M).

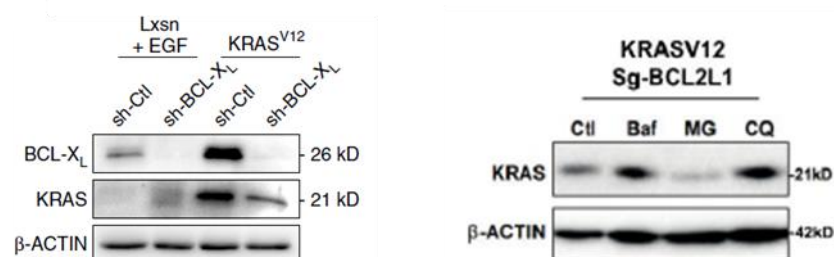


Figure 39 Stabilité de KRAS influencée par BCL-xL (De Carné et al., 2017)

Ces résultats tendent à montrer que BCL-xL, dans la lignée MCF10A, empêche la dégradation lysosome-dépendante de KRASG12V et de manière surprenante, l'inhibition du protéasome s'empêche pas la dégradation de KRAS. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les cellules souches cancéreuses présentent une activité protéasomale réduite, favorisant les voies de dégradation autophagiques et cette caractéristique est parfois employée comme un marqueur de cellules souches cancéreuses (Lenos et Vermeulen 2016). Nous avons donc évalué les conséquences de ces différents traitements, aux mêmes concentrations que précédemment, dans notre modèle cellulaire, les MCF7.

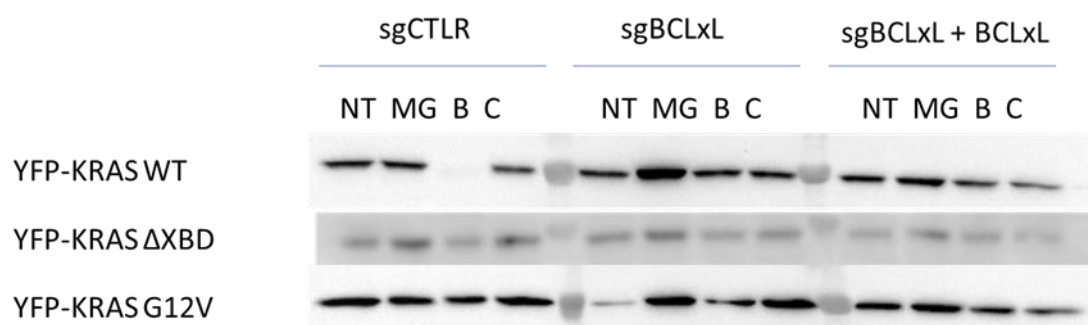


Figure 40 Stabilité de KRAS dépendant de BCL-xL dans la lignée MCF7

(La condition YFP-KRAS sous bafilomycine A1 a connu une erreur de manipulation, cette condition est donc à écarter du raisonnement)

Bien que dans notre modèle et sans traitement, l'expression de KRASG12V soit fortement impactée par la déplétion de BCL-xL, KRAS semble quant à elle peu impactée. D'autre part, le traitement par le MG132 nous indique que le *Knock Out* de BCL-xL favorise la dégradation de KRAS par un processus qui fait intervenir le protéasome. Ceci semble s'appliquer pour KRASwt et pour KRASG12V, uniquement ce dernier ayant ses niveaux d'expression stabilisés par la bafilomycine et la chloroquine également. Ces résultats sont cohérents avec la relocalisation de KRAS observée dans les cellules déplétées en BCL-xL, pouvant favoriser des interactions avec des E3-ligases différentes (tel que MARCH5 par exemple, rapprochement pouvant être médié par MTCH2) et/ou être entraîné avec le cycle de dégradation des mitochondries endommagées qui nécessite dans certains cas la participation du protéasome. D'autre part, les traitements perturbant la dégradation lysosomale de KRAS pourraient favoriser la production d'EVs et la sécrétion concomitante de KRAS. Les raisons rendant l'expression de KRASG12V sensible à la bafilomycine ou la chloroquine nécessite d'être mieux cernées. Ces informations nous ont conduits à élaborer plusieurs mutations ponctuelles sur des Lysines (résidus pouvant subir des ubiquitinations entraînant une dégradation protéasomale) au niveau du domaine XBD de KRAS. A l'heure actuelle, l'étude ces mutants n'a pas abouti mais elle reste centrale pour la compréhension des mécanismes de dépendance à BCL-xL des protéines KRAS et KRASG12V. Cependant, ces résultats nous ont également conduits à envisager une autre voie pouvant participer au *turn-over* de KRAS, la sécrétion à travers les vésicules extracellulaires.

Marquage des corps multivesiculaires

L'impact de BCL-xL sur le contenu (mitochondrial et en KRAS) des vésicules extracellulaires, notamment dans les cellules surexprimant KRAS, nous a mené à envisager la contribution des MVBs dans ces phénomènes. Nous avons donc choisi d'étudier la triple colocalisation d'un marqueur mitochondrial (mtHSP70), de YFP-KRAS et de CD63 (marqueur des MVBs) afin de visualiser la localisation des MVBs mais également si elles contiennent du matériel mitochondrial détectable. Nous observons une augmentation de ce triple marquage dans les cellules déplétées en BCL-xL. Cependant, il semble que l'expression de CD63 soit augmentée dans les cellules BCL-xL CRISPR. Ce phénomène n'est pas surprenant car quand une voie de sécrétion est activée, les cellules surexpriment ces acteurs. Il serait intéressant de regarder si ces phénomènes sont aussi observés dans les cellules ne surexprimant pas KRAS. Ce premier résultat nous conforte tout de même dans notre hypothèse mais ces expériences méritent d'être répétées. De plus, l'utilisation d'un autre marqueur semble nécessaire pour confirmer nos observations.

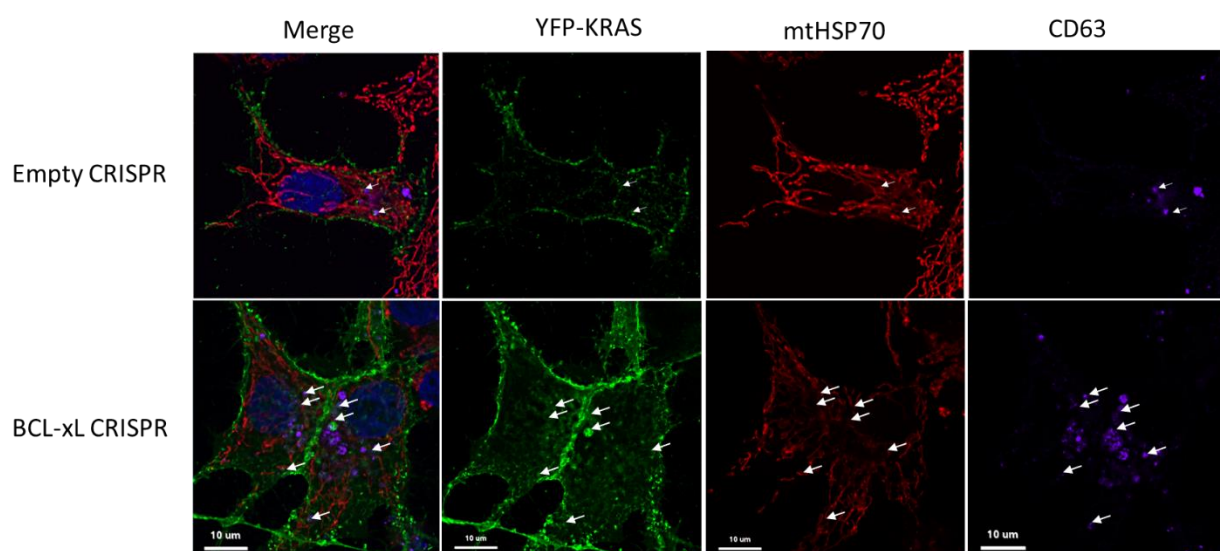


Figure 41 Marquage des MVBs dans des MFC7 déplétées ou non en BCL-xL et surexprimant KRAS

Les flèches indiquent les zones de triple colocalisation mtHSP70/KRAS/CD63. Image représentative de deux expériences indépendantes.

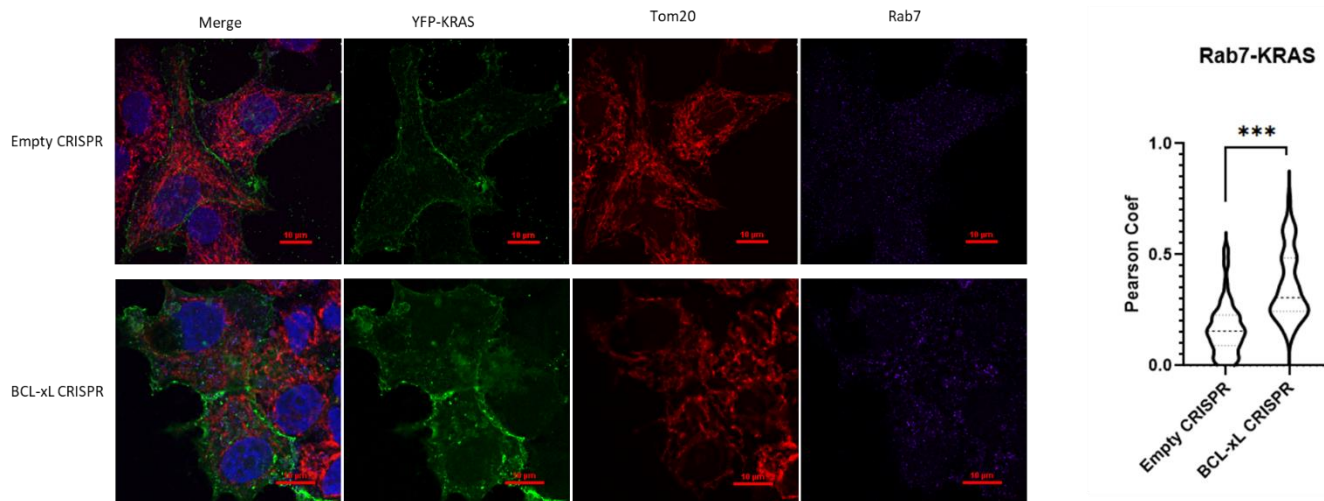


Figure 42 Etude de la colocalisation KRAS/Rab7

Image représentative de deux expériences indépendantes

Nous avons donc également évalué par co-marquage la colocalisation de KRAS avec le marqueur des LE/MVBs, Rab7. Les cellules BCL-xL CRISPR présentent plus de structures présentant un double marquage KRAS/Rab7, comme en témoigne le coefficient de colocalisation présenté. D'autre part, dans le proximitome de KRAS dans les cellules déplétées en BCL-xL l'on retrouve des acteurs clés de l'activation de cette protéine. Ces résultats confortent notre hypothèse, bien qu'il sera nécessaire de les reproduire afin qu'ils finissent, à terme, par figurer dans la dernière partie de l'article.

Les méthodes de marquage de proximité à la biotine pour caractériser l'affinité des interactions drogues-cibles

Une partie des résultats acquis s'est concentrée sur la validation de l'utilisation des méthodes APEX et BioID pour évaluer l'efficacité de différents BH3-mimétiques à rompre les interactions entre BCL-xL et différents « *BH3-only* » qui sont BIM, PUMA et tBID. Pour cela, nous avons purifié sur billes les protéines biotinylées par APEX-BCL-xL et investigué via une approche candidate que les « *BH3 only* » connus pour interagir avec BCL-xL se retrouvaient biotinylés en présence de divers BH3mimétiques. Le WEHI-539 et l'A1331852, tous deux des BH3-mimétiques entrant en compétition avec les pro-apoptotiques au niveau de la poche hydrophobe de BCL-xL, ont été évalués.

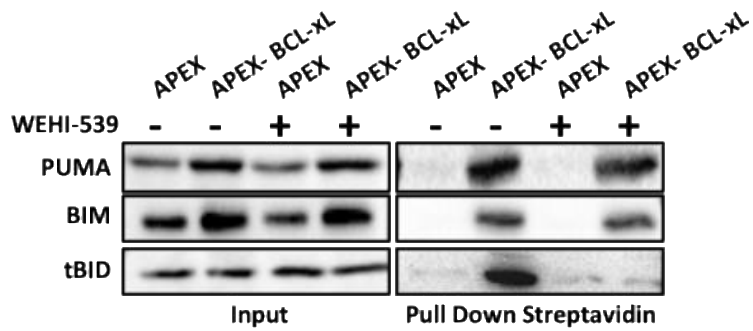


Figure 43 Analyse candidate des protéines biotinylées par APEX-BCL-xL

Les protéines « BH3-only » PUMA, BIM et tBID sont retenues sur la colonne d'affinité spécifiquement en présence de APEX-BCL-xL. Le complexe tBID/BCL-xL est inhibé par le traitement WEHI-539 (1mM), alors que les complexes PUMA/BCL-xL et BIM/BCL-xL sont résistants

Les méthodes APEX et BioID se sont révélés suffisamment sensibles pour étudier l'interactome spatio-dépendant de BCL-xL et ses variations sous traitement. Ces résultats feront l'objet d'un autre article traitant plus spécifiquement de la fonction canonique de BCL-xL. Ils confortent les observations par d'autres approches (tels que le BRET) qui mettent en avant une résistance des complexes intracellulaires entre BCL-xL et PUMA ou BIM aux BH3 mimétiques (contrastant avec la sensibilité de l'interaction BCL-xL/tBID).

Discussion des résultats

Nos travaux sur les conséquences de la déplétion de BCL-xL sur le proximitome de KRAS nous a conduit à découvrir une influence de KRAS sur les mitochondries, avec lesquelles KRAS peut interagir directement.

Différence entre KRAS4b et KRAS4a

Des rapports antérieurs ont établi que KRAS4b peut se localiser à la surface de cet organe après la phosphorylation du résidu sérine 181 se trouvant dans sa région polybasique. Cela conduit à une interaction mitochondriale avec BCL-xL qui favorise la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (Bivona et al. 2006). Cela favorise également une interaction, vraisemblablement aux sites de contact entre les mitochondries et le RE, avec les récepteurs de l'inositol triphosphate (Sung et al. 2013). Bien que nous ayons détecté la biotinylation de l'ITPR3 suite à l'expression et l'activation d'APEX-KRAS dans la lignée cellulaire MCF-7 dépourvue de BCL-xL, il faut noter que l'isoforme KRAS4a ne possède pas de résidu S181 phosphorylable. De plus, dans notre étude, la localisation mitochondriale de KRAS se produit en l'absence de BCL-xL, et non par une interaction directe avec cette protéine, ce qui suggère que le mécanisme impliqué est différent. La conséquence de la localisation de KRAS au niveau des mitochondries en l'absence de BCL-xL est également différente de celle rapportée dans les études précédentes puisque nous avons détecté une diminution de la masse mitochondriale (jugée par l'expression de TOM20). L'isoforme KRAS4a a quant à lui déjà été décrit comme interagissant d'une manière nécessitant sa dépalmitoylation avec les hexokinases mitochondriales et avec VDAC (Amendola et al. 2019). Il reste à caractériser si les hexokinases sont impliquées dans les phénomènes que nous avons observés, et si la localisation mitochondriale de KRAS coïncide avec un effet métabolique tel que la production de ROS d'origine mitochondriale ou une variation dans la consommation de glucose.

Localisations mitochondriales de KRAS

Les protéines mitochondriales identifiées à proximité de KRAS lors de la déplétion en BCL-xL présentent différentes sous-localisations, notamment la membrane externe (TOMM40, MTCH2, VDAC2), la membrane interne (PHB2, STOML2) et la matrice (mtHSP70). Cela suggère de profonds réarrangements dans l'architecture des mitochondries dans ces conditions et est cohérent avec l'éventuelle diminution de la masse mitochondriale observée. Dans ces conditions, les dommages mitochondriaux expliqueraient la proximité induite de KRAS et de Rab5 aux sites de contact entre les mitochondries et les endosomes, car une voie endosomale Rab5 est impliquée dans la détection du stress mitochondrial et la promotion d'une réponse adaptative (Hammerling et al. 2017). D'autres protéines proximales de KRAS dépendantes de BCL-xL sont des acteurs connus du contrôle qualité mitochondrial. PARK7 est un effecteur direct de l'autophagie (D.-H. Lee et al. 2018, 7) tandis qu'il a été établi que PHB2 se lie à la protéine LC3 (MAPLC3) associée à la membrane autophagosomique par l'intermédiaire d'un domaine LC3-interaction region (LIR) et joue un rôle essentiel dans la mitophagie dépendante de la Parkin par un processus faisant intervenir PGAM5 (C. Yan et al. 2020, 5).

Influence de KRAS sur la mitophagie

Si nos données plaident fortement en faveur du fait que BCL-xL empêche KRAS d'induire directement un dysfonctionnement mitochondrial, lié à une clairance mitochondriale, les mécanismes exacts expliquant la diminution de la masse mitochondriale lors de l'expression de KRAS restent à déterminer. Nous avons utilisé une lignée cellulaire modèle qui présente notoirement une faible expression de Parkin (J. Liu et al. 2017). Cependant, un processus similaire à celui par lequel l'Aurora Kinase A mitochondriale déclenche la mitophagie d'une manière indépendante de PARKIN mais dépendante de PHB2/MAP1LC3B pourrait être impliqué (Bertolin et al. 2021). Nos données préliminaires ne soutiennent pas cette hypothèse. En utilisant la sonde mitoTandem dans des MCF-7 dépourvues de BCL-xL et transfectées de façon transitoire avec KRAS, nous n'avons pas pu détecter l'inclusion de mitochondries dans les lysosomes, qui est une étape finale nécessaire pour la dégradation des mitochondries par mitophagie (dépendante ou indépendante de la Parkin) ou par la voie endosomale Rab5. Nous n'avons également pas détecté MAP1LC3 à proximité de KRAS dans notre analyse initiale. Il convient de noter que l'induction de l'autophagie par KRAS phosphorylé est perdue dans les fibroblastes embryonnaires de souris knock-out BCL-xL (Sung et al. 2013). Ceci est en quelque sorte cohérent avec le rôle pro-autophagique rapporté pour BCL-xL dans les cellules cancéreuses colorectales présentant une mutation activatrice sur KRAS (Muriel Priault et al. 2010) et suggère que les cellules utilisées dans notre étude ne sont peut-être pas entièrement équipées pour cibler les composants mitochondriaux vers les lysosomes. Elles sont néanmoins capables de promouvoir l'élimination mitochondriale en réponse à un dysfonctionnement mitochondrial, comme l'indique la diminution des niveaux de TOM20 que nous avons pu détecter par cytométrie de flux lors de l'effondrement du potentiel mitochondrial induit par le CCCP.

Externalisation de protéines mitochondriales induit par KRAS

Le dysfonctionnement des mitochondries favorise également la production de vésicules extracellulaires (EV) contenant des protéines mitochondriales (appelées "mitovesicules") (Phinney et al. 2015; D'Acunzo et al. 2021). Les rapports diffèrent quant à l'identité des protéines mitochondriales contenues dans les EV, mais celles-ci incluent, de manière frappante, certaines protéines que nous avons identifiées comme étant en contact avec KRAS lors de la perte de BCL-xL (PHB2, VDAC, mtHSP70 et OPA1 dans le proximitome de KRASG12V). Les vésicules extracellulaires produites par les cellules exprimant KRAS présentent une augmentation, sensible à l'extinction de BCL-xL, de leur contenu en protéines mitochondriales. Il est donc tentant de spéculer que les vésicules extracellulaires contribuent à externaliser la dégradation mitochondriale lors du stress mitochondrial induit par KRAS. Les preuves actuelles indiquent que les vésicules dérivées des mitochondries (MDV), qui ont été signalées pour compenser les défauts de la mitophagie (Towers et al. 2021), peuvent être essentielles pour la production de "mitovésicules" (Amari et Germain 2021). L'influence de KRAS et de BCL-xL sur ces vésicules nécessite une caractérisation plus approfondie, tout comme la caractérisation des voies exactes de trafic intracellulaire impliquées et celle du rôle joué par le Rab5 endosomal. Un aspect intéressant ici est l'implication de la dynamique du cytosquelette, suggérée par la proximité induite de KRAS avec des protéines impliquées dans les processus basés sur l'actine, et en particulier de ROCK2,

qui a déjà été identifiée comme une protéine proximale de KRAS (voir Biogrid) et qui régule la dégradation mitochondriale (Moskal et al. 2020).

Influence de BCL-xL sur la stabilité de KRAS

Une relocalisation stable de KRAS vers les membranes intracellulaires lors de la perte de BCL-xL peut contribuer directement à diminuer sa signalisation canonique. Dans le contexte de la stimulation de l'EGFR en particulier, l'activation des effecteurs en aval se produit au niveau de la membrane plasmique (S. V. Surve et al. 2019). Il est également plausible que la diminution de l'activation de KRAS soit également alimentée par une déstabilisation de son expression. En accord avec cette hypothèse, nous avons constaté par cytométrie que la protéine YFP-KRAS a tendance à être exprimée à des niveaux plus faibles dans les cellules déplétées en BCL-xL. Notre étude met en avant l'hypothèse suivante, que nous avons déjà rapporté (Carné Trécesson et al. 2017): BCL-xL pourrait ne pas réguler le *turn over* de base de KRAS, mais atténuerait plutôt les effets délétères de KRAS sur les mitochondries, ce qui conduirait à une diminution des protéines mitochondriales en même temps que KRAS lui-même (par des processus de dégradation induits par les dommages mitochondriaux pouvant différer selon les contextes cellulaires). KRAS a déjà été décrit dans des vésicules extracellulaires, mais notre détection de sa présence dans les conditions de cette étude, en même temps que celle des protéines mitochondriales, plaide pour un rôle des vésicules extracellulaires d'origine mitochondriale dans la diminution des niveaux intracellulaires de KRAS, par externalisation.

Rôle de PHB2

PHB2, qui se trouve à proximité de KRAS, est retrouvé étroitement colocalisé aux protéines biotinyllées par APEX-KRAS, lors de la perte de BCL-xL. Cette protéine semble jouer un rôle central dans les dommages mitochondriaux induits dans ces conditions. En effet, sa *down*-régulation empêche la proximité entre KRAS et mtHSP70, ainsi qu'avec Rab5 et empêche concomitamment la diminution de la masse mitochondriale. Les prohibitines mitochondriales PHB et PHB2 appartiennent à la famille des protéines ancrées dans la membrane, les stomatines/prohibitines/flotillines/HflKC (SPFH). En plus du rôle de PHB2 en tant qu'acteur de la mitophagie, les hétérodimères PHB/PHB2 jouent un rôle clé dans le contrôle de la qualité mitochondriale en régulant l'intégrité de l'ADNmt, la synthèse et la dégradation des protéines, l'assemblage des complexes OXPHOS et le maintien des structures des cristées (Hernando-Rodríguez et Artal-Sanz 2018). Les complexes PHB ont un interactome riche en protéines de l'espace inter-membranaire contribuant à l'échafaudage et à la dynamique mitochondriale et l'assemblage de ce complexe dépend de manière critique d'une région hélicoïdale dite *coiled-coiled* de PHB2 (Yoshinaka et al. 2019). KRAS pourrait interférer avec ces complexes pour favoriser le dysfonctionnement mitochondrial. Nous pensons que cela se produit indépendamment de l'état de liaison au GTP de KRAS. En effet, l'étude de l'APEX-KRASG12V dans des cellules MCF-7 déficientes en ou surexprimant BCL-xL a également révélé une proximité accrue entre KRASG12V et PHB2 lors de la délétion de BCL-xL (à noter que nous avons observé une proximité accrue avec OPA1, un interactant connu de PHB2). De plus, une analyse en cytométrie en flux préliminaire indique que KRASG12V transfecté transitoirement induit une diminution de l'expression de TOM20 et qu'il le fait d'autant plus que BCL-xL est déplacé.

Même si la base moléculaire du recrutement de KRAS dans les complexes PHB mitochondriaux reste insaisissable, elle pourrait être similaire à celle impliquée dans son recrutement dans les complexes PHB de la membrane plasmique, qui régulent positivement la signalisation oncogénique en aval (Rajalingam et al. 2005). Cette similarité est suggérée par le fait que le rocaglamide, qui interfère avec les PHB de la membrane plasmique (H. Yurugi et al. 2017) empêche également la proximité de KRAS avec mtHSP70 et Rab5 en l'absence de BCL-xL. Cet effet rappelle l'effet inhibiteur d'un autre ligand du PHB, le xanthohumol, sur la dégradation mitochondriale induite par l'Aurora Kinase A (Bertolin et al. 2021). Cela souligne que la modulation de l'activité de KRAS par le ciblage de la prohibitine peut avoir des effets ambigus : l'inhibition de la signalisation canonique de KRAS peut être contrebalancée par les effets inhibiteurs sur la dysfonction mitochondriale induite par KRAS. Comme l'expression de BCL-xL limite ce dernier, on peut supposer que BCL-xL déterminera de manière critique l'effet biologique net du ciblage de la prohibitine.

Conséquences biologiques de l'interaction BCL-xL/KRAS

Le fait que les vésicules extracellulaires mitochondriales puissent contribuer au contrôle négatif sur l'expression protéique intracellulaire dont BCL-xL préserve KRAS nous oblige à affiner notre vision de l'interaction KRAS/BCL-xL. En effet, si la conséquence directe de la perte de BCL-xL et de la relocalisation intracellulaire de KRAS qui en découle est de diminuer l'activation et l'expression intracellulaire de KRAS, il reste formellement possible que les EVs puissent favoriser le transfert horizontal des protéines KRAS vers les cellules réceptrices. Cela pourrait participer à maintenir la signalisation oncogène de KRAS sur des populations cellulaires même si ce processus semble peu efficace (T. H. Lee et al. 2016). De plus, une sélection du contenu mitochondrial qui est « emballé » sur le chemin des vésicules extracellulaires semble avoir lieu, empêchant l'externalisation du contenu mitochondrial pro-inflammatoire qui pourrait agir comme des motifs moléculaires associés aux dommages (Todkar et al. 2021). Si BCL-xL empêche un tel conditionnement sélectif dans les conditions de stress mitochondrial induit par KRAS dans les cellules de cancer du sein, il pourrait contribuer à maintenir la masse mitochondriale malgré ce stress, tout en maintenant un phénotype inflammatoire connu pour contribuer à l'agressivité du cancer du sein (Bakhoun et al. 2018). La réévaluation de l'analyse protéomique comparative des cellules MCF10A-KRASG12V suite à la régulation à la baisse de BCL-xL (Carné Trécesson et al. 2017) va dans ce sens, puisque BCL-xL diminue de façon concomitante les protéines mitochondriales et les acteurs de la signalisation de l'interféron.

Implications de l'étude

Une implication plus générale de notre étude est que les cellules malignes dépendent, pour soutenir pleinement la signalisation oncogène de RAS, de programmes homéostatiques mitochondriaux robustes. La façon dont BCL-xL participe à ces programmes reste à déterminer, car ni la MOMP ni l'autophagie ne semblent être déclenchées de façon patente dans nos conditions. Dans les cellules MCF-7, les interactants possibles de BCL-xL comprennent des protéines pro-apoptiques de la famille BCL-2 et un groupe de protéines de la membrane externe (VDAC2) et de la membrane interne (sous-unités ATP5, PHB2) rappelant les complexes mitochondriaux contenant PHB2 (Yoshinaka et al. 2019) en plus de PHB2 lui-même. BCL-xL pourrait participer à de tels complexes de manière similaire à MAVS, une protéine impliquée dans la signalisation inflammatoire avec un ancrage comparable à la membrane externe par une extrémité C-terminale, et contribuer d'une manière ou d'une autre à leur stabilité

et à leur fonction de maintien. La présence de BCL-xL dans ces échafaudages mitochondriaux implique également que PHB2 pourrait influencer réciproquement la fonction canonique de BCL-xL. En accord avec cela, il a été démontré que le fait de cibler la structure des mitochondries améliore la sensibilisation aux antagonistes de l'homologue de BCL-xL, BCL-2.

Critiques et Perspectives

Critiques de la lignée cellulaire étudiée, les MCF7

Le choix de la lignée cellulaire étudiée est intrinsèquement lié à la nécessité d'exprimer plusieurs protéines recombinantes différentes au sein d'une population cellulaire cancéreuse mammaire. De plus, travaillant sur des oncogènes forts tels que KRASG12V, le respect des normes de sécurité a limité l'établissement de lignées exprimant stablement nos oncogènes fusionnés à l'APEX ou à la YFP. Notre choix s'est donc penché sur l'utilisation de la lignée MCF7, assez robuste pour supporter la transfection et l'expression de plusieurs protéines recombinantes.

Cette lignée cellulaire possède plusieurs caractéristiques moléculaires qui ont participé à la réflexion autour des résultats de cet article. Tout d'abord, les MCF7 n'expriment pas la caspase 3-, expriment faiblement BCL-xL et son activité apoptotique est principalement médiée par MCL-1. Cependant, le traitement des MCF7 déplétées en BCL-xL par le S63845, un BH3-mimétique ciblant spécifiquement MCL-1 montre que malgré la faible expression de cette protéine, elle participe activement à protéger ces cellules lors d'un stress apoptotique.

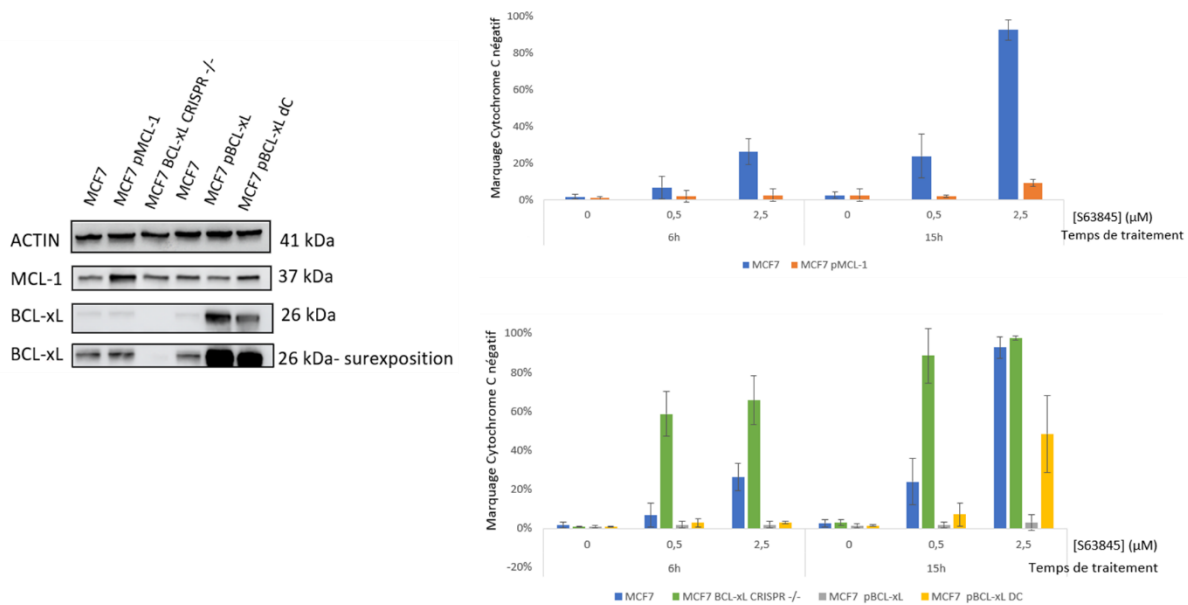


Figure 44 Effet protecteur de BCL-xL à un antagoniste de MCL-1 dans les MCF7

La diminution de TOM20 dépendante de l'expression de KRAS que nous avons observée n'est pas liée à des phénomènes de type MOMP. Cela dit nous n'avons pas évalué si celle-ci pouvait être liée à l'activité de la Parkin (une protéine essentielle à la mitophagie Parkin-dépendante) malgré sa faible expression dans les MCF7. Une perspective intéressante pourrait relever de la surexpression de la Parkin dans notre modèle afin d'évaluer l'implication des processus mitophagiques parkin-dépendants sur la perte du signal TOM20 imputé à l'expression de KRAS dans les cellules déficientes en BCL-xL. Il serait également intéressant d'évaluer l'évolution du contenu mitochondrial au sein des EVs dans ce contexte. En effet, il a été rapporté que la suractivation de la mitophagie parkin-dépendante limite l'expulsion de certaines protéines mitochondriales hors des cellules (Todkar et al. 2021). Un autre point serait d'évaluer le contenu en KRAS dans des cellules surexprimant ou déplétées en Parkin. En effet, nous avons observé une augmentation du pool de KRAS dégradé par le protéasome dans les cellules déficientes pour BCL-xL. Ce phénomène pourrait être lié à la dégradation conjointe de KRAS et des mitochondries associées à l'activité de la Parkin.

D'autre part, il sera judicieux d'évaluer les effets de la délétion de BCL-xL dans d'autres modèles cellulaires. En effet, les cancers du sein présentent peu de mutations activatrices de KRAS bien que la voie de signalisation RAS soit soutenue dans de nombreux cas par des mutations au niveau d'autres acteurs de cette voie. L'utilisation de lignées cellulaires du cancer du côlon par exemple pourrait nous permettre d'évaluer l'impact de la délétion de BCL-xL sur le contenu mitochondrial et le contenu en KRAS dans les EVs.

Critiques de la méthode APEX pour obtenir des données fonctionnelles

L'approche très globale présentée dans cet article nous fournit des informations précieuses, notamment sur la localisation de KRAS. En effet, cette méthode permet d'appréhender les paramètres spatio-temporels des interactions spécifiques pour fournir des bases de réflexions solides dans l'élaboration d'une thérapie ciblant les protéines étudiées. Cependant, afin de tirer avantage de cette méthode d'un point de vue fonctionnel il serait judicieux d'utiliser en parallèle un APEX fusionné à des références spatiales adéquates. En effet, les informations fournies par ces outils sont nécessaires pour mettre en lumière la spécificité des proximitomes des protéines cibles. Les proximitomes obtenus via ces références spatiales seraient retranchés aux listes obtenues spécifiquement avec notre protéine cible, ainsi les protéines étant présentes au niveau de différentes localisations sub-cellulaires de manière aspécifique seraient éliminées de l'analyse. Ces réflexions ont motivé notre volonté de construire des références tels que APEX-Cytb5 (ciblant APEX au RE), APEX-OMM (ciblant APEX à l'OMM), APEX-Lyn11(ciblant APEX à la membrane plasmique) et APEX-2xFYVE (ciblant APEX aux endosomes). L'utilisation de tels tags de localisations couplés à une analyse qualitative et quantitative par spectrométrie de masse peut être un outil efficace pour modéliser les dynamiques d'interaction et de fonction se déroulant sur quelques secondes au sein des cellules.

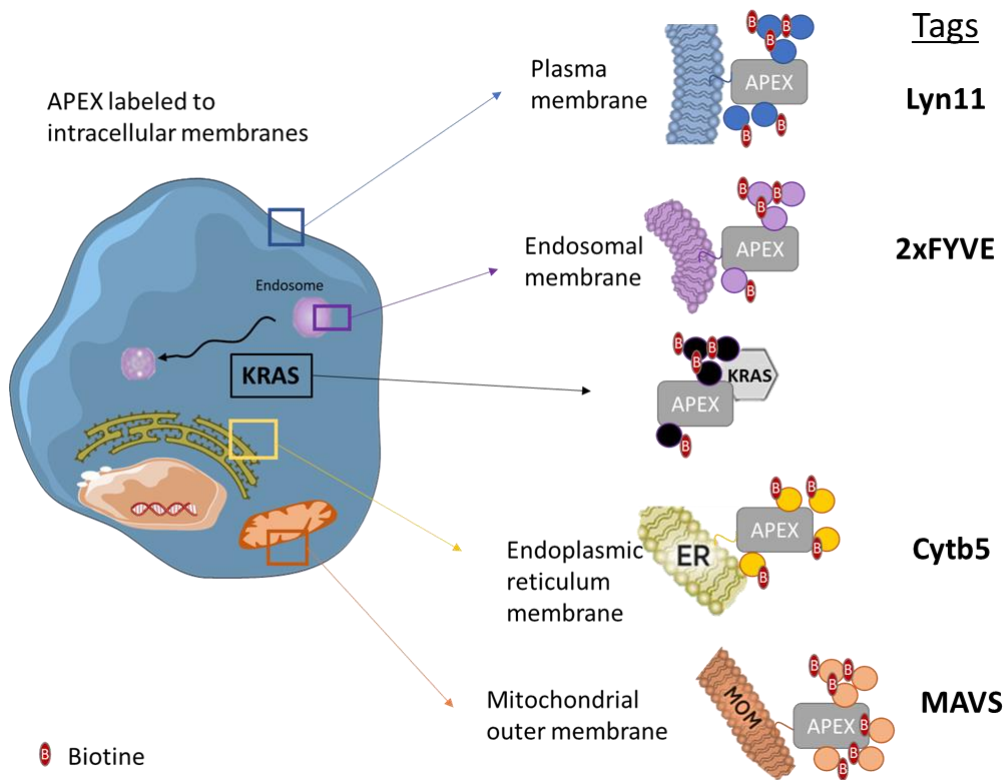


Figure 45 Représentation des différentes références spatiales fusionnées à l'APEX

Utilisation de l'APEX fusionnée à des références spatiales

Ces références spatiales nous permettraient d'obtenir d'autres informations tout aussi intéressantes. Au cours de notre étude, nous avons cherché à tirer avantage des références spatiales construites afin de déterminer le chemin parcouru par notre protéine d'intérêt, KRAS. Pour cela nous avons co-exprimé YFP-KRAS avec différentes références spatiales fusionnées à l'APEX dans des MCF7. Après activation de l'APEX par de l' H_2O_2 suivi d'un *pull down* des protéines biotinylées, nous avons cherché à déterminer la localisation de YFP-KRAS. Cette méthode pourrait, avec la révélation de protéines de référence de chaque localisation comme contrôles (TOM20 à l'OMM, Rab5 aux endosomes..) dans les *pull down*, nous fournir des informations précieuses sur le devenir d'une protéine dans un contexte donné.

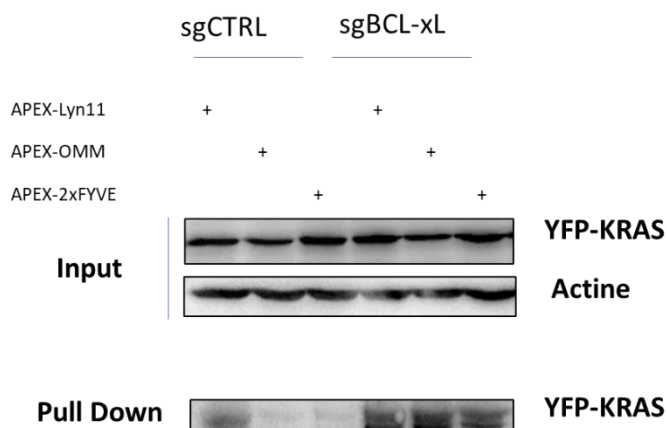


Figure 46 Utilisation des références spatiales pour déterminer le chemin d'une protéine d'intérêt

Une autre application de l'utilisation de ces références spatiales repose sur leur capacité à témoigner du contexte protéique subcellulaire dans différents contextes phénotypiques. En effet, nous avons abordé en introduction qu'une des limites de l'élaboration de thérapies efficaces contre les cancers repose sur l'hétérogénéité phénotypique présente au sein même d'une tumeur. Une de nos ambitions serait de cartographier l'évolution de l'environnement protéique au niveau de différents compartiments subcellulaires au cours du développement des mammosphères. Pour cela, il nous faudrait exprimer stablement nos différentes constructions APEX ou BirA au sein de cellules que nous ferions croître en mammosphères. L'activation des réactions de biotinylation à différents temps de croissance des mammosphères pourrait nous fournir une cartographie des environnements protéiques au cours de la croissance de la tumeur. Nous pourrions également évaluer l'influence de BCL-xL dans ces phénomènes de remodelage du contexte protéique au cours de l'évolution d'une tumeur.

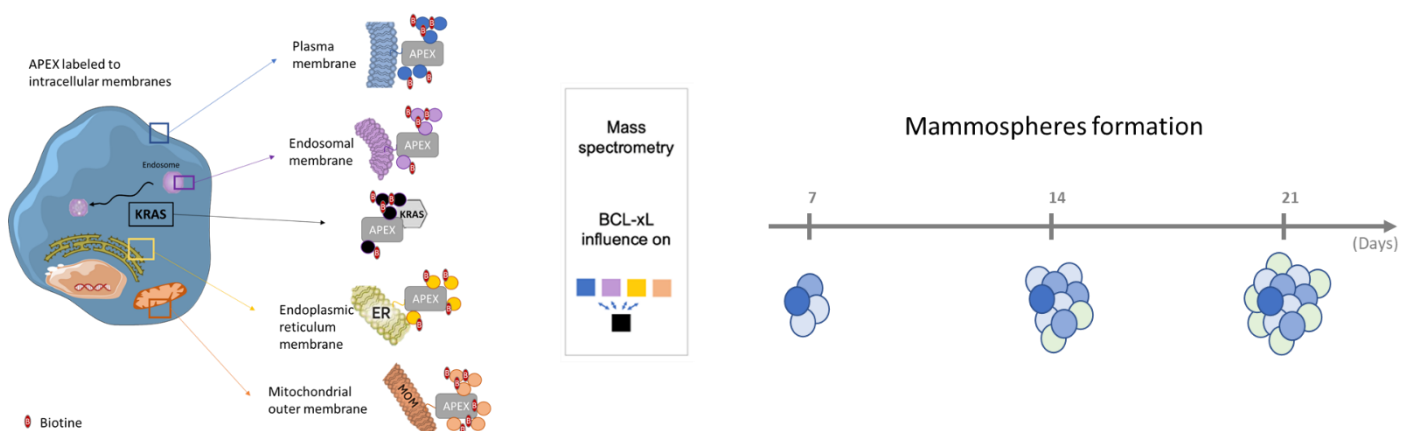


Figure 47 Cartographie des environnements protéiques au cours du développement d'une mammosphère

L'utilisation préférentielle de la méthode APEX ou de la méthode BirA pour cette application reste à déterminer. En effet, l'avantage majeur de l'APEX serait de limiter le bruit de fond obtenu puisque la réaction de biotinylation n'a lieu que pendant une minute (versus 18h pour la méthode BirA). Cependant, l'activation de l'APEX nécessite une stimulation au peroxyde d'hydrogène et son accès égal au sein de toutes les cellules évoluant en 3D reste une contrainte, que la méthode BirA ne présente pas, et qu'il sera nécessaire d'évaluer.

Utilisation de l'APEX et de la BiOLD pour marquer les protéines exportées dans les vésicules extracellulaires

Les méthodes de marquage à la biotine peuvent être envisagées même au sein de sous-unités cellulaires restreintes en taille, en nombre et par sa durée comme en témoigne la cartographie des protéines constituant les cils primaires (Mick et al. 2015; May et al. 2021) ou les granules de stress (J.-Y. Youn et al. 2018) par ces méthodes. Il semble donc envisageable de mettre en place ces méthodes pour identifier l'origine du contenu protéique (ainsi qu'en ARN) des EVs. Pour cela et à titre d'exemple, nous pouvons exprimer et activer la protéine BirA spécifiquement au niveau d'une des membranes mitochondriales et étudier le contenu des EVs en

protéines biotinylées. Nous pourrions également fusionner BirA et KRAS et récolter le contenu biotinylé des EVs afin de déterminer quelle protéine contenue dans les EVs a été en contact avec la protéine KRAS. Il serait même envisageable d'activer la protéine APEX-KRAS, par exemple, directement au sein des EVs pour cartographier les protéines transitant en complexe avec KRAS dans ces structures.

Références

- Abankwa, Daniel, Alemayehu A. Gorfe, Kerry Inder, et John F. Hancock. 2010. « Ras Membrane Orientation and Nanodomain Localization Generate Isoform Diversity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (3): 1130-35. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903907107>.
- Abankwa, Daniel, Michael Hanzal-Bayer, Nicolas Ariotti, Sarah J. Plowman, Alemayehu A. Gorfe, Robert G. Parton, J. Andrew McCammon, et John F. Hancock. 2008. « A Novel Switch Region Regulates H-Ras Membrane Orientation and Signal Output ». *The EMBO Journal* 27 (5): 727-35. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.10>.
- Abe, Taiki, Ikumi Umeki, Shin-ichiro Kanno, Shin-ichi Inoue, Tetsuya Niihori, et Yoko Aoki. 2020. « LZTR1 Facilitates Polyubiquitination and Degradation of RAS-GTPases ». *Cell Death & Differentiation* 27 (3): 1023-35. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0395-5>.
- Adhikari, Hema, et Christopher M. Counter. 2018. « Interrogating the Protein Interactomes of RAS Isoforms Identifies PIP5K1A as a KRAS-Specific Vulnerability ». *Nature Communications* 9 (1): 3646. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05692-6>.
- . 2021. « Using BioID to Characterize the RAS Interactome ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 2262: 271-80. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1190-6_16.
- Agard, Nicholas J., David Maltby, et James A. Wells. 2010. « Inflammatory Stimuli Regulate Caspase Substrate Profiles ». *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 9 (5): 880-93. <https://doi.org/10.1074/mcp.M900528-MCP200>.
- Ahearn, Ian M., Kevin Haigis, Dafna Bar-Sagi, et Mark R. Philips. 2011. « Regulating the Regulator: Post-Translational Modification of Ras ». *Nature reviews. Molecular cell biology* 13 (1): 10.1038/nrm3255. <https://doi.org/10.1038/nrm3255>.
- Alabi, Shanique, Saul Jaime-Figueroa, Zhan Yao, Yijun Gao, John Hines, Kusal T. G. Samarasinghe, Lea Vogt, Neal Rosen, et Craig M. Crews. 2021. « Mutant-Selective Degradation by BRAF-Targeting PROTACs ». *Nature Communications* 12 (1): 920. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21159-7>.
- Allis, C. David, et Thomas Jenuwein. 2016. « The Molecular Hallmarks of Epigenetic Control ». *Nature Reviews Genetics* 17 (8): 487-500. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.59>.
- Alvarez-Moya, Blanca, Carles Barceló, Francesc Tebar, Montserrat Jaumot, et Neus Agell. 2011. « CaM interaction and Ser181 phosphorylation as new K-Ras signaling modulators ». *Small GTPases* 2 (2): 99-103. <https://doi.org/10.4161/sgtp.2.2.15555>.
- Amari, Lydia, et Marc Germain. 2021. « Mitochondrial Extracellular Vesicles - Origins and Roles ». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 14: 767219. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.767219>.
- Amendola, Caroline R., James P. Mahaffey, Seth J. Parker, Ian M. Ahearn, Wei-Ching Chen, Mo Zhou, Helen Court, et al. 2019. « KRAS4A Directly

- Regulates Hexokinase 1 ». *Nature* 576 (7787): 482-86. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1832-9>.
- Amundson, S. A., T. G. Myers, D. Scudiero, S. Kitada, J. C. Reed, et A. J. Fornace. 2000. « An Informatics Approach Identifying Markers of Chemosensitivity in Human Cancer Cell Lines ». *Cancer Research* 60 (21): 6101-10.
- An, Taixue, Sihua Qin, Yong Xu, Yueting Tang, Yiyao Huang, Bo Situ, Jameel M. Inal, et Lei Zheng. 2015. « Exosomes Serve as Tumour Markers for Personalized Diagnostics Owing to Their Important Role in Cancer Metastasis ». *Journal of Extracellular Vesicles* 4: 27522. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27522>.
- Anderson, G. R., et K. C. Robbins. 1976. « Rat Sequences of the Kirsten and Harvey Murine Sarcoma Virus Genomes: Nature, Origin, and Expression in Rat Tumor RNA ». *Journal of Virology* 17 (2): 335-51. <https://doi.org/10.1128/JVI.17.2.335-351.1976>.
- Annis, Matthew G., Erinn L. Soucie, Paulina J. Dlugosz, Jorge A. Cruz-Aguado, Linda Z. Penn, Brian Leber, et David W. Andrews. 2005. « Bax Forms Multispanning Monomers That Oligomerize to Permeabilize Membranes during Apoptosis ». *The EMBO Journal* 24 (12): 2096-2103. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600675>.
- Aouacheria, Abdel, Valentine Rech de Laval, Christophe Combet, et J. Marie Hardwick. 2013. « Evolution of Bcl-2 Homology Motifs: Homology versus Homoplasmy ». *Trends in Cell Biology* 23 (3): 103-11. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.10.010>.
- Ariotti, Nicholas, Thomas E. Hall, James Rae, Charles Ferguson, Kerrie-Ann McMahon, Nick Martel, Robyn E. Webb, Richard I. Webb, Rohan D. Teasdale, et Robert G. Parton. 2015. « Modular Detection of GFP-Labeled Proteins for Rapid Screening by Electron Microscopy in Cells and Organisms ». *Developmental Cell* 35 (4): 513-25. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.10.016>.
- Arvidsson, A. K., E. Rupp, E. Nånberg, J. Downward, L. Rönnstrand, S. Wennström, J. Schlessinger, C. H. Heldin, et L. Claesson-Welsh. 1994. « Tyr-716 in the Platelet-Derived Growth Factor Beta-Receptor Kinase Insert Is Involved in GRB2 Binding and Ras Activation ». *Molecular and Cellular Biology* 14 (10): 6715-26. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.10.6715-6726.1994>.
- Baer, R. 1994. « Bcl-2 breathes life into embryogenesis. » *The American Journal of Pathology* 145 (1): 7-10.
- Baev, Denis V., Janusz Krawczyk, Michael O'Dwyer, et Eva Szegezdi. 2014. « The BH3-Mimetic ABT-737 Effectively Kills Acute Myeloid Leukemia Initiating Cells ». *Leukemia Research Reports* 3 (2): 79-82. <https://doi.org/10.1016/j.lrr.2014.06.001>.
- Bah, N., L. Maillet, J. Ryan, S. Dubreil, F. Gautier, A. Letai, P. Juin, et S. Barillé-Nion. 2014. « Bcl-XL Controls a Switch between Cell Death Modes during Mitotic Arrest ». *Cell Death & Disease* 5 (6): e1291-e1291. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.251>.
- Bakhom, Samuel F., Bryan Ngo, Ashley M. Laughney, Julie-Ann Cavallo, Charles J. Murphy, Peter Ly, Pragma Shah, et al. 2018. « Chromosomal Instability Drives Metastasis through a Cytosolic DNA Response ». *Nature* 553 (7689): 467-72. <https://doi.org/10.1038/nature25432>.

- Barbacid, Mariano. 1986. « Mutagens, Oncogenes and Cancer ». *Trends in Genetics* 2 (janvier): 188-92. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(86\)90222-2](https://doi.org/10.1016/0168-9525(86)90222-2).
- Beaumat, Florian, Mohamad El Dhaybi, Jean-Paul Lasserre, Bénédicte Salin, Mary Pat Moyer, Mireille Verdier, Stéphen Manon, et Muriel Priault. 2016. « N52 monodeamidated Bcl-xL shows impaired oncogenic properties in vivo and in vitro ». *Oncotarget* 7 (13): 17129-43. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7938>.
- Béganton, Benoît, Etienne Coyaud, Estelle M. N. Laurent, Alain Mangé, Julien Jacquemetton, Muriel Le Romancer, Brian Raught, et Jérôme Solassol. 2020. « Proximal Protein Interaction Landscape of RAS Paralogs ». *Cancers* 12 (11): 3326. <https://doi.org/10.3390/cancers12113326>.
- Bergeron, J. J. M., W. H. Lai, D. G. Kay, J. J. Doherty, M. N. Khan, et B. I. Posner. 1988. « The Endosomal Apparatus and Transmembrane Signalling ». In *Biology of Growth Factors: Molecular Biology, Oncogenes, Signal Transduction, and Clinical Implications*, édité par Jeffrey E. Kudlow, David H. MacLennan, Alan Bernstein, et Avrum I. Gotlieb, 213-24. Advances in Experimental Medicine and Biology. Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-1980-2_14.
- Bernardini, Jonathan P, Jason M Brouwer, Iris KL Tan, Jarrod J Sandow, Shuai Huang, Che A Stafford, Aleksandra Bankovacki, et al. 2019. « Parkin inhibits BAK and BAX apoptotic function by distinct mechanisms during mitophagy ». *The EMBO Journal* 38 (2): e99916. <https://doi.org/10.15252/emboj.201899916>.
- Bertolin, Giulia, Marie-Clotilde Alves-Guerra, Angélique Cheron, Agnès Burel, Claude Prigent, Roland Le Borgne, et Marc Tramier. 2021. « Mitochondrial Aurora Kinase A Induces Mitophagy by Interacting with MAP1LC3 and Prohibitin 2 ». *Life Science Alliance* 4 (6): e202000806. <https://doi.org/10.26508/lsa.202000806>.
- Beurlet, Stephanie, Nader Omidvar, Petra Gorombe, Patricia Krief, Carole Le Pogam, Niclas Setterblad, Pierre de la Grange, et al. 2013. « BCL-2 inhibition with ABT-737 prolongs survival in an NRAS/BCL-2 mouse model of AML by targeting primitive LSK and progenitor cells ». *Blood* 122 (16): 2864-76. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-445635>.
- Bhat, Vasudeva, Alison L. Allan, et Afshin Raouf. 2019. « Role of the Microenvironment in Regulating Normal and Cancer Stem Cell Activity: Implications for Breast Cancer Progression and Therapy Response ». *Cancers* 11 (9): 1240. <https://doi.org/10.3390/cancers11091240>.
- Bhutia, Yangzom D., Ellappan Babu, Sabarish Ramachandran, et Vadivel Ganapathy. 2015. « Amino Acid Transporters in Cancer and Their Relevance to "Glutamine Addiction": Novel Targets for the Design of a New Class of Anticancer Drugs ». *Cancer Research* 75 (9): 1782-88. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3745>.
- Bissell, M. J., et D. Radisky. 2001. « Putting Tumours in Context ». *Nature Reviews. Cancer* 1 (1): 46-54. <https://doi.org/10.1038/35094059>.
- Bivona, Trevor G., Ignacio Pérez de Castro, Ian M. Ahearn, Theresa M. Grana, Vi K. Chiu, Peter J. Lockyer, Peter J. Cullen, Angel Pellicer, Adrienne D. Cox, et Mark R. Philips. 2003. « Phospholipase C γ Activates Ras on the Golgi Apparatus by Means of RasGRP1 ». *Nature* 424 (6949): 694-98. <https://doi.org/10.1038/nature01806>.

- Bivona, Trever G., Steven E. Quatela, Brian O. Bodemann, Ian M. Ahearn, Michael J. Soskis, Adam Mor, John Miura, et al. 2006. « PKC Regulates a Farnesyl-Electrostatic Switch on K-Ras That Promotes Its Association with Bcl-XL on Mitochondria and Induces Apoptosis ». *Molecular Cell* 21 (4): 481-93. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.01.012>.
- Bock, Florian J., et Stephen W. G. Tait. 2020. « Mitochondria as Multifaceted Regulators of Cell Death ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21 (2): 85-100. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0173-8>.
- Boehning, Darren, Randen L. Patterson, Leela Sedaghat, Natalia O. Glebova, Tomohiro Kurosaki, et Solomon H. Snyder. 2003. « Cytochrome c Binds to Inositol (1,4,5) Trisphosphate Receptors, Amplifying Calcium-Dependent Apoptosis ». *Nature Cell Biology* 5 (12): 1051-61. <https://doi.org/10.1038/ncb1063>.
- Bond, Michael J., Ling Chu, Dhanusha A. Nalawansa, Ke Li, et Craig M. Crews. 2020. « Targeted Degradation of Oncogenic KRASG12C by VHL-Recruiting PROTACs ». *ACS Central Science* 6 (8): 1367-75. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c00411>.
- Bonneau, Benjamin, Adrien Nougarede, Julien Prudent, Nikolay Popgeorgiev, Nadine Peyriéras, Ruth Rimokh, et Germain Gillet. 2014. « The Bcl-2 Homolog Nr2 Inhibits Binding of IP3 to Its Receptor to Control Calcium Signaling During Zebrafish Epiboly ». *Science Signaling* 7 (312): ra14-ra14. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004480>.
- Bonnefond, Marie-Laure, Bernard Lambert, Florence Giffard, Edwige Abeilard, Emilie Brotin, Marie-Hélène Louis, Mor Sény Gueye, Pascal Gauduchon, Laurent Poulain, et Monique N'Diaye. 2015. « Calcium Signals Inhibition Sensitizes Ovarian Carcinoma Cells to Anti-Bcl-XL Strategies through Mcl-1 down-Regulation ». *Apoptosis* 20 (4): 535-50. <https://doi.org/10.1007/s10495-015-1095-3>.
- Bootman, Martin D., et Geert Bultynck. 2020. « Fundamentals of Cellular Calcium Signaling: A Primer ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 12 (1): a038802. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038802>.
- Bos, Johannes L., Holger Rehmann, et Alfred Wittinghofer. 2007. « GEFs and GAPs: Critical Elements in the Control of Small G Proteins ». *Cell* 129 (5): 865-77. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.018>.
- Brabletz, Thomas, Raghu Kalluri, M. Angela Nieto, et Robert A. Weinberg. 2018. « EMT in Cancer ». *Nature Reviews. Cancer* 18 (2): 128-34. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.118>.
- Branon, Tess C., Justin A. Bosch, Ariana D. Sanchez, Namrata D. Udeshi, Tanya Svinkina, Steven A. Carr, Jessica L. Feldman, Norbert Perrimon, et Alice Y. Ting. 2018. « Efficient Proximity Labeling in Living Cells and Organisms with TurboID ». *Nature Biotechnology* 36 (9): 880-87. <https://doi.org/10.1038/nbt.4201>.
- Braun, Frédérique, Sophie de Carné Trécesson, Joséphine Bertin-Ciftci, et Philippe Juin. 2013. « Protect and serve: Bcl-2 proteins as guardians and rulers of cancer cell survival ». *Cell Cycle* 12 (18): 2937-47. <https://doi.org/10.4161/cc.25972>.
- Broz, Petr, Thomas Ruby, Kamila Belhocine, Donna M. Bouley, Nobuhiko Kayagaki, Vishva M. Dixit, et Denise M. Monack. 2012. « Caspase-11 Increases

- Susceptibility to Salmonella Infection in the Absence of Caspase-1 ». *Nature* 490 (7419): 288-91. <https://doi.org/10.1038/nature11419>.
- Buchbinder, Elizabeth Iannotti, Justine Vanessa Cohen, Rizwan Haq, F. Stephen Hodi, Donald P. Lawrence, Anita Giobbie-Hurder, Deb Knoerzer, et Ryan J. Sullivan. 2020. « A phase II study of ERK inhibition by ulixertinib (BVD-523) in metastatic uveal melanoma. » *Journal of Clinical Oncology* 38 (15_suppl): 10036-10036. https://doi.org/10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.10036.
- Buday, L., et J. Downward. 1993. « Epidermal Growth Factor Regulates P21ras through the Formation of a Complex of Receptor, Grb2 Adapter Protein, and Sos Nucleotide Exchange Factor ». *Cell* 73 (3): 611-20. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90146-h](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90146-h).
- Busch, Evan L., Prabhani Kuruppumullage Don, Haitao Chu, David B. Richardson, Temitope O. Keku, David A. Eberhard, Christy L. Avery, et Robert S. Sandler. 2018. « Diagnostic Accuracy and Prediction Increment of Markers of Epithelial-Mesenchymal Transition to Assess Cancer Cell Detachment from Primary Tumors ». *BMC Cancer* 18 (1): 82. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3964-3>.
- Byers, Lauren Averett, Lixia Diao, Jing Wang, Pierre Saintigny, Luc Girard, Michael Peyton, Li Shen, et al. 2013. « An Epithelial-Mesenchymal Transition Gene Signature Predicts Resistance to EGFR and PI3K Inhibitors and Identifies Axl as a Therapeutic Target for Overcoming EGFR Inhibitor Resistance ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 19 (1): 279-90. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1558>.
- Campane, Mario, Béline Noël, Cécile Couriaud, Morgan Grau, Yannis Guillemin, Fabien Gautier, Wilfried Gouraud, et al. 2011. « c-Myc dependent expression of pro-apoptotic Bim renders HER2-overexpressing breast cancer cells dependent on anti-apoptotic Mcl-1 ». *Molecular Cancer* 10 (1): 110. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-110>.
- Capon, D. J., P. H. Seeburg, J. P. McGrath, J. S. Hayflick, U. Edman, A. D. Levinson, et D. V. Goeddel. 1983. « Activation of Ki-Ras2 Gene in Human Colon and Lung Carcinomas by Two Different Point Mutations ». *Nature* 304 (5926): 507-13. <https://doi.org/10.1038/304507a0>.
- Carné Trécesson, Sophie de, Frédérique Souazé, Agnès Basseville, Anne-Charlotte Bernard, Jessie Pécot, Jonathan Lopez, Margaux Bessou, et al. 2017. « BCL-XL Directly Modulates RAS Signalling to Favour Cancer Cell Stemness ». *Nature Communications* 8 (1): 1123. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01079-1>.
- Casar, Berta, Andrew P. Badrock, Iñaki Jiménez, Imanol Arozarena, Paula Colón-Bolea, L. Francisco Lorenzo-Martín, Irene Barinaga-Rementería, et al. 2018. « RAS at the Golgi Antagonizes Malignant Transformation through PTPRκ-Mediated Inhibition of ERK Activation ». *Nature Communications* 9 (1): 3595. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05941-8>.
- Castellano, Esther, et Julian Downward. 2010. « Role of RAS in the Regulation of PI 3-Kinase ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 346: 143-69. https://doi.org/10.1007/82_2010_56.
- . 2011. « RAS Interaction with PI3K ». *Genes & Cancer* 2 (3): 261-74. <https://doi.org/10.1177/1947601911408079>.

- Cermakova, Katerina, et H. Courtney Hodges. 2018. « Next-Generation Drugs and Probes for Chromatin Biology: From Targeted Protein Degradation to Phase Separation ». *Molecules: A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry* 23 (8): 1958. <https://doi.org/10.3390/molecules23081958>.
- Chang, Jui-Chih, Huei-Shin Chang, Yao-Chung Wu, Wen-Ling Cheng, Ta-Tsung Lin, Hui-Ju Chang, Shou-Tung Chen, et Chin-San Liu. 2020. « Antitumor Actions of Intratumoral Delivery of Membrane-Fused Mitochondria in a Mouse Model of Triple-Negative Breast Cancers ». *OncoTargets and Therapy* 13: 5241-55. <https://doi.org/10.2147/OTT.S238143>.
- Chang, Jui-Chih, Huei-Shin Chang, Yao-Chung Wu, Wen-Ling Cheng, Ta-Tsung Lin, Hui-Ju Chang, Shou-Jen Kuo, Shou-Tung Chen, et Chin-San Liu. 2019. « Mitochondrial Transplantation Regulates Antitumour Activity, Chemoresistance and Mitochondrial Dynamics in Breast Cancer ». *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR* 38 (1): 30. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1028-z>.
- Chapman-Smith, A., et J. E. Cronan. 1999. « The Enzymatic Biotinylation of Proteins: A Post-Translational Modification of Exceptional Specificity ». *Trends in Biochemical Sciences* 24 (9): 359-63. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(99\)01438-3](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(99)01438-3).
- Chaumont, Fabrice de, Stéphane Dallongeville, Nicolas Chenouard, Nicolas Hervé, Sorin Pop, Thomas Provoost, Vannary Meas-Yedid, et al. 2012. « Icy: An Open Bioimage Informatics Platform for Extended Reproducible Research ». *Nature Methods* 9 (7): 690-96. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2075>.
- Cheaito, Katia A., Hisham F. Bahmad, Ola Hadadeh, Eman Saleh, Christelle Dagher, Miza Salim Hammoud, Mohammad Shahait, et al. 2019. « EMT Markers in Locally-Advanced Prostate Cancer: Predicting Recurrence? ». *Frontiers in Oncology* 9: 131. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00131>.
- Chen, Chiao-Lin, et Norbert Perrimon. 2017. « Proximity-dependent labeling methods for proteomic profiling in living cells ». *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology* 6 (4): 10.1002/wdev.272. <https://doi.org/10.1002/wdev.272>.
- Chen, Shao-Jie, Yin-Ting Chen, Lin-Juan Zeng, Qiu-Bo Zhang, Guo-da Lian, Jia-Jia Li, Ke-Ge Yang, et al. 2016. « Bmi1 Combines with Oncogenic KRAS to Induce Malignant Transformation of Human Pancreatic Duct Cells in Vitro ». *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 37 (8): 11299-309. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-4840-5>.
- Chen, Wei-Ching, Minh D. To, Peter M. K. Westcott, Reyno Delrosario, Il-Jin Kim, Mark Philips, Quan Tran, et al. 2021. « Targeting KRAS4A Splicing through the RBM39/DCAF15 Pathway Inhibits Cancer Stem Cells ». *Nature Communications* 12 (1): 4288. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24498-7>.
- Chen, Xufeng, Christina Glytsou, Hua Zhou, Sonali Narang, Denis E. Reyna, Andrea Lopez, Theodore Sakellaropoulos, et al. 2019. « Targeting Mitochondrial Structure Sensitizes Acute Myeloid Leukemia to Venetoclax Treatment ». *Cancer Discovery* 9 (7): 890-909. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0117>.
- Chen, Ying-Bei, Miguel A. Aon, Yi-Te Hsu, Lucian Soane, Xinchun Teng, J. Michael McCaffery, Wen-Chih Cheng, et al. 2011. « Bcl-XL Regulates Mitochondrial

- Energetics by Stabilizing the Inner Membrane Potential ». *The Journal of Cell Biology* 195 (2): 263-76. <https://doi.org/10.1083/jcb.201108059>.
- Cheng, Qing, Jeffrey T. Chang, William R. Gwin, Jun Zhu, Stefan Ambs, Joseph Geradts, et H. Kim Lyerly. 2014. « A Signature of Epithelial-Mesenchymal Plasticity and Stromal Activation in Primary Tumor Modulates Late Recurrence in Breast Cancer Independent of Disease Subtype ». *Breast Cancer Research: BCR* 16 (4): 407. <https://doi.org/10.1186/s13058-014-0407-9>.
- Chiaradonna, F., C. Magnani, E. Sacco, R. Manzoni, L. Alberghina, et M. Vanoni. 2005. « Acquired Glucose Sensitivity of K-Ras Transformed Fibroblasts ». *Biochemical Society Transactions* 33 (Pt 1): 297-99. <https://doi.org/10.1042/BST0330297>.
- Chiu, Vi K., Trever Bivona, Angela Hach, J. Bernard Sajous, Joseph Silletti, Heidi Wiener, Ronald L. Johnson, Adrienne D. Cox, et Mark R. Philips. 2002. « Ras Signalling on the Endoplasmic Reticulum and the Golgi ». *Nature Cell Biology* 4 (5): 343-50. <https://doi.org/10.1038/ncb783>.
- Cho, Kelvin F., Tess C. Branon, Sanjana Rajeev, Tanya Svinkina, Namrata D. Udeshi, Themis Thoudam, Chulhwan Kwak, et al. 2020. « Split-TurbolID Enables Contact-Dependent Proximity Labeling in Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (22): 12143-54. <https://doi.org/10.1073/pnas.1919528117>.
- Cho, Kwang-jin, Jin-Hee Park, Andrew M. Piggott, Angela A. Salim, Alemaheyu A. Gorfe, Robert G. Parton, Robert J. Capon, Ernest Lacey, et John F. Hancock. 2012. « Staurosporines Disrupt Phosphatidylserine Trafficking and Mislocalize Ras Proteins ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (52): 43573-84. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.424457>.
- Choi-Rhee, Eunjoo, Howard Schulman, et John E. Cronan. 2004. « Promiscuous Protein Biotinylation by Escherichia Coli Biotin Protein Ligase ». *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 13 (11): 3043-50. <https://doi.org/10.1110/ps.04911804>.
- Chonghaile, Triona Ni, Kristopher A. Sarosiek, Thanh-Trang Vo, Jeremy A. Ryan, Anupama Tammareddi, Victoria Del Gaizo Moore, Jing Deng, et al. 2011. « Pretreatment Mitochondrial Priming Correlates with Clinical Response to Cytotoxic Chemotherapy ». *Science* 334 (6059): 1129-33. <https://doi.org/10.1126/science.1206727>.
- Clark, E. A., et R. O. Hynes. 1996. « Ras Activation Is Necessary for Integrin-Mediated Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase 2 and Cytosolic Phospholipase A2 but Not for Cytoskeletal Organization ». *The Journal of Biological Chemistry* 271 (25): 14814-18. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.25.14814>.
- Cleary, Michael L., Stephen D. Smith, et Jeffrey Sklar. 1986. « Cloning and Structural Analysis of cDNAs for Bcl-2 and a Hybrid Bcl-2/Immunoglobulin Transcript Resulting from the t(14;18) Translocation ». *Cell* 47 (1): 19-28. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90362-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90362-4).
- Coffin, J. M., H. E. Varmus, J. M. Bishop, M. Essex, W. D. Hardy, G. S. Martin, N. E. Rosenberg, E. M. Scolnick, R. A. Weinberg, et P. K. Vogt. 1981. « Proposal for Naming Host Cell-Derived Inserts in Retrovirus Genomes ». *Journal of Virology* 40 (3): 953-57. <https://doi.org/10.1128/JVI.40.3.953-957.1981>.

- Colicelli, John. 2010. « Signal Transduction: RABGEF1 Fingers RAS for Ubiquitination ». *Current biology: CB* 20 (15): R630-32. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.06.019>.
- Coulier, F., R. Kumar, M. Ernst, R. Klein, D. Martin-Zanca, et M. Barbacid. 1990. « Human Trk Oncogenes Activated by Point Mutation, in-Frame Deletion, and Duplication of the Tyrosine Kinase Domain ». *Molecular and Cellular Biology* 10 (8): 4202-10. <https://doi.org/10.1128/mcb.10.8.4202-4210.1990>.
- Couzinet, Arnaud, Zoltán Hérincs, et Anne-Odile Hueber. 2002. « Régulation de la mort cellulaire programmée: vers une conception plus dynamique ». *médecine/sciences* 18 (8-9): 841-52. <https://doi.org/10.1051/medsci/20021889841>.
- Crewe, Clair, Jan-Bernd Funcke, Shujuan Li, Nolwenn Joffin, Christy M. Gliniak, Alexandra L. Ghaben, Yu A. An, et al. 2021. « Extracellular Vesicle-Based Interorgan Transport of Mitochondria from Energetically Stressed Adipocytes ». *Cell Metabolism* 33 (9): 1853-1868.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.08.002>.
- Cronan, John E. 2005. « Targeted and Proximity-Dependent Promiscuous Protein Biotinylation by a Mutant Escherichia Coli Biotin Protein Ligase ». *The Journal of Nutritional Biochemistry* 16 (7): 416-18. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.03.017>.
- Cruz-Migoni, Abimael, Peter Canning, Camilo E. Quevedo, Carole J. R. Bataille, Nicolas Bery, Ami Miller, Angela J. Russell, Simon E. V. Phillips, Stephen B. Carr, et Terence H. Rabbitts. 2019. « Structure-Based Development of New RAS-Effector Inhibitors from a Combination of Active and Inactive RAS-Binding Compounds ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116 (7): 2545-50. <https://doi.org/10.1073/pnas.1811360116>.
- D'Acunzo, Pasquale, Rocío Pérez-González, Yohan Kim, Tal Hargash, Chelsea Miller, Melissa J. Alldred, Hediye Erdjument-Bromage, et al. 2021. « Mitovesicles are a novel population of extracellular vesicles of mitochondrial origin altered in Down syndrome ». *Science Advances* 7 (7): eabe5085. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abe5085>.
- . s. d. « Mitovesicles are a novel population of extracellular vesicles of mitochondrial origin altered in Down syndrome ». *Science Advances* 7 (7): eabe5085. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abe5085>.
- Dagogo-Jack, Ibiayi, et Alice T. Shaw. 2018. « Tumour Heterogeneity and Resistance to Cancer Therapies ». *Nature Reviews. Clinical Oncology* 15 (2): 81-94. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.166>.
- Das, Vishal, Sourya Bhattacharya, Channakeshavaiah Chikkaputtaiah, Saugata Hazra, et Mintu Pal. 2019. « The Basics of Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT): A Study from a Structure, Dynamics, and Functional Perspective ». *Journal of Cellular Physiology*, février. <https://doi.org/10.1002/jcp.28160>.
- Davis, Chung-ha O., Keun-Young Kim, Eric A. Bushong, Elizabeth A. Mills, Daniela Boassa, Tiffany Shih, Mira Kinebuchi, et al. 2014. « Transcellular Degradation of Axonal Mitochondria ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (26): 9633-38. <https://doi.org/10.1073/pnas.1404651111>.

- Delbridge, Alex R. D., Stephanie Grabow, Andreas Strasser, et David L. Vaux. 2016. « Thirty Years of BCL-2: Translating Cell Death Discoveries into Novel Cancer Therapies ». *Nature Reviews Cancer* 16 (2): 99-109. <https://doi.org/10.1038/nrc.2015.17>.
- Deshmukh, M., et E. M. Johnson. 1998. « Evidence of a Novel Event during Neuronal Death: Development of Competence-to-Die in Response to Cytoplasmic Cytochrome c ». *Neuron* 21 (4): 695-705. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80587-5](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80587-5).
- Deverman, Benjamin E., Brian L. Cook, Scott R. Manson, Robert A. Niederhoff, Ellen M. Langer, Ivana Rosová, Laura A. Kulans, et al. 2002. « Bcl-XL Deamidation Is a Critical Switch in the Regulation of the Response to DNA Damage ». *Cell* 111 (1): 51-62. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00972-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00972-8).
- Devhare, Pradip B., et Ratna B. Ray. 2018. « Extracellular Vesicles: Novel Mediator for Cell to Cell Communications in Liver Pathogenesis ». *Molecular Aspects of Medicine* 60 (avril): 115-22. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.11.001>.
- Di Guglielmo, G. M., P. C. Baass, W. J. Ou, B. I. Posner, et J. J. Bergeron. 1994. « Compartmentalization of SHC, GRB2 and MSOS, and Hyperphosphorylation of Raf-1 by EGF but Not Insulin in Liver Parenchyma ». *The EMBO Journal* 13 (18): 4269-77.
- Dikic, Ivan, et Zvulun Elazar. 2018. « Mechanism and Medical Implications of Mammalian Autophagy ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19 (6): 349-64. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0003-4>.
- Dikic, Ivan, Joseph Schlessinger, et Irit Lax. 1994. « PC12 Cells Overexpressing the Insulin Receptor Undergo Insulin-Dependent Neuronal Differentiation ». *Current Biology* 4 (8): 702-8. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00155-X](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00155-X).
- Dohlman, Henrik G., et Sharon L. Campbell. 2019. « Regulation of large and small G proteins by ubiquitination ». *The Journal of Biological Chemistry* 294 (49): 18613-23. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.011068>.
- Dong, Lan-Feng, Jaromira Kovarova, Martina Bajzikova, Ayenachew Bezawork-Geleta, David Svec, Berwini Endaya, Karishma Sachaphibulkij, et al. 2017. « Horizontal Transfer of Whole Mitochondria Restores Tumorigenic Potential in Mitochondrial DNA-Deficient Cancer Cells ». *ELife* 6 (février): e22187. <https://doi.org/10.7554/eLife.22187>.
- Dorard, Coralie, Charlène Estrada, Céline Barbotin, Magalie Larcher, Alexandra Garancher, Jessy Leloup, Friedrich Beermann, et al. 2017. « RAF Proteins Exert Both Specific and Compensatory Functions during Tumour Progression of NRAS-Driven Melanoma ». *Nature Communications* 8 (mai): 15262. <https://doi.org/10.1038/ncomms15262>.
- Dundas, Christopher M., Daniel Demonte, et Sheldon Park. 2013. « Streptavidin–Biotin Technology: Improvements and Innovations in Chemical and Biological Applications ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (21): 9343-53. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5232-z>.
- Edlich, Frank, Soojay Banerjee, Motoshi Suzuki, Megan M. Cleland, Damien Arnoult, Chunxin Wang, Albert Neutzner, Nico Tjandra, et Richard J. Youle. 2011. « Bcl-xL retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol ». *Cell* 145 (1): 104-16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.034>.

- Eliopoulos, A G, D J Kerr, J Herod, L Hodgkins, S Krajewski, J C Reed, et L S Young. 1995. « The Control of Apoptosis and Drug Resistance in Ovarian Cancer: Influence of P53 and Bcl-2 ». *Oncogene* 11 (7): 1217-28.
- Elliott, Michael R., Faraaz B. Chekeni, Paul C. Trampont, Eduardo R. Lazarowski, Alexandra Kadl, Scott F. Walk, Daeho Park, et al. 2009. « Nucleotides Released by Apoptotic Cells Act as a Find-Me Signal to Promote Phagocytic Clearance ». *Nature* 461 (7261): 282-86. <https://doi.org/10.1038/nature08296>.
- Ellis, R. W., D. Defeo, T. Y. Shih, M. A. Gonda, H. A. Young, N. Tsuchida, D. R. Lowy, et E. M. Scolnick. 1981. « The P21 Src Genes of Harvey and Kirsten Sarcoma Viruses Originate from Divergent Members of a Family of Normal Vertebrate Genes ». *Nature* 292 (5823): 506-11. <https://doi.org/10.1038/292506a0>.
- End, D. W., G. Smets, A. V. Todd, T. L. Applegate, C. J. Fuery, P. Angibaud, M. Venet, et al. 2001. « Characterization of the Antitumor Effects of the Selective Farnesyl Protein Transferase Inhibitor R115777 in Vivo and in Vitro ». *Cancer Research* 61 (1): 131-37.
- Er, Emine, Lisa Oliver, Pierre-François Cartron, Philippe Juin, Stephen Manon, et François M. Vallette. 2006. « Mitochondria as the Target of the Pro-Apoptotic Protein Bax ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1757 (9-10): 1301-11. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.05.032>.
- Esteban, Luis M., Carlos Vicario-Abejón, Pedro Fernández-Salguero, Alberto Fernández-Medarde, Nalini Swaminathan, Kate Yienger, Eva Lopez, et al. 2001. « Targeted Genomic Disruption of H-ras and N-ras, Individually or in Combination, Reveals the Dispensability of Both Loci for Mouse Growth and Development ». *Molecular and Cellular Biology* 21 (5): 1444-52. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.5.1444-1452.2001>.
- Farmer, Pierre, Hervé Bonnefoi, Pascale Anderle, David Cameron, Pratyaksha Wirapati, Pratyaksha Wirapati, Véronique Becette, et al. 2009. « A Stroma-Related Gene Signature Predicts Resistance to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer ». *Nature Medicine* 15 (1): 68-74. <https://doi.org/10.1038/nm.1908>.
- Farmer, Trey, Katelyn L. O'Neill, Naava Naslavsky, Xu Luo, et Steve Caplan. 2019. « Retromer Facilitates the Localization of Bcl-XL to the Mitochondrial Outer Membrane ». *Molecular Biology of the Cell* 30 (10): 1138-46. <https://doi.org/10.1091/mbc.E19-01-0044>.
- Fasolo, Angelica, et Cristiana Sessa. 2012. « Targeting MTOR Pathways in Human Malignancies ». *Current Pharmaceutical Design* 18 (19): 2766-77. <https://doi.org/10.2174/138161212800626210>.
- Fazal, Furqan M., Shuo Han, Kevin R. Parker, Pornchai Kaewsapsak, Jin Xu, Alistair N. Boettiger, Howard Y. Chang, et Alice Y. Ting. 2019. « Atlas of Subcellular RNA Localization Revealed by APEX-Seq ». *Cell* 178 (2): 473-490.e26. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.027>.
- Fischer, Kari R., Anna Durrans, Sharrell Lee, Jianting Sheng, Fuhai Li, Stephen T. C. Wong, Hyejin Choi, et al. 2015. « Epithelial-to-Mesenchymal Transition Is Not Required for Lung Metastasis but Contributes to Chemoresistance ». *Nature* 527 (7579): 472-76. <https://doi.org/10.1038/nature15748>.
- Forbes, Simon A., Nidhi Bindal, Sally Bamford, Charlotte Cole, Chai Yin Kok, David Beare, Mingming Jia, et al. 2011. « COSMIC: Mining Complete Cancer

- Genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer ». *Nucleic Acids Research* 39 (Database issue): D945-950. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq929>.
- Fortian, Arola, et Alexander Sorkin. 2014. « Live-Cell Fluorescence Imaging Reveals High Stoichiometry of Grb2 Binding to the EGF Receptor Sustained during Endocytosis ». *Journal of Cell Science* 127 (Pt 2): 432-44. <https://doi.org/10.1242/jcs.137786>.
- Friedman, Jonathan R., et Jodi Nunnari. 2014. « Mitochondrial Form and Function ». *Nature* 505 (7483): 335-43. <https://doi.org/10.1038/nature12985>.
- Gaglio, Daniela, Christian M Metallo, Paulo A Gameiro, Karsten Hiller, Lara Sala Danna, Chiara Balestrieri, Lilia Alberghina, Gregory Stephanopoulos, et Ferdinando Chiaradonna. 2011. « Oncogenic K-Ras decouples glucose and glutamine metabolism to support cancer cell growth ». *Molecular Systems Biology* 7 (août): 523. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.56>.
- Galluzzi, L., N. Joza, E. Tasdemir, M. C. Maiuri, M. Hengartner, J. M. Abrams, N. Tavernarakis, J. Penninger, F. Madeo, et G. Kroemer. 2008. « No Death without Life: Vital Functions of Apoptotic Effectors ». *Cell Death and Differentiation* 15 (7): 1113-23. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.28>.
- Galluzzi, L., I. Vitale, J. M. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, T. M. Dawson, et al. 2012. « Molecular Definitions of Cell Death Subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012 ». *Cell Death & Differentiation* 19 (1): 107-20. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.96>.
- Galluzzi, Lorenzo, Oliver Kepp, Christina Trojel-Hansen, et Guido Kroemer. 2012. « Non-Apoptotic Functions of Apoptosis-Regulatory Proteins ». *EMBO Reports* 13 (4): 322-30. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.19>.
- Galluzzi, Lorenzo, Ilio Vitale, Stuart A. Aaronson, John M. Abrams, Dieter Adam, Patrizia Agostinis, Emad S. Alnemri, et al. 2018. « Molecular Mechanisms of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 ». *Cell Death and Differentiation* 25 (3): 486-541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>.
- Gerlinger, Marco, Stuart Horswell, James Larkin, Andrew J. Rowan, Max P. Salm, Ignacio Varela, Rosalie Fisher, et al. 2014. « Genomic Architecture and Evolution of Clear Cell Renal Cell Carcinomas Defined by Multiregion Sequencing ». *Nature Genetics* 46 (3): 225-33. <https://doi.org/10.1038/ng.2891>.
- Gibbs, J. B., I. S. Sigal, M. Poe, et E. M. Scolnick. 1984. « Intrinsic GTPase Activity Distinguishes Normal and Oncogenic Ras P21 Molecules ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81 (18): 5704-8. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.18.5704>.
- Gilardi, Mara, Zhiyong Wang, Marco Proietto, Anastasia Chillà, Juan Luis Calleja-Valera, Yusuke Goto, Marco Vanoni, et al. 2020. « Tipifarnib as a Precision Therapy for HRAS-Mutant Head and Neck Squamous Cell Carcinomas ». *Molecular Cancer Therapeutics* 19 (9): 1784-96. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-19-0958>.
- Gimple, Ryan C., et Xiuxing Wang. 2019. « RAS: Striking at the Core of the Oncogenic Circuitry ». *Frontiers in Oncology* 9: 965. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00965>.

- Goebel, Lisa, Matthias P. Müller, Roger S. Goody, et Daniel Rauh. 2020. « KRasG12C Inhibitors in Clinical Trials: A Short Historical Perspective ». *RSC Medicinal Chemistry* 11 (7): 760-70. <https://doi.org/10.1039/D0MD00096E>.
- Goldstein, Joshua C., Nigel J. Waterhouse, Phillipe Juin, Gerard I. Evan, et Douglas R. Green. 2000. « The Coordinate Release of Cytochrome c during Apoptosis Is Rapid, Complete and Kinetically Invariant ». *Nature Cell Biology* 2 (3): 156-62. <https://doi.org/10.1038/35004029>.
- Golstein, Pierre, et Guido Kroemer. 2007. « Cell Death by Necrosis: Towards a Molecular Definition ». *Trends in Biochemical Sciences* 32 (1): 37-43. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.11.001>.
- Gorfe, Alemayehu A., Michael Hanzal-Bayer, Daniel Abankwa, John F. Hancock, et J. Andrew McCammon. 2007. « Structure and Dynamics of the Full-Length Lipid-Modified H-Ras Protein in a 1,2-Dimyristoylglycero-3-Phosphocholine Bilayer ». *Journal of Medicinal Chemistry* 50 (4): 674-84. <https://doi.org/10.1021/jm061053f>.
- Gu, S., A. Sayad, G. Chan, W. Yang, Z. Lu, C. Virtanen, R. A. Van Etten, et B. G. Neel. 2018. « SHP2 Is Required for BCR-ABL1-Induced Hematologic Neoplasia ». *Leukemia* 32 (1): 203-13. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.250>.
- Hammerling, Babette C., Rita H. Najor, Melissa Q. Cortez, Sarah E. Shires, Leonardo J. Leon, Eileen R. Gonzalez, Daniela Boassa, et al. 2017. « A Rab5 Endosomal Pathway Mediates Parkin-Dependent Mitochondrial Clearance ». *Nature Communications* 8 (1): 14050. <https://doi.org/10.1038/ncomms14050>.
- Hammond, Dean E., Craig J. Mageean, Emma V. Rusilowicz, Julie A. Wickenden, Michael J. Clague, et Ian A. Prior. 2015. « Differential Reprogramming of Isogenic Colorectal Cancer Cells by Distinct Activating KRAS Mutations ». *Journal of Proteome Research* 14 (3): 1535-46. <https://doi.org/10.1021/pr501191a>.
- Hanahan, D., et R. A. Weinberg. 2000. « The Hallmarks of Cancer ». *Cell* 100 (1): 57-70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9).
- Hanahan, Douglas, et Robert A. Weinberg. 2011. « Hallmarks of Cancer: The Next Generation ». *Cell* 144 (5): 646-74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- Hancock, J. F., H. Paterson, et C. J. Marshall. 1990. « A Polybasic Domain or Palmitoylation Is Required in Addition to the CAAX Motif to Localize P21ras to the Plasma Membrane ». *Cell* 63 (1): 133-39. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90294-o](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90294-o).
- Hancock, John F. 2003. « Ras Proteins: Different Signals from Different Locations ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4 (5): 373-85. <https://doi.org/10.1038/nrm1105>.
- Hanson, C. Jane, Martin D. Bootman, Clark W. Distelhorst, Tullia Maraldi, et H. Llewelyn Roderick. 2008. « The Cellular Concentration of Bcl-2 Determines Its pro- or Anti-Apoptotic Effect ». *Cell Calcium* 44 (3): 243-58. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2007.11.014>.
- Harvey, J. J. 1964. « AN UNIDENTIFIED VIRUS WHICH CAUSES THE RAPID PRODUCTION OF TUMOURS IN MICE ». *Nature* 204 (décembre): 1104-5. <https://doi.org/10.1038/2041104b0>.

- Hayakawa, Kazuhide, Elga Esposito, Xiaohua Wang, Yasukazu Terasaki, Yi Liu, Changhong Xing, Xunming Ji, et Eng H. Lo. 2016. « Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke ». *Nature* 535 (7613): 551-55. <https://doi.org/10.1038/nature18928>.
- Head, Brian P., Hemal H. Patel, et Paul A. Insel. 2014. « Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: impact on signaling and function ». *Biochimica et biophysica acta* 1838 (2): 10.1016/j.bbamem.2013.07.018. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.07.018>.
- Helppolainen, Satu H., Kirsi P. Nurminen, Juha A. E. Määttä, Katrin K. Halling, J. Peter Slotte, Tuulia Huhtala, Timo Liimatainen, et al. 2007. « Rhizavidin from *Rhizobium Etli*: The First Natural Dimer in the Avidin Protein Family ». *The Biochemical Journal* 405 (3): 397-405. <https://doi.org/10.1042/BJ20070076>.
- Henis, Yoav I., John F. Hancock, et Ian A. Prior. 2009. « Ras acylation, compartmentalization and signaling nanoclusters (Review) ». *Molecular Membrane Biology* 26 (1-2): 80-92. <https://doi.org/10.1080/09687680802649582>.
- Herbst, Roy S. 2004. « Review of Epidermal Growth Factor Receptor Biology ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 59 (2 Suppl): 21-26. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2003.11.041>.
- Hernando-Rodríguez, Blanca, et Marta Artal-Sanz. 2018. « Mitochondrial Quality Control Mechanisms and the PHB (Prohibitin) Complex ». *Cells* 7 (12): E238. <https://doi.org/10.3390/cells7120238>.
- Hikita, Hayato, Tetsuo Takehara, Satoshi Shimizu, Takahiro Kodama, Minoru Shigekawa, Kyoko Iwase, Atsushi Hosui, et al. 2010. « The Bcl-XL Inhibitor, ABT-737, Efficiently Induces Apoptosis and Suppresses Growth of Hepatoma Cells in Combination with Sorafenib ». *Hepatology* 52 (4): 1310-21. <https://doi.org/10.1002/hep.23836>.
- Höckel, Michael, et Peter Vaupel. 2001. « Tumor Hypoxia: Definitions and Current Clinical, Biologic, and Molecular Aspects ». *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 93 (4): 266-76. <https://doi.org/10.1093/jnci/93.4.266>.
- Höglinger, D., T. Burgoyne, E. Sanchez-Heras, P. Hartwig, A. Colaco, J. Newton, C. E. Futter, S. Spiegel, F. M. Platt, et E. R Eden. 2019. « NPC1 regulates ER contacts with endocytic organelles to mediate cholesterol egress ». *Nature Communications* 10 (septembre): 4276. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12152-2>.
- Howe, C. L., J. S. Valletta, A. S. Rusnak, et W. C. Mobley. 2001. « NGF Signaling from Clathrin-Coated Vesicles: Evidence That Signaling Endosomes Serve as a Platform for the Ras-MAPK Pathway ». *Neuron* 32 (5): 801-14. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00526-8](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00526-8).
- Hu, Xi-min, Zhi-xin Li, Rui-han Lin, Jia-qi Shan, Qing-wei Yu, Rui-xuan Wang, Lv-shuang Liao, et al. 2021. « Guidelines for Regulated Cell Death Assays: A Systematic Summary, A Categorical Comparison, A Prospective ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9: 368. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.634690>.
- Huang, Lamei, Zhixing Guo, Fang Wang, et Liwu Fu. 2021. « KRAS Mutation: From Undruggable to Druggable in Cancer ». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 6 (1): 1-20. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00780-4>.

- Hubbard, Stevan R., et W. Todd Miller. 2007. « Receptor Tyrosine Kinases: Mechanisms of Activation and Signaling ». *Current Opinion in Cell Biology* 19 (2): 117-23. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.02.010>.
- Hung, Victoria, Peng Zou, Hyun-Woo Rhee, Namrata D. Udeshi, Valentin Cracan, Tanya Svinkina, Steven A. Carr, Vamsi K. Mootha, et Alice Y. Ting. 2014. « Proteomic Mapping of the Human Mitochondrial Intermembrane Space in Live Cells via Ratiometric APEX Tagging ». *Molecular Cell* 55 (2): 332-41. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.06.003>.
- Hunter, John C., Anuj Manandhar, Martin A. Carrasco, Deepak Gurbani, Sudershan Gondi, et Kenneth D. Westover. 2015. « Biochemical and Structural Analysis of Common Cancer-Associated KRAS Mutations ». *Molecular Cancer Research: MCR* 13 (9): 1325-35. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-15-0203>.
- Hurley, J. B., M. I. Simon, D. B. Teplow, J. D. Robishaw, et A. G. Gilman. 1984. « Homologies between Signal Transducing G Proteins and Ras Gene Products ». *Science (New York, N.Y.)* 226 (4676): 860-62. <https://doi.org/10.1126/science.6436980>.
- Ichim, Gabriel, et Stephen W. G. Tait. 2016. « A Fate Worse than Death: Apoptosis as an Oncogenic Process ». *Nature Reviews. Cancer* 16 (8): 539-48. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.58>.
- Jain, Rakesh K., John D. Martin, et Triantafyllos Stylianopoulos. 2014. « The role of mechanical forces in tumor growth and therapy ». *Annual review of biomedical engineering* 16 (juillet): 321-46. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071813-105259>.
- Jiang, Xuejun, et Alexander Sorkin. 2002. « Coordinated Traffic of Grb2 and Ras during Epidermal Growth Factor Receptor Endocytosis Visualized in Living Cells ». *Molecular Biology of the Cell* 13 (5): 1522-35. <https://doi.org/10.1091/mbc.01-11-0552>.
- Joensuu, H., L. Pylkkänen, et S. Toikkanen. 1994. « Bcl-2 protein expression and long-term survival in breast cancer. » *The American Journal of Pathology* 145 (5): 1191-98.
- Jones, Michael K., et Janis H. Jackson. 1998. « Ras-GRF Activates Ha-Ras, but Not N-Ras or K-Ras 4B, Protein in Vivo * ». *Journal of Biological Chemistry* 273 (3): 1782-87. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.3.1782>.
- Juin, P., K. Tremblais, M. T. LeCabellec, M. Grégoire, K. Meflah, et F. M. Vallette. 1998. « Potentiation of Apoptosis by Mitochondria in a Cell-Free System ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 253 (1): 185-91. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9742>.
- Juin, Philippe, Pierre François Cartron, et François M. Vallette. 2005. « Activation of Bax by BH3 Domains during Apoptosis: The Unfolding of a Deadly Plot ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 4 (5): 637-42. <https://doi.org/10.4161/cc.4.5.1671>.
- Juin, Philippe, Olivier Geneste, Fabien Gautier, Stéphane Depil, et Mario Campone. 2013. « Decoding and Unlocking the BCL-2 Dependency of Cancer Cells ». *Nature Reviews Cancer* 13 (7): 455-65. <https://doi.org/10.1038/nrc3538>.
- Jura, Natalia, Elizabeth Scotto-Lavino, Aleksander Sobczyk, et Dafna Bar-Sagi. 2006. « Differential Modification of Ras Proteins by Ubiquitination ». *Molecular Cell* 21 (5): 679-87. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.02.011>.

- Kaewsapsak, Pornchai, David Michael Shechner, William Mallard, John L Rinn, et Alice Y Ting. 2017. « Live-cell mapping of organelle-associated RNAs via proximity biotinylation combined with protein-RNA crosslinking ». Édité par Elizabeth R Gavis. *eLife* 6 (décembre): e29224. <https://doi.org/10.7554/eLife.29224>.
- Kalkavan, Halime, et Douglas R Green. 2018. « MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business ». *Cell Death and Differentiation* 25 (1): 46-55. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.179>.
- Karoulia, Zoi, Evripidis Gavathiotis, et Poulikos I. Poulikakos. 2017. « New Perspectives for Targeting RAF Kinase in Human Cancer ». *Nature Reviews Cancer* 17 (11): 676-91. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.79>.
- Kaufmann, Thomas, Sarah Schlipf, Javier Sanz, Karin Neubert, Reuven Stein, et Christoph Borner. 2003. « Characterization of the signal that directs Bcl-xL, but not Bcl-2, to the mitochondrial outer membrane ». *The Journal of Cell Biology* 160 (1): 53-64. <https://doi.org/10.1083/jcb.200210084>.
- Keitel, Ulrike, Andreas Scheel, Jürgen Thomale, Rovena Halpape, Silke Kaulfuß, Christina Scheel, et Matthias Döbelstein. 2014. « Bcl-XL Mediates Therapeutic Resistance of a Mesenchymal Breast Cancer Cell Subpopulation ». *Oncotarget* 5 (23): 11778-91. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2634>.
- Kessler, Dirk, Michael Gmachl, Andreas Mantoulidis, Laetitia J. Martin, Andreas Zoephel, Moriz Mayer, Andreas Gollner, et al. 2019. « Drugging an Undruggable Pocket on KRAS ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116 (32): 15823-29. <https://doi.org/10.1073/pnas.1904529116>.
- Kim, Dae In, Samuel C. Jensen, Kyle A. Noble, Birendra Kc, Kenneth H. Roux, Khatereh Motamedchaboki, et Kyle J. Roux. 2016. « An improved smaller biotin ligase for BioID proximity labeling ». *Molecular Biology of the Cell* 27 (8): 1188-96. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-12-0844>.
- Kim, Seog-Young, Xinxin Song, Lin Zhang, David L. Bartlett, et Yong J. Lee. 2014. « Role of Bcl-XL/Beclin-1 in Interplay between Apoptosis and Autophagy in Oxaliplatin and Bortezomib-Induced Cell Death ». *Biochemical Pharmacology* 88 (2): 178-88. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.01.027>.
- Kingwell, Katie. 2019. « Turning up Mitophagy in Alzheimer Disease ». *Nature Reviews. Drug Discovery*, mars. <https://doi.org/10.1038/d41573-019-00035-6>.
- Kipps, Thomas J., Herbert Eradat, Sebastian Grosicki, John Catalano, Walter Cosolo, Iryna S. Dyagil, Sreeni Yalamanchili, et al. 2015. « A phase 2 study of the BH3 mimetic BCL2 inhibitor navitoclax (ABT-263) with or without rituximab, in previously untreated B-cell chronic lymphocytic leukemia ». *Leukemia & Lymphoma* 56 (10): 2826-33. <https://doi.org/10.3109/10428194.2015.1030638>.
- Kipps, Thomas J., Lode J. Swinnen, William G. Wierda, Jeffrey Alan Jones, Steven E. Coutre, Mitchell R Smith, Jianning Yang, et al. 2011. « Navitoclax (ABT-263) Plus Fludarabine/Cyclophosphamide/Rituximab (FCR) or Bendamustine/Rituximab (BR): A Phase 1 Study in Patients with Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) », *Blood* 118 (21): 3904. <https://doi.org/10.1182/blood.V118.21.3904.3904>.

- Kirsten, W. H., et L. A. Mayer. 1967. « Morphologic Responses to a Murine Erythroblastosis Virus ». *Journal of the National Cancer Institute* 39 (2): 311-35.
- Koch, W J, B E Hawes, L F Allen, et R J Lefkowitz. 1994. « Direct evidence that Gi-coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by G beta gamma activation of p21ras. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (26): 12706-10.
- Koera, Keiko, Kenji Nakamura, Kazuki Nakao, Jun Miyoshi, Kumao Toyoshima, Toshihisa Hatta, Hiroki Otani, Atsu Aiba, et Motoya Katsuki. 1997. « K-Ras Is Essential for the Development of the Mouse Embryo ». *Oncogene* 15 (10): 1151-59. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201284>.
- Kovalski, Joanna R., Aparna Bhaduri, Ashley M. Zehnder, Poornima H. Neela, Yonglu Che, Glenn G. Wozniak, et Paul A. Khavari. 2019. « The Functional Proximal Proteome of Oncogenic Ras Includes MTORC2 ». *Molecular Cell* 73 (4): 830-844.e12. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.12.001>.
- Krajewski, S., S. Tanaka, S. Takayama, M. J. Schibler, W. Fenton, et J. C. Reed. 1993. « Investigation of the Subcellular Distribution of the Bcl-2 Oncoprotein: Residence in the Nuclear Envelope, Endoplasmic Reticulum, and Outer Mitochondrial Membranes ». *Cancer Research* 53 (19): 4701-14.
- Kreso, Antonija, et John E. Dick. 2014. « Evolution of the Cancer Stem Cell Model ». *Cell Stem Cell* 14 (3): 275-91. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.02.006>.
- Kroemer, G., W. S. El-Deiry, P. Golstein, M. E. Peter, D. Vaux, P. Vandenabeele, B. Zhivotovsky, et al. 2005. « Classification of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death ». *Cell Death & Differentiation* 12 (2): 1463-67. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401724>.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, et al. 2009. « Classification of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009 ». *Cell Death & Differentiation* 16 (1): 3-11. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.150>.
- Kröger, Cornelia, Alexander Afeyan, Jasmin Mraz, Elinor Ng Eaton, Ferenc Reinhardt, Yevgenia L. Khodor, Prathapan Thiru, et al. 2019. « Acquisition of a hybrid E/M state is essential for tumorigenicity of basal breast cancer cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116 (15): 7353-62. <https://doi.org/10.1073/pnas.1812876116>.
- Kwon, Keehwan, et Dorothy Beckett. 2000. « Function of a Conserved Sequence Motif in Biotin Holoenzyme Synthetases ». *Protein Science* 9 (8): 1530-39. <https://doi.org/10.1110/ps.9.8.1530>.
- Kwon, Keehwan, Emily D. Streaker, Shreyesh Ruparelia, et Dorothy Beckett. 2000. « Multiple Disordered Loops Function in Corepressor-Induced Dimerization of the Biotin Repressor ». *Journal of Molecular Biology* 304 (5): 821-33. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4249>.
- Lagache, Thibault, Alexandre Grassart, Stéphane Dallongeville, Orestis Faklaris, Nathalie Sauvonnnet, Alexandre Dufour, Lydia Danglot, et Jean-Christophe Olivo-Marin. 2018. « Mapping Molecular Assemblies with Fluorescence Microscopy and Object-Based Spatial Statistics ». *Nature Communications* 9 (1): 698. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03053-x>.

- Laitinen, Olli H., Henri R. Nordlund, Vesa P. Hytönen, et Markku S. Kulomaa. 2007. « Brave New (Strept)Avidins in Biotechnology ». *Trends in Biotechnology* 25 (6): 269-77. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.04.001>.
- Lalier, Lisenn, Pierre-François Cartron, Philippe Juin, Svetlana Nedelkina, Stephen Manon, Burkhardt Bechinger, et François M. Vallette. 2007. « Bax Activation and Mitochondrial Insertion during Apoptosis ». *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death* 12 (5): 887-96. <https://doi.org/10.1007/s10495-007-0749-1>.
- Lam, Stephanie S., Jeffrey D. Martell, Kimberli J. Kamer, Thomas J. Deerinck, Mark H. Ellisman, Vamsi K. Mootha, et Alice Y. Ting. 2015. « Directed Evolution of APEX2 for Electron Microscopy and Proximity Labeling ». *Nature Methods* 12 (1): 51-54. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3179>.
- LaMarche, Matthew J., Michael Acker, Andreea Argintaru, Daniel Bauer, Julie Boisclair, Homan Chan, Christine Hiu-Tung Chen, et al. 2020. « Identification of TNO155, an Allosteric SHP2 Inhibitor for the Treatment of Cancer ». *Journal of Medicinal Chemistry* 63 (22): 13578-94. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01170>.
- Laude, Alex J., et Ian A. Prior. 2008. « Palmitoylation and Localisation of RAS Isoforms Are Modulated by the Hypervariable Linker Domain ». *Journal of Cell Science* 121 (Pt 4): 421-27. <https://doi.org/10.1242/jcs.020107>.
- Le Pogam, Carole, Patricia Krief, Stephanie Beurlet, Annie Soulié, Nicole Balitrand, Bruno Cassinat, Helene Cavé, et al. 2013. « Localization of the NRAS:BCL-2 Complex Determines Anti-Apoptotic Features Associated with Progressive Disease in Myelodysplastic Syndromes ». *Leukemia Research* 37 (3): 312-19. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2012.10.018>.
- Lee, Dae-Hee, Daeho Kim, Sung Tae Kim, Soyeon Jeong, Jung Lim Kim, Sang Mi Shim, Ah Jung Heo, et al. 2018. « PARK7 Modulates Autophagic Proteolysis through Binding to the N-Terminally Arginylated Form of the Molecular Chaperone HSPA5 ». *Autophagy* 14 (11): 1870-85. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1491212>.
- Lee, Song-Yi, Myeong-Gyun Kang, Jong-Seok Park, Geunsik Lee, Alice Y. Ting, et Hyun-Woo Rhee. 2016. « APEX Fingerprinting Reveals the Subcellular Localization of Proteins of Interest ». *Cell Reports* 15 (8): 1837-47. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.064>.
- Lee, Tae Hoon, Shilpa Chennakrishnaiah, Brian Meehan, Laura Montermini, Delphine Garnier, Esterina D'Asti, Wenyang Hou, et al. 2016. « Barriers to Horizontal Cell Transformation by Extracellular Vesicles Containing Oncogenic H-Ras ». *Oncotarget* 7 (32): 51991-2. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10627>.
- Lenos, Kristiaan J., et Louis Vermeulen. 2016. « Cancer stem cells don't waste their time cleaning—low proteasome activity, a marker for cancer stem cell function ». *Annals of Translational Medicine* 4 (24): 519. <https://doi.org/10.21037/atm.2016.11.81>.
- Letai, Anthony, Michael C. Bassik, Loren D. Walensky, Mia D. Sorcinelli, Solly Weiler, et Stanley J. Korsmeyer. 2002. « Distinct BH3 Domains Either Sensitize or Activate Mitochondrial Apoptosis, Serving as Prototype Cancer Therapeutics ». *Cancer Cell* 2 (3): 183-92. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(02\)00127-7](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(02)00127-7).

- Li, Hongmei, Kambiz N. Alavian, Emma Lazrove, Nabil Mehta, Adrienne Jones, Ping Zhang, Pawel Licznanski, et al. 2013. « A Bcl-xL-Drp1 complex regulates synaptic vesicle membrane dynamics during endocytosis ». *Nature cell biology* 15 (7): 773-85. <https://doi.org/10.1038/ncb2791>.
- Li, Mingxue, Dun Wang, Jianhua He, Lixia Chen, et Hua Li. 2020. « Bcl-XL: A Multifunctional Anti-Apoptotic Protein ». *Pharmacological Research* 151 (janvier): 104547. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104547>.
- Liberti, Maria V., et Jason W. Locasale. 2016. « The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? » *Trends in biochemical sciences* 41 (3): 211-18. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>.
- Lieber, Justus, Carmen Eicher, Julia Wenz, Bettina Kirchner, Steven W. Warmann, Jörg Fuchs, et Sorin Armeanu-Ebinger. 2011. « The BH3 mimetic ABT-737 increases treatment efficiency of paclitaxel against hepatoblastoma ». *BMC Cancer* 11 (1): 362. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-362>.
- Lindqvist, Lisa M., Melanie Heinlein, David C. S. Huang, et David L. Vaux. 2014. « Prosurvival Bcl-2 Family Members Affect Autophagy Only Indirectly, by Inhibiting Bax and Bak ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (23): 8512-17. <https://doi.org/10.1073/pnas.1406425111>.
- Lithgow, T., R. van Driel, J. F. Bertram, et A. Strasser. 1994. « The Protein Product of the Oncogene Bcl-2 Is a Component of the Nuclear Envelope, the Endoplasmic Reticulum, and the Outer Mitochondrial Membrane ». *Cell Growth & Differentiation: The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research* 5 (4): 411-17.
- Liu, Juan, Cen Zhang, Yuhan Zhao, Xuetian Yue, Hao Wu, Shan Huang, James Chen, et al. 2017. « Parkin Targets HIF-1 α for Ubiquitination and Degradation to Inhibit Breast Tumor Progression ». *Nature Communications* 8 (1): 1823. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01947-w>.
- Liu, Shuang, Junfen Shi, Hongjuan Li, Jijun Li, Yan Zhu, Binghui Li, et Yinghui Sun. 2022. « Development of a Biotin–Streptavidin-Enhanced Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (BA-ELISA) for High-Throughput Screening of KRASG12C Inhibitors ». *SLAS Discovery*, janvier. <https://doi.org/10.1016/j.slasd.2021.12.007>.
- Liu, X., C. N. Kim, J. Yang, R. Jemmerson, et X. Wang. 1996. « Induction of Apoptotic Program in Cell-Free Extracts: Requirement for DATP and Cytochrome c ». *Cell* 86 (1): 147-57. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80085-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80085-9).
- Liu, Yi Lun, Fritz Lai, James S. Wilmott, Xu Guang Yan, Xiao Ying Liu, Qi Luan, Su Tang Guo, et al. 2014. « Noxa upregulation by oncogenic activation of MEK/ERK through CREB promotes autophagy in human melanoma cells ». *Oncotarget* 5 (22): 11237-51.
- Llambi, Fabien, Tudor Moldoveanu, Stephen W. G. Tait, Lisa Bouchier-Hayes, Jamshid Temirov, Laura L. McCormick, Christopher P. Dillon, et Douglas R. Green. 2011. « A Unified Model of Mammalian BCL-2 Protein Family Interactions at the Mitochondria ». *Molecular Cell* 44 (4): 517-31. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.10.001>.
- Lobell, Robert B., Dongming Liu, Carolyn A. Buser, Joseph P. Davide, Elizabeth DePuy, Kelly Hamilton, Kenneth S. Koblan, et al. 2002. « Preclinical and Clinical Pharmacodynamic Assessment of L-778,123, a Dual Inhibitor of

Farnesyl:Protein Transferase and Geranylgeranyl:Protein Transferase Type-I ». *Molecular Cancer Therapeutics* 1 (9): 747-58.

- Lohard, Steven, Nathalie Bourgeois, Laurent Maillet, Fabien Gautier, Aurélie Fétiveau, Hamza Lasla, Frédérique Nguyen, et al. 2020. « STING-Dependent Paracrine Shapes Apoptotic Priming of Breast Tumors in Response to Anti-Mitotic Treatment ». *Nature Communications* 11 (1): 259. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13689-y>.
- Lombardi, Alyssa A., Andrew A. Gibb, Ehtesham Arif, Devin W. Kolmetzky, Dhanendra Tomar, Timothy S. Luongo, Pooja Jadiya, et al. 2019. « Mitochondrial Calcium Exchange Links Metabolism with the Epigenome to Control Cellular Differentiation ». *Nature Communications* 10 (1): 4509. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12103-x>.
- López de Andrés, Julia, Carmen Griñán-Lisón, Gema Jiménez, et Juan Antonio Marchal. 2020. « Cancer stem cell secretome in the tumor microenvironment: a key point for an effective personalized cancer treatment ». *Journal of Hematology & Oncology* 13 (1): 136. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00966-3>.
- Lu, Albert, Francesc Tebar, Blanca Alvarez-Moya, Cristina López-Alcalá, Maria Calvo, Carlos Enrich, Neus Agell, Takeshi Nakamura, Michiyuki Matsuda, et Oriol Bachs. 2009. « A clathrin-dependent pathway leads to KRas signaling on late endosomes en route to lysosomes ». *The Journal of Cell Biology* 184 (6): 863-79. <https://doi.org/10.1083/jcb.200807186>.
- Lynch, Michael. 2010. « Rate, molecular spectrum, and consequences of human mutation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (3): 961-68. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912629107>.
- Lynch, Stephen J., Harriet Snitkin, Iwona Gumper, Mark R. Philips, David Sabatini, et Angel Pellicer. 2015. « The Differential Palmitoylation States of N-Ras and H-Ras Determine Their Distinct Golgi Sub-compartment Localizations ». *Journal of cellular physiology* 230 (3): 610-19. <https://doi.org/10.1002/jcp.24779>.
- Lyons, Amy, Michael Coleman, Sarah Riis, Cedric Favre, Ciara H. O'Flanagan, Alexander V. Zhdanov, Dmitri B. Papkovsky, Stephen D. Hursting, et Rosemary O'Connor. 2017. « Insulin-like growth factor 1 signaling is essential for mitochondrial biogenesis and mitophagy in cancer cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 292 (41): 16983-98. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.792838>.
- Ma, Yifan, Shiyang Dong, Xuefeng Li, Betty Y. S. Kim, Zhaogang Yang, et Wen Jiang. 2020. « Extracellular Vesicles: An Emerging Nanoplatfrom for Cancer Therapy ». *Frontiers in Oncology* 10: 606906. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.606906>.
- Macdonald, Isabel K., Sandip K. Badyal, Lila Ghamsari, Peter C. E. Moody, et Emma Lloyd Raven. 2006. « Interaction of Ascorbate Peroxidase with Substrates: A Mechanistic and Structural Analysis ». *Biochemistry* 45 (25): 7808-17. <https://doi.org/10.1021/bi0606849>.
- MacVicar, Thomas, et Thomas Langer. 2016. « OPA1 Processing in Cell Death and Disease - the Long and Short of It ». *Journal of Cell Science* 129 (12): 2297-2306. <https://doi.org/10.1242/jcs.159186>.

- Maida, Yoshiko, Masahiro Takakura, Takumi Nishiuchi, Tanihiro Yoshimoto, et Satoru Kyo. 2016. « Exosomal transfer of functional small RNAs mediates cancer-stroma communication in human endometrium ». *Cancer Medicine* 5 (2): 304-14. <https://doi.org/10.1002/cam4.545>.
- Maiuri, M Chiara, Gaëtane Le Toumelin, Alfredo Criollo, Jean-Christophe Rain, Fabien Gautier, Philippe Juin, Ezgi Tasdemir, et al. 2007. « Functional and physical interaction between Bcl-XL and a BH3-like domain in Beclin-1 ». *The EMBO Journal* 26 (10): 2527-39. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601689>.
- Maiuri, Maria Chiara, Alfredo Criollo, et Guido Kroemer. 2010. « Crosstalk between apoptosis and autophagy within the Beclin 1 interactome ». *The EMBO Journal* 29 (3): 515-16. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.377>.
- Malandrino, Noemi, et Robert J. Smith. 2018. « Synthesis, Secretion, and Transport of Peptide Hormones ». In *Principles of Endocrinology and Hormone Action*, édité par Antonino Belfiore et Derek LeRoith, 29-42. Endocrinology. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-44675-2_3.
- Martell, Jeffrey D., Thomas J. Deerinck, Yasemin Sancak, Thomas L. Poulos, Vamsi K. Mootha, Gina E. Sosinsky, Mark H. Ellisman, et Alice Y. Ting. 2012. « Engineered ascorbate peroxidase as a genetically-encoded reporter for electron microscopy ». *Nature biotechnology* 30 (11): 1143-48. <https://doi.org/10.1038/nbt.2375>.
- Martinou, Isabelle, Solange Desagher, Robert Eskes, Bruno Antonsson, Elisabeth André, Stanislav Fakan, et Jean-Claude Martinou. 1999. « The Release of Cytochrome c from Mitochondria during Apoptosis of NGF-deprived Sympathetic Neurons Is a Reversible Event ». *The Journal of Cell Biology* 144 (5): 883-89.
- Maryáš, Josef, Jakub Faktor, Lenka Čápková, Petr Müller, Petr Skládal, et Pavel Bouchal. 2018. « Pull-down Assay on Streptavidin Beads and Surface Plasmon Resonance Chips for SWATH-MS-Based Interactomics ». *Cancer Genomics & Proteomics* 15 (5): 395-404. <https://doi.org/10.21873/cgp.20098>.
- Mason, Kylie D., Marina R. Carpinelli, Jamie I. Fletcher, Janelle E. Collinge, Adrienne A. Hilton, Sarah Ellis, Priscilla N. Kelly, et al. 2007. « Programmed Anuclear Cell Death Delimits Platelet Life Span ». *Cell* 128 (6): 1173-86. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.037>.
- Mason, Kylie D., Cassandra J. Vandenberg, Clare L. Scott, Andrew H. Wei, Suzanne Cory, David C. S. Huang, et Andrew W. Roberts. 2008. « In vivo efficacy of the Bcl-2 antagonist ABT-737 against aggressive Myc-driven lymphomas ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (46): 17961-66. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809957105>.
- Masson, Elsevier. s. d. « Gestion des toxicités des inhibiteurs BRAF et MEK dans le mélanome métastatique ». EM-Consulte. Consulté le 24 mars 2022. <https://www.em-consulte.com/article/1437694/gestion-des-toxicites-des-inhibiteurs-braf-et-mek->.
- Mathai, Jaigi P., Marc Germain, et Gordon C. Shore. 2005. « BH3-Only BIK Regulates BAX,BAK-Dependent Release of Ca²⁺ from Endoplasmic Reticulum Stores and Mitochondrial Apoptosis during Stress-Induced Cell Death ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (25): 23829-36. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500800200>.

- Mathieu, Mathilde, Lorena Martin-Jaular, Grégory Lavieau, et Clotilde Théry. 2019. « Specificities of Secretion and Uptake of Exosomes and Other Extracellular Vesicles for Cell-to-Cell Communication ». *Nature Cell Biology* 21 (1): 9-17. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0250-9>.
- May, Elena A., Marian Kalocsay, Inès Galtier D'Auriac, Patrick S. Schuster, Steven P. Gygi, Maxence V. Nachury, et David U. Mick. 2021. « Time-Resolved Proteomics Profiling of the Ciliary Hedgehog Response ». *The Journal of Cell Biology* 220 (5): e202007207. <https://doi.org/10.1083/jcb.202007207>.
- McCarthy, Michael J., Cynthia V. Pagba, Priyanka Prakash, Ali K. Najj, Dharini van der Hoeven, Hong Liang, Amit K. Gupta, et al. 2019. « Discovery of High-Affinity Noncovalent Allosteric KRAS Inhibitors That Disrupt Effector Binding ». *ACS Omega* 4 (2): 2921-30. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b03308>.
- McGrath, John P., Daniel J. Capon, David V. Goeddel, et Arthur D. Levinson. 1984. « Comparative Biochemical Properties of Normal and Activated Human Ras P21 Protein ». *Nature* 310 (5979): 644-49. <https://doi.org/10.1038/310644a0>.
- McNally, Melanie A., Lucian Soane, Brian A. Roelofs, Adam L. Hartman, et J. Marie Hardwick. 2013. « The N-Terminal Helix of Bcl-XL Targets Mitochondria ». *Mitochondrion* 13 (2): 119-24. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2013.01.004>.
- McWilliams, Thomas G., Alan R. Prescott, Lambert Montava-Garriga, Graeme Ball, François Singh, Erica Barini, Miratul M. K. Muqit, Simon P. Brooks, et Ian G. Ganley. 2018. « Basal Mitophagy Occurs Independently of PINK1 in Mouse Tissues of High Metabolic Demand ». *Cell Metabolism* 27 (2): 439-449.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.12.008>.
- Meacham, Corbin E., et Sean J. Morrison. 2013. « Tumour Heterogeneity and Cancer Cell Plasticity ». *Nature* 501 (7467): 328-37. <https://doi.org/10.1038/nature12624>.
- Melkonian, K. A., A. G. Ostermeyer, J. Z. Chen, M. G. Roth, et D. A. Brown. 1999. « Role of Lipid Modifications in Targeting Proteins to Detergent-Resistant Membrane Rafts. Many Raft Proteins Are Acylated, While Few Are Prenylated ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (6): 3910-17. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.6.3910>.
- Mellacheruvu, Dattatreya, Zachary Wright, Amber L. Couzens, Jean-Philippe Lambert, Nicole St-Denis, Tuo Li, Yana V. Miteva, et al. 2013. « The CRAPome: a Contaminant Repository for Affinity Purification Mass Spectrometry Data ». *Nature methods* 10 (8): 730-36. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2557>.
- Mick, David U., Rachel B. Rodrigues, Ryan D. Leib, Christopher M. Adams, Allis S. Chien, Steven P. Gygi, et Maxence V. Nachury. 2015. « Proteomics of Primary Cilia by Proximity Labeling ». *Developmental Cell* 35 (4): 497-512. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.10.015>.
- Monian, P., et X. Jiang. 2012. « Clearing the Final Hurdles to Mitochondrial Apoptosis: Regulation Post Cytochrome C Release ». *Experimental Oncology* 34 (3): 185-91.
- Montero, Joan, et Antony Letai. 2018. « Why Do BCL-2 Inhibitors Work and Where Should We Use Them in the Clinic? ». *Cell Death and Differentiation* 25 (1): 56-64. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.183>.

- Montero, Joan, Kristopher A. Sarosiek, Joseph D. DeAngelo, Ophélie Maertens, Jeremy Ryan, Dalia Ercan, Huiying Piao, et al. 2015. « Drug-Induced Death Signaling Strategy Rapidly Predicts Cancer Response to Chemotherapy ». *Cell* 160 (5): 977-89. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.042>.
- Morgenstern, Marcel, Sebastian B. Stiller, Philipp Lübbert, Christian D. Peikert, Stefan Dannenmaier, Friedel Drepper, Uri Weill, et al. 2017. « Definition of a High-Confidence Mitochondrial Proteome at Quantitative Scale ». *Cell Reports* 19 (13): 2836-52. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.014>.
- Moschoi, Ruxanda, Véronique Imbert, Marielle Nebout, Johanna Chiche, Didier Mary, Thomas Prebet, Estelle Saland, et al. 2016. « Protective Mitochondrial Transfer from Bone Marrow Stromal Cells to Acute Myeloid Leukemic Cells during Chemotherapy ». *Blood* 128 (2): 253-64. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-07-655860>.
- Moskal, Natalia, Victoria Riccio, Mikhail Bashkurov, Rediet Taddese, Alessandro Datti, Peter N. Lewis, et G. Angus McQuibban. 2020. « ROCK Inhibitors Upregulate the Neuroprotective Parkin-Mediated Mitophagy Pathway ». *Nature Communications* 11 (1): 88. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13781-3>.
- Munaron, L., S. Antoniotti, et D. Lovisolo. 2004. « Intracellular calcium signals and control of cell proliferation: how many mechanisms? » *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 8 (2): 161-68. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2004.tb00271.x>.
- Munhoz, Rodrigo Ramella, et Michael Andrew Postow. 2016. « Recent advances in understanding antitumor immunity ». *F1000Research* 5 (octobre): 2545. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9356.1>.
- Murphy, Elizabeth, Hossein Ardehali, Robert S. Balaban, Fabio DiLisa, Gerald W. Dorn, Richard N. Kitsis, Kinya Otsu, et al. 2016. « Mitochondrial Function, Biology, and Role in Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association ». *Circulation Research* 118 (12): 1960-91. <https://doi.org/10.1161/RES.000000000000104>.
- Nadal, Ernest, Guoan Chen, John R. Prensner, Hiroe Shiratsuchi, Christine Sam, Lili Zhao, Gregory P. Kalemkerian, et al. 2014. « KRAS-G12C Mutation Is Associated with Poor Outcome in Surgically Resected Lung Adenocarcinoma ». *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 9 (10): 1513-22. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000305>.
- Ni Chonghaile, T., et A. Letai. 2008. « Mimicking the BH3 Domain to Kill Cancer Cells ». *Oncogene* 27 Suppl 1 (décembre): S149-157. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.52>.
- Nocquet, Lisa, Philippe Juin, et Frédérique Souazé. 2020. « Mitochondria at Center of Exchanges between Cancer Cells and Cancer-Associated Fibroblasts during Tumor Progression ». *Cancers* 12 (octobre). <https://doi.org/10.3390/cancers12103017>.
- Novack, D. V., et S. J. Korsmeyer. 1994. « Bcl-2 protein expression during murine development. » *The American Journal of Pathology* 145 (1): 61-73.
- Oh, Kyoung Joon, Pawan Singh, Kyungro Lee, Kelly Foss, Shinyoub Lee, Minji Park, Steffi Lee, et al. 2010. « Conformational Changes in BAK, a Pore-Forming Proapoptotic Bcl-2 Family Member, upon Membrane Insertion and Direct

- Evidence for the Existence of BH3-BH3 Contact Interface in BAK Homo-Oligomers ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (37): 28924-37. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.135293>.
- Oksvold, M. P., E. Skarpen, B. Lindeman, N. Roos, et H. S. Huitfeldt. 2000. « Immunocytochemical Localization of Shc and Activated EGF Receptor in Early Endosomes after EGF Stimulation of HeLa Cells ». *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 48 (1): 21-33. <https://doi.org/10.1177/002215540004800103>.
- Oliveras-Ferraro, Cristina, Bruna Corominas-Faja, Sílvia Cufí, Alejandro Vazquez-Martin, Begoña Martín-Castillo, Juan Manuel Iglesias, Eugeni López-Bonet, Ángel G. Martín, et Javier A. Menendez. 2012. « Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) Confers Primary Resistance to Trastuzumab (Herceptin) ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 11 (21): 4020-32. <https://doi.org/10.4161/cc.22225>.
- Omerovic, J., D. E. Hammond, M. J. Clague, et I. A. Prior. 2008. « Ras Isoform Abundance and Signalling in Human Cancer Cell Lines ». *Oncogene* 27 (19): 2754-62. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210925>.
- Omerovic, J., A. J. Laude, et I. A. Prior. 2007. « Ras Proteins: Paradigms for Compartmentalised and Isoform-Specific Signalling ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 64 (19-20): 2575-89. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7133-8>.
- Omidvar, Nader, Scott Kogan, Stephanie Beurlet, Carole le Pogam, Anne Janin, Robert West, Maria-Elena Noguera, et al. 2007. « BCL-2 and Mutant NRAS Interact Physically and Functionally in a Mouse Model of Progressive Myelodysplasia ». *Cancer Research* 67 (24): 11657-67. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0196>.
- Ostrem, Jonathan M. L., et Kevan M. Shokat. 2016. « Direct Small-Molecule Inhibitors of KRAS: From Structural Insights to Mechanism-Based Design ». *Nature Reviews Drug Discovery* 15 (11): 771-85. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.139>.
- Ostrem, Jonathan M., Ulf Peters, Martin L. Sos, James A. Wells, et Kevan M. Shokat. 2013. « K-Ras(G12C) Inhibitors Allosterically Control GTP Affinity and Effector Interactions ». *Nature* 503 (7477): 548-51. <https://doi.org/10.1038/nature12796>.
- Palikaras, Konstantinos, Eirini Lionaki, et Nektarios Tavernarakis. 2018. « Mechanisms of Mitophagy in Cellular Homeostasis, Physiology and Pathology ». *Nature Cell Biology* 20 (9): 1013-22. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0176-2>.
- Park, Cheol-Min, Milan Bruncko, Jessica Adickes, Joy Bauch, Hong Ding, Aaron Kunzer, Kennan C. Marsh, et al. 2008. « Discovery of an Orally Bioavailable Small Molecule Inhibitor of Prosurvival B-Cell Lymphoma 2 Proteins ». *Journal of Medicinal Chemistry* 51 (21): 6902-15. <https://doi.org/10.1021/jm800669s>.
- Patel, S., S. K. Joseph, et A. P. Thomas. 1999. « Molecular Properties of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors ». *Cell Calcium* 25 (3): 247-64. <https://doi.org/10.1054/ceca.1999.0021>.
- Pece, Salvatore, Daniela Tosoni, Stefano Confalonieri, Giovanni Mazzarol, Manuela Vecchi, Simona Ronzoni, Loris Bernard, Giuseppe Viale, Pier Giuseppe

- Pelicci, et Pier Paolo Di Fiore. 2010. « Biological and Molecular Heterogeneity of Breast Cancers Correlates with Their Cancer Stem Cell Content ». *Cell* 140 (1): 62-73. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.12.007>.
- Pécot, Jessie, Laurent Maillet, Janic Le Pen, Céline Vuillier, Sophie de Carné Trécesson, Aurélie Fétiveau, Kristopher A. Sarosiek, et al. 2016. « Tight Sequestration of BH3 Proteins by BCL-XL at Subcellular Membranes Contributes to Apoptotic Resistance ». *Cell Reports* 17 (12): 3347-58. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.11.064>.
- Pfeffer, Claire M., et Amareshwar T. K. Singh. 2018. « Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy ». *International Journal of Molecular Sciences* 19 (2): 448. <https://doi.org/10.3390/ijms19020448>.
- Phinney, Donald G., Michelangelo Di Giuseppe, Joel Njah, Ernest Sala, Sruti Shiva, Claudette M. St Croix, Donna B. Stolz, et al. 2015. « Mesenchymal Stem Cells Use Extracellular Vesicles to Outsource Mitophagy and Shuttle MicroRNAs ». *Nature Communications* 6 (octobre): 8472. <https://doi.org/10.1038/ncomms9472>.
- Pickles, Sarah, Pierre Vigié, et Richard J. Youle. 2018. « Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance ». *Current Biology* 28 (4): R170-85. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.004>.
- Plowman, Sarah J., Cornelia Muncke, Robert G. Parton, et John F. Hancock. 2005. « H-Ras, K-Ras, and Inner Plasma Membrane Raft Proteins Operate in Nanoclusters with Differential Dependence on the Actin Cytoskeleton ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (43): 15500-505. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504114102>.
- Polier, Gernot, Jennifer Neumann, Frédéric Thuaud, Nigel Ribeiro, Christoph Gelhaus, Hendrik Schmidt, Marco Giaisi, et al. 2012. « The Natural Anticancer Compounds Rocaglamides Inhibit the Raf-MEK-ERK Pathway by Targeting Prohibitin 1 and 2 ». *Chemistry & Biology* 19 (9): 1093-1104. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.07.012>.
- Ponti, Dario, Aurora Costa, Nadia Zaffaroni, Graziella Pratesi, Giovanna Petrangolini, Danila Coradini, Silvana Pilotti, Marco A. Pierotti, et Maria Grazia Daidone. 2005. « Isolation and in Vitro Propagation of Tumorigenic Breast Cancer Cells with Stem/Progenitor Cell Properties ». *Cancer Research* 65 (13): 5506-11. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0626>.
- Potenza, Nicoletta, Carmine Vecchione, Antonella Notte, Assunta De Rienzo, Annamaria Rosica, Lisa Bauer, Andrea Affuso, et al. 2005. « Replacement of K-Ras with H-Ras Supports Normal Embryonic Development despite Inducing Cardiovascular Pathology in Adult Mice ». *EMBO Reports* 6 (5): 432-37. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400397>.
- Priault, M., B. Salin, J. Schaeffer, F. M. Vallette, J.-P. di Rago, et J.-C. Martinou. 2005. « Impairing the Bioenergetic Status and the Biogenesis of Mitochondria Triggers Mitophagy in Yeast ». *Cell Death & Differentiation* 12 (12): 1613-21. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401697>.
- Priault, Muriel, Erika Hue, Fanny Marhuenda, Paul Pilet, Lisa Oliver, et François M. Vallette. 2010. « Differential Dependence on Beclin 1 for the Regulation of Pro-Survival Autophagy by Bcl-2 and Bcl-XL in HCT116 Colorectal Cancer Cells ». *PLoS One* 5 (1): e8755. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008755>.

- Pulciani, S., E. Santos, A. V. Lauver, L. K. Long, et M. Barbacid. 1982. « Transforming Genes in Human Tumors ». *Journal of Cellular Biochemistry* 20 (1): 51-61. <https://doi.org/10.1002/jcb.240200106>.
- Qian, Xiaolan, Tatiana Karpova, Allan M. Sheppard, James McNally, et Douglas R. Lowy. 2004. « E-Cadherin-Mediated Adhesion Inhibits Ligand-Dependent Activation of Diverse Receptor Tyrosine Kinases ». *The EMBO Journal* 23 (8): 1739-48. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600136>.
- Quinlan, Margaret P., et Jeffrey Settleman. 2008. « Explaining the Preponderance of Kras Mutations in Human Cancer: An Isoform-Specific Function in Stem Cell Expansion ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 7 (10): 1332-35. <https://doi.org/10.4161/cc.7.10.5927>.
- Rabara, Dana, Timothy H. Tran, Srisathyanarayanan Dharmiah, Robert M. Stephens, Frank McCormick, Dharendra K. Simanshu, et Matthew Holderfield. 2019. « KRAS G13D Sensitivity to Neurofibromin-Mediated GTP Hydrolysis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116 (44): 22122-31. <https://doi.org/10.1073/pnas.1908353116>.
- Racker, E, R J Resnick, et R Feldman. 1985. « Glycolysis and methylaminoisobutyrate uptake in rat-1 cells transfected with ras or myc oncogenes. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82 (11): 3535-38. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.11.3535>.
- Raffo, Anthony J., Harris Perlman, Min-Wei Chen, Mark L. Day, Jack S. Streitman, et Ralph Buttyan. 1995. « Overexpression of bcl-2 Protects Prostate Cancer Cells from Apoptosis in Vitro and Confers Resistance to Androgen Depletion in Vivo1 ». *Cancer Research* 55 (19): 4438-45.
- Rafiee, Mahmoud-Reza, Gianluca Sigismondo, Mathias Kalxdorf, Laura Förster, Britta Brügger, Julien Béthune, et Jeroen Krijgsveld. 2020. « Protease-Resistant Streptavidin for Interaction Proteomics ». *Molecular Systems Biology* 16 (5): e9370.
- Rajalingam, Krishnaraj, Christian Wunder, Volker Brinkmann, Yuri Churin, Mirko Hekman, Claudia Sievers, Ulf R. Rapp, et Thomas Rudel. 2005. « Prohibitin Is Required for Ras-Induced Raf-MEK-ERK Activation and Epithelial Cell Migration ». *Nature Cell Biology* 7 (8): 837-43. <https://doi.org/10.1038/ncb1283>.
- Ramakrishnan, V., M. Timm, J. L. Haug, T. K. Kimlinger, L. E. Wellik, T. E. Witzig, S. V. Rajkumar, A. A. Adjei, et S. Kumar. 2010. « Sorafenib, a Dual Raf Kinase/Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Inhibitor Has Significant Anti-Myeloma Activity and Synergizes with Common Anti-Myeloma Drugs ». *Oncogene* 29 (8): 1190-1202. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.403>.
- Ramanathan, Muthukumar, Karim Majzoub, Deepti S. Rao, Poornima H. Neela, Brian J. Zarnegar, Smarajit Mondal, Julien G. Roth, et al. 2018. « RNA-Protein Interaction Detection in Living Cells ». *Nature Methods* 15 (3): 207-12. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4601>.
- Ramesh, Prashanthi, Tamsin R. M. Lannagan, Rene Jackstadt, Lidia Atencia Taboada, Nico Lansu, Pratyaksha Wirapati, Sander R. van Hooff, et al. 2021. « BCL-XL Is Crucial for Progression through the Adenoma-to-Carcinoma Sequence of Colorectal Cancer ». *Cell Death & Differentiation* 28 (12): 3282-96. <https://doi.org/10.1038/s41418-021-00816-w>.

- Raven, Emma Lloyd. 2003. « Understanding Functional Diversity and Substrate Specificity in Haem Peroxidases: What Can We Learn from Ascorbate Peroxidase? » *Natural Product Reports* 20 (4): 367-81. <https://doi.org/10.1039/B210426C>.
- Ravindran, Rishith, Anoop Kumar G. Velikkakath, Nikhil Dev Narendradev, Aneesh Chandrasekharan, T. R. Santhoshkumar, et Srinivasa M. Srinivasula. 2022. « Endosomal-Associated RFFL Facilitates Mitochondrial Clearance by Enhancing PRKN/Parkin Recruitment to Mitochondria ». *Autophagy*, avril, 1-14. <https://doi.org/10.1080/15548627.2022.2052460>.
- Rebollo, Angelita, Dolores Pérez-Sala, et Carlos Martínez-A. 1999. « Bcl-2 Differentially Targets K-, N-, and H-Ras to Mitochondria in IL-2 Supplemented or Deprived Cells: Implications in Prevention of Apoptosis ». *Oncogene* 18 (35): 4930-39. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202875>.
- Reed, JC. 1994. « Bcl-2 and the regulation of programmed cell death ». *Journal of Cell Biology* 124 (1): 1-6. <https://doi.org/10.1083/jcb.124.1.1>.
- Rhee, Hyun-Woo, Peng Zou, Namrata D. Udeshi, Jeffrey D. Martell, Vamsi K. Mootha, Steven A. Carr, et Alice Y. Ting. 2013. « Proteomic Mapping of Mitochondria in Living Cells via Spatially Restricted Enzymatic Tagging ». *Science (New York, N.Y.)* 339 (6125): 1328-31. <https://doi.org/10.1126/science.1230593>.
- Rhim, Andrew D., Emily T. Mirek, Nicole M. Aiello, Anirban Maitra, Jennifer M. Bailey, Florencia McAllister, Maximilian Reichert, et al. 2012. « EMT and Dissemination Precede Pancreatic Tumor Formation ». *Cell* 148 (1-2): 349-61. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.025>.
- Riley, Joel S, et Stephen WG Tait. 2020. « Mitochondrial DNA in inflammation and immunity ». *EMBO Reports* 21 (4): e49799. <https://doi.org/10.15252/embr.201949799>.
- Rojas, Ana Maria, Gloria Fuentes, Antonio Rausell, et Alfonso Valencia. 2012. « The Ras protein superfamily: Evolutionary tree and role of conserved amino acids ». *Journal of Cell Biology* 196 (2): 189-201. <https://doi.org/10.1083/jcb.201103008>.
- Roux, Kyle J., Dae In Kim, Manfred Raida, et Brian Burke. 2012. « A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells ». *Journal of Cell Biology* 196 (6): 801-10. <https://doi.org/10.1083/jcb.201112098>.
- Russell, Oliver M., Gráinne S. Gorman, Robert N. Lightowlers, et Doug M. Turnbull. 2020. « Mitochondrial Diseases: Hope for the Future ». *Cell* 181 (1): 168-88. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.051>.
- Safa, Ahmad R. 2016. « Resistance to Cell Death and Its Modulation in Cancer Stem Cells ». *Critical reviews in oncogenesis* 21 (3-4): 203-19. <https://doi.org/10.1615/CritRevOncog.2016016976>.
- Saito, Toyofumi, et Jun-Ichiro Toriwaki. 1994. « New algorithms for euclidean distance transformation of an n-dimensional digitized picture with applications ». *Pattern Recognition* 27 (janvier): 1551-65. [https://doi.org/10.1016/0031-3203\(94\)90133-3](https://doi.org/10.1016/0031-3203(94)90133-3).
- Salvesen, Guy S., et Colin S. Duckett. 2002. « IAP Proteins: Blocking the Road to Death's Door ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 3 (6): 401-10. <https://doi.org/10.1038/nrm830>.

- Sancho, Patricia, David Barneda, et Christopher Heeschen. 2016. « Hallmarks of Cancer Stem Cell Metabolism ». *British Journal of Cancer* 114 (12): 1305-12. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.152>.
- Sardet, Christian, Rémi Dumollard, et Alex McDougall. 2006. « Signals and Calcium Waves at Fertilization ». *Seminars in Cell & Developmental Biology*, The Wnt Signaling Pathway and Embryonic Polarity, 17 (2): 223-25. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2006.03.001>.
- Schopp, Isabel Myriam, Cinthia Claudia Amaya Ramirez, Jerneja Debeljak, Elisa Kreibich, Merle Skribbe, Klemens Wild, et Julien Béthune. 2017. « Split-BioID a Conditional Proteomics Approach to Monitor the Composition of Spatiotemporally Defined Protein Complexes ». *Nature Communications* 8 (1): 15690. <https://doi.org/10.1038/ncomms15690>.
- Schweichel, J. U., et H. J. Merker. 1973. « The Morphology of Various Types of Cell Death in Prenatal Tissues ». *Teratology* 7 (3): 253-66. <https://doi.org/10.1002/tera.1420070306>.
- Schwitalla, Sarah, Alexander A. Fingerle, Patrizia Cammareri, Tim Nebelsiek, Serkan I. Göktuna, Paul K. Ziegler, Ozge Canli, et al. 2013. « Intestinal Tumorigenesis Initiated by Dedifferentiation and Acquisition of Stem-Cell-like Properties ». *Cell* 152 (1-2): 25-38. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.012>.
- Seguin, Laetitia, Shumei Kato, Aleksandra Franovic, M. Fernanda Camargo, Jacqueline Lesperance, Kathryn C. Elliott, Mayra Yebra, et al. 2014. « An Integrin B₃-KRAS-RalB Complex Drives Tumour Stemness and Resistance to EGFR Inhibition ». *Nature Cell Biology* 16 (5): 457-68. <https://doi.org/10.1038/ncb2953>.
- Sequist, Lecia V., Belinda A. Waltman, Dora Dias-Santagata, Subba Digumarthy, Alexa B. Turke, Panos Fidias, Kristin Bergethon, et al. 2011. « Genotypic and Histological Evolution of Lung Cancers Acquiring Resistance to EGFR Inhibitors ». *Science Translational Medicine* 3 (75): 75ra26. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002003>.
- Shalini, S, L Dorstyn, S Dawar, et S Kumar. 2015. « Old, new and emerging functions of caspases ». *Cell Death and Differentiation* 22 (4): 526-39. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.216>.
- Shamas-Din, Aisha, Justin Kale, Brian Leber, et David W. Andrews. 2013. « Mechanisms of Action of Bcl-2 Family Proteins ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (4): a008714. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008714>.
- Shanmughapriya, Santhanam, Dianne Langford, et Kalimthusamy Natarajaseenivasan. 2020. « Inter and Intracellular Mitochondrial Trafficking in Health and Disease ». *Ageing Research Reviews* 62 (septembre): 101128. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101128>.
- Sharp, Katherine H., Peter C. E. Moody, et Emma Lloyd Raven. 2003. « A New Framework for Understanding Substrate Binding and Functional Diversity in Haem Peroxidases ». *Dalton Transactions*, n° 22 (novembre): 4208-15. <https://doi.org/10.1039/B309648N>.
- She, Zhou, Min Xie, Marady Hun, Amin Sheikh Abdirahman, Cuifang Li, Feifeng Wu, Senlin Luo, Wuqing Wan, Chuan Wen, et Jidong Tian. 2020. « Immunoregulatory Effects of Mitochondria Transferred by Extracellular

- Sheridan, C., G. Brumatti, M. Elgendy, M. Brunet, et S. J. Martin. 2010. « An ERK-Dependent Pathway to Noxa Expression Regulates Apoptosis by Platinum-Based Chemotherapeutic Drugs ». *Oncogene* 29 (49): 6428-41. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.380>.
- Shi, Ruoyang, Matthew Guberman, et Lorrie A. Kirshenbaum. 2018. « Mitochondrial Quality Control: The Role of Mitophagy in Aging ». *Trends in Cardiovascular Medicine* 28 (4): 246-60. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2017.11.008>.
- Shibue, Tsukasa, et Robert A. Weinberg. 2017. « EMT, CSCs, and Drug Resistance: The Mechanistic Link and Clinical Implications ». *Nature Reviews. Clinical Oncology* 14 (10): 611-29. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.44>.
- Shimizu, K., M. Goldfarb, Y. Suard, M. Perucho, Y. Li, T. Kamata, J. Feramisco, E. Stavnezer, J. Fogh, et M. H. Wigler. 1983. « Three Human Transforming Genes Are Related to the Viral Ras Oncogenes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80 (8): 2112-16. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.8.2112>.
- Shimizu, S., Y. Shinohara, et Y. Tsujimoto. 2000. « Bax and Bcl-XL Independently Regulate Apoptotic Changes of Yeast Mitochondria That Require VDAC but Not Adenine Nucleotide Translocator ». *Oncogene* 19 (38): 4309-18. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203788>.
- Son, Jaekyoung, Costas A. Lyssiotis, Haoqiang Ying, Xiaoxu Wang, Sujun Hua, Matteo Ligorio, Rushika M. Perera, et al. 2013. « Glutamine Supports Pancreatic Cancer Growth through a KRAS-Regulated Metabolic Pathway ». *Nature* 496 (7443): 101-5. <https://doi.org/10.1038/nature12040>.
- Song, Moshi, Katsuyoshi Mihara, Yun Chen, Luca Scorrano, et Gerald W. Dorn. 2015. « Mitochondrial Fission and Fusion Factors Reciprocally Orchestrate Mitophagic Culling in Mouse Hearts and Cultured Fibroblasts ». *Cell Metabolism* 21 (2): 273-86. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.12.011>.
- Song, Qingxuan, Sofia D. Merajver, et Jun Z. Li. 2015. « Cancer classification in the genomic era: five contemporary problems ». *Human Genomics* 9 (octobre): 27. <https://doi.org/10.1186/s40246-015-0049-8>.
- Song, Zhendong, Meijing Wang, Yang Ge, Xue-Ping Chen, Ziyang Xu, Yang Sun, et Xiao-Feng Xiong. 2021. « Tyrosine Phosphatase SHP2 Inhibitors in Tumor-Targeted Therapies ». *Acta Pharmaceutica Sinica. B* 11 (1): 13-29. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.07.010>.
- Steensel, Bas van, et Steven Henikoff. 2000. « Identification of in Vivo DNA Targets of Chromatin Proteins Using Tethered Dam Methyltransferase ». *Nature Biotechnology* 18 (4): 424-28. <https://doi.org/10.1038/74487>.
- Streaker, Emily D., et Dorothy Beckett. 2006. « Nonenzymatic Biotinylation of a Biotin Carboxyl Carrier Protein: Unusual Reactivity of the Physiological Target Lysine ». *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 15 (8): 1928-35. <https://doi.org/10.1110/ps.062187306>.
- Sugiura, Ayumu, Gian-Luca McLelland, Edward A. Fon, et Heidi M. McBride. 2014. « A New Pathway for Mitochondrial Quality Control: Mitochondrial-Derived Vesicles ». *The EMBO Journal* 33 (19): 2142-56. <https://doi.org/10.15252/emboj.201488104>.

- Sun, Nuo, Jeanho Yun, Jie Liu, Daniela Malide, Chengyu Liu, Ilsa I. Rovira, Kira M. Holmström, et al. 2015. « Measuring In Vivo Mitophagy ». *Molecular Cell* 60 (4): 685-96. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.009>.
- Sung, Pamela J., Frederick D. Tsai, Horia Vais, Helen Court, Jun Yang, Nicole Fehrenbacher, J. Kevin Foskett, et Mark R. Philips. 2013. « Phosphorylated K-Ras Limits Cell Survival by Blocking Bcl-XL Sensitization of Inositol Trisphosphate Receptors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (51): 20593-98. <https://doi.org/10.1073/pnas.1306431110>.
- Surve, Sachin V., Paul J. Myers, Samantha A. Clayton, Simon C. Watkins, Matthew J. Lazzara, et Alexander Sorkin. 2019. « Localization Dynamics of Endogenous Fluorescently Labeled RAF1 in EGF-Stimulated Cells ». *Molecular Biology of the Cell* 30 (4): 506-23. <https://doi.org/10.1091/mbc.E18-08-0512>.
- Surve, Sachin, Simon C. Watkins, et Alexander Sorkin. 2021. « EGFR-RAS-MAPK signaling is confined to the plasma membrane and associated endorecycling protrusions ». *Journal of Cell Biology* 220 (11): e202107103. <https://doi.org/10.1083/jcb.202107103>.
- Sweet, Raymond W., Shiro Yokoyama, Tohru Kamata, James R. Feramisco, Martin Rosenberg, et Mitchell Gross. 1984. « The Product of Ras Is a GTPase and the T24 Oncogenic Mutant Is Deficient in This Activity ». *Nature* 311 (5983): 273-75. <https://doi.org/10.1038/311273a0>.
- Tait, Stephen W.G., Melissa J. Parsons, Fabien Llambi, Lisa Bouchier-Hayes, Samuel Connell, Cristina Muñoz-Pinedo, et Douglas R. Green. 2010. « Resistance to caspase-independent cell death requires persistence of intact mitochondria ». *Developmental cell* 18 (5): 802-13. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.03.014>.
- Takehara, Tetsuo, et Hiroshi Takahashi. 2003. « Suppression of Bcl-XL Deamidation in Human Hepatocellular Carcinomas ». *Cancer Research* 63 (12): 3054-57.
- Tanaka, Katsunori, Satomi Yokoi, Koji Morimoto, Takayuki Iwata, Yuka Nakamoto, Kaori Nakayama, Koichi Koyama, Takeshi Fujiwara, et Koichi Fukase. 2012. « Cell Surface Biotinylation by Azaelectrocyclization: Easy-Handling and Versatile Approach for Living Cell Labeling ». *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 20 (6): 1865-68. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.12.043>.
- Tang, Daolin, Rui Kang, Tom Vanden Berghe, Peter Vandenabeele, et Guido Kroemer. 2019. « The Molecular Machinery of Regulated Cell Death ». *Cell Research* 29 (5): 347-64. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0164-5>.
- Taparowsky, E., Y. Suard, O. Fasano, K. Shimizu, M. Goldfarb, et M. Wigler. 1982. « Activation of the T24 Bladder Carcinoma Transforming Gene Is Linked to a Single Amino Acid Change ». *Nature* 300 (5894): 762-65. <https://doi.org/10.1038/300762a0>.
- Taveras, A. G., S. W. Remiszewski, R. J. Doll, D. Cesarz, E. C. Huang, P. Kirschmeier, B. N. Pramanik, et al. 1997. « Ras Oncoprotein Inhibitors: The Discovery of Potent, Ras Nucleotide Exchange Inhibitors and the Structural Determination of a Drug-Protein Complex ». *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 5 (1): 125-33. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(96\)00202-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(96)00202-7).
- Théry, Clotilde, Kenneth W. Witwer, Elena Aikawa, Maria Jose Alcaraz, Johnathon D. Anderson, Ramarosan Andriantsitohaina, Anna Antoniou, et al. 2018.

- « Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles 2018 (MISEV2018): A Position Statement of the International Society for Extracellular Vesicles and Update of the MISEV2014 Guidelines ». *Journal of Extracellular Vesicles* 7 (1): 1535750. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>.
- Thiery, Jean Paul, Hervé Acloque, Ruby Y. J. Huang, et M. Angela Nieto. 2009. « Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease ». *Cell* 139 (5): 871-90. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.007>.
- Tilokani, Lisa, Shun Nagashima, Vincent Paupe, et Julien Prudent. 2018. « Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms ». Édité par Caterina Garone et Michal Minczuk. *Essays in Biochemistry* 62 (3): 341-60. <https://doi.org/10.1042/EBC20170104>.
- Todkar, Kiran, Lilia Chikhi, Véronique Desjardins, Firas El-Mortada, Geneviève Pépin, et Marc Germain. 2021. « Selective Packaging of Mitochondrial Proteins into Extracellular Vesicles Prevents the Release of Mitochondrial DAMPs ». *Nature Communications* 12 (1): 1971. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21984-w>.
- Todt, F, Z Cakir, F Reichenbach, R J Youle, et F Edlich. 2013. « The C-terminal helix of Bcl-xL mediates Bax retrotranslocation from the mitochondria ». *Cell Death and Differentiation* 20 (2): 333-42. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.131>.
- Todt, Franziska, Zeynep Cakir, Frank Reichenbach, Frederic Emschermann, Joachim Lauterwasser, Andrea Kaiser, Gabriel Ichim, et al. 2015. « Differential Retrotranslocation of Mitochondrial Bax and Bak ». *The EMBO Journal* 34 (1): 67-80. <https://doi.org/10.15252/embj.201488806>.
- Tomková, Veronika, Cristian Sandoval-Acuña, Natalia Torrealba, et Jaroslav Truksa. 2019. « Mitochondrial Fragmentation, Elevated Mitochondrial Superoxide and Respiratory Supercomplexes Disassembly Is Connected with the Tamoxifen-Resistant Phenotype of Breast Cancer Cells ». *Free Radical Biology & Medicine* 143 (novembre): 510-21. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.09.004>.
- Tong, Liang. 2013. « Structure and Function of Biotin-Dependent Carboxylases ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 70 (5): 863-91. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1096-0>.
- Torralba, Daniel, Francesc Baixauli, Carolina Villarroya-Beltri, Irene Fernández-Delgado, Ana Latorre-Pellicer, Rebeca Acín-Pérez, Noa B. Martín-Cófreces, et al. 2018. « Priming of Dendritic Cells by DNA-Containing Extracellular Vesicles from Activated T Cells through Antigen-Driven Contacts ». *Nature Communications* 9 (1): 2658. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05077-9>.
- Towers, Christina G., Darya K. Wodetzki, Jacqueline Thorburn, Katharine R. Smith, M. Cecilia Caino, et Andrew Thorburn. 2021. « Mitochondrial-Derived Vesicles Compensate for Loss of LC3-Mediated Mitophagy ». *Developmental Cell* 56 (14): 2029-2042.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.06.003>.
- Townsend, Paul A., Maria V. Kozhevnikova, Olivier N. F. Cexus, Andrey A. Zamyatnin, et Surinder M. Soond. 2021. « BH3-mimetics: recent developments in cancer therapy ». *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 40 (1): 355. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-02157-5>.
- Traverse, Sarah, Klaus Seedorf, Hugh Paterson, Chris J. Marshall, Philip Cohen, et Axel Ullrich. 1994. « EGF Triggers Neuronal Differentiation of PC12 Cells

- That Overexpress the EGF Receptor ». *Current Biology* 4 (8): 694-701. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00154-8](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00154-8).
- Tripathi, Kiran, et Minal Garg. 2018. « Mechanistic regulation of epithelial-to-mesenchymal transition through RAS signaling pathway and therapeutic implications in human cancer ». *Journal of Cell Communication and Signaling* 12 (3): 513-27. <https://doi.org/10.1007/s12079-017-0441-3>.
- Trisciuglio, Daniela, Maria Grazia Tupone, Marianna Desideri, Marta Di Martile, Chiara Gabellini, Simonetta Buglioni, Matteo Pallocca, Gabriele Alessandrini, Simona D'Aguanno, et Donatella Del Bufalo. 2017. « BCL-XL Overexpression Promotes Tumor Progression-Associated Properties ». *Cell Death & Disease* 8 (12): 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0055-y>.
- Tsuchida, N., T. Ryder, et E. Ohtsubo. 1982. « Nucleotide Sequence of the Oncogene Encoding the P21 Transforming Protein of Kirsten Murine Sarcoma Virus ». *Science (New York, N.Y.)* 217 (4563): 937-39. <https://doi.org/10.1126/science.6287573>.
- Tsujimoto, Yoshihide, Lawrence R. Finger, Jorge Yunis, Peter C. Nowell, et Carlo M. Croce. 1984. « Cloning of the Chromosome Breakpoint of Neoplastic B Cells with the t(14;18) Chromosome Translocation ». *Science* 226 (4678): 1097-99. <https://doi.org/10.1126/science.6093263>.
- Upreti, Meenakshi, Elena N. Galitovskaya, Rong Chu, Alan J. Tackett, David T. Terrano, Susana Granell, et Timothy C. Chambers. 2008. « Identification of the Major Phosphorylation Site in Bcl-XL Induced by Microtubule Inhibitors and Analysis of Its Functional Significance* ». *Journal of Biological Chemistry* 283 (51): 35517-25. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805019200>.
- Uprety, Dipesh, et Alex A. Adjei. 2020. « KRAS: From Undruggable to a Druggable Cancer Target ». *Cancer Treatment Reviews* 89 (septembre): 102070. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2020.102070>.
- Vander Heiden, M. G., N. S. Chandel, P. T. Schumacker, et C. B. Thompson. 1999. « Bcl-XL Prevents Cell Death Following Growth Factor Withdrawal by Facilitating Mitochondrial ATP/ADP Exchange ». *Molecular Cell* 3 (2): 159-67. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80307-x](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80307-x).
- Vander Heiden, M. G., X. X. Li, E. Gottlieb, R. B. Hill, C. B. Thompson, et M. Colombini. 2001. « Bcl-XL Promotes the Open Configuration of the Voltage-Dependent Anion Channel and Metabolite Passage through the Outer Mitochondrial Membrane ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (22): 19414-19. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101590200>.
- Vara-Perez, Monica, Blanca Felipe-Abrio, et Patrizia Agostinis. 2019. « Mitophagy in Cancer: A Tale of Adaptation ». *Cells* 8 (5): E493. <https://doi.org/10.3390/cells8050493>.
- Vasam, Goutham, Rachel Nadeau, Virgilio J. J. Cadete, Mathieu Lavallée-Adam, Keir J. Menzies, et Yan Burelle. 2021. « Proteomics Characterization of Mitochondrial-Derived Vesicles under Oxidative Stress ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 35 (4): e21278. <https://doi.org/10.1096/fj.202002151R>.
- Veas-Pérez de Tudela, Miguel, María Delgado-Esteban, Carolina Maestre, Verónica Bobo-Jiménez, Daniel Jiménez-Blasco, Rebeca Vecino, Juan P. Bolaños, et Angeles Almeida. 2015. « Regulation of Bcl-XL-ATP Synthase Interaction by Mitochondrial Cyclin B1-Cyclin-Dependent Kinase-1 Determines Neuronal

Survival ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 35 (25): 9287-9301. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4712-14.2015>.

- Villa, Elodie, Emma Proïcs, Camila Rubio-Patiño, Sandrine Obba, Barbara Zunino, Jozef P. Bossowski, Romain M. Rozier, et al. 2017. « Parkin-Independent Mitophagy Controls Chemotherapeutic Response in Cancer Cells ». *Cell Reports* 20 (12): 2846-59. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.08.087>.
- Visvader, Jane E., et Geoffrey J. Lindeman. 2012. « Cancer Stem Cells: Current Status and Evolving Complexities ». *Cell Stem Cell* 10 (6): 717-28. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.007>.
- Vollmer, Stefan, Danen Cunoosamy, Huafei Lv, Huanxi Feng, Xia Li, Ziyang Nan, Wenzhen Yang, et Matthew W. D. Perry. 2020. « Design, Synthesis, and Biological Evaluation of MEK PROTACs ». *Journal of Medicinal Chemistry* 63 (1): 157-62. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00810>.
- Vuillier, Céline, Steven Lohard, Aurélie Fétiveau, Jennifer Allègre, Cémile Kayaci, Louise E. King, Frédérique Braun, et al. 2018. « E2F1 Interacts with BCL-XL and Regulates Its Subcellular Localization Dynamics to Trigger Cell Death ». *EMBO Reports* 19 (2): 234-43. <https://doi.org/10.15252/embr.201744046>.
- Wan, Y., T. Kurosaki, et X. Y. Huang. 1996. « Tyrosine Kinases in Activation of the MAP Kinase Cascade by G-Protein-Coupled Receptors ». *Nature* 380 (6574): 541-44. <https://doi.org/10.1038/380541a0>.
- Wang, Jianfang, Myriam Beauchemin, et Richard Bertrand. 2011. « Bcl-XL Phosphorylation at Ser49 by Polo Kinase 3 during Cell Cycle Progression and Checkpoints ». *Cellular Signalling* 23 (12): 2030-38. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.07.017>.
- . 2012. « Phospho-Bcl-x(L)(Ser62) Plays a Key Role at DNA Damage-Induced G(2) Checkpoint ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 11 (11): 2159-69. <https://doi.org/10.4161/cc.20672>.
- Wang, Mingliang, Jianfeng Lu, Mi Wang, Chao-Yie Yang, et Shaomeng Wang. 2020. « Discovery of SHP2-D26 as a First, Potent, and Effective PROTAC Degradator of SHP2 Protein ». *Journal of Medicinal Chemistry* 63 (14): 7510-28. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00471>.
- Wang, Tim Sen, Isabelle Coppens, Anna Saorin, Nathan Ryan Brady, et Anne Hamacher-Brady. 2020. « Endolysosomal Targeting of Mitochondria Is Integral to BAX-Mediated Mitochondrial Permeabilization during Apoptosis Signaling ». *Developmental Cell* 53 (6): 627-645.e7. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.05.014>.
- Warburg, O. 1925. « The Metabolism of Carcinoma Cells ». *The Journal of Cancer Research* 9 (1): 148-63. <https://doi.org/10.1158/jcr.1925.148>.
- Weber, Patricia C., D. H. Ohlendorf, J. J. Wendoloski, et F. R. Salemme. 1989. « Structural Origins of High-Affinity Biotin Binding to Streptavidin ». *Science*, janvier. <https://doi.org/10.1126/science.2911722>.
- Wee, Ping, et Zhixiang Wang. 2017. « Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways ». *Cancers* 9 (5): 52. <https://doi.org/10.3390/cancers9050052>.
- Wei, Guo, Adam A. Margolin, Leila Haery, Emily Brown, Lisa Cucolo, Bina Julian, Shyemaa Shehata, Andrew L. Kung, Rameen Beroukhim, et Todd R. Golub. 2012. « Chemical Genomics Identifies Small-Molecule MCL1 Repressors and

- BCL-xL as a Predictor of MCL1 Dependency ». *Cancer cell* 21 (4): 547-62. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.028>.
- Welsch, Matthew E., Anna Kaplan, Jennifer M. Chambers, Michael E. Stokes, Pieter H. Bos, Arie Zask, Yan Zhang, et al. 2017. « Multivalent Small-Molecule Pan-RAS Inhibitors ». *Cell* 168 (5): 878-889.e29. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.006>.
- Wennerberg, Krister, Kent L. Rossman, et Channing J. Der. 2005. « The Ras superfamily at a glance ». *Journal of Cell Science* 118 (5): 843-46. <https://doi.org/10.1242/jcs.01660>.
- West, A. Phillip, et Gerald S. Shadel. 2017. « Mitochondrial DNA in Innate Immune Responses and Inflammatory Pathology ». *Nature Reviews. Immunology* 17 (6): 363-75. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.21>.
- White, Carl, Chi Li, Jun Yang, Nataliya B. Petrenko, Muniswamy Madesh, Craig B. Thompson, et J. Kevin Foskett. 2005. « The Endoplasmic Reticulum Gateway to Apoptosis by Bcl-X(L) Modulation of the InsP3R ». *Nature Cell Biology* 7 (10): 1021-28. <https://doi.org/10.1038/ncb1302>.
- Williams, Abasha, Teruo Hayashi, Daniel Wolozny, Bojiao Yin, Tzu-Chieh Su, Michael J. Betenbaugh, et Tsung-Ping Su. 2016. « The Non-Apoptotic Action of Bcl-XL: Regulating Ca(2+) Signaling and Bioenergetics at the ER-Mitochondrion Interface ». *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 48 (3): 211-25. <https://doi.org/10.1007/s10863-016-9664-x>.
- Wimmer, Reiner, et Manuela Baccarini. 2010. « Partner Exchange: Protein-Protein Interactions in the Raf Pathway ». *Trends in Biochemical Sciences* 35 (12): 660-68. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.06.001>.
- Winter-Vann, Ann M., et Patrick J. Casey. 2005. « Post-Prenylation-Processing Enzymes as New Targets in Oncogenesis ». *Nature Reviews. Cancer* 5 (5): 405-12. <https://doi.org/10.1038/nrc1612>.
- Wise, David R., et Craig B. Thompson. 2010. « Glutamine Addiction: A New Therapeutic Target in Cancer ». *Trends in Biochemical Sciences* 35 (8): 427-33. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.05.003>.
- Wolfman, Janice C., Sarah M. Planchon, Jinhui Liao, et Alan Wolfman. 2006. « Structural and Functional Consequences of C-N-Ras Constitutively Associated with Intact Mitochondria ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1763 (10): 1108-24. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.07.015>.
- Wright, Latasha P., et Mark R. Philips. 2006. « Thematic Review Series: Lipid Posttranslational Modifications. CAAX Modification and Membrane Targeting of Ras ». *Journal of Lipid Research* 47 (5): 883-91. <https://doi.org/10.1194/jlr.R600004-JLR200>.
- Wu, Haijian, Xiaoru Che, Qiaoli Zheng, An Wu, Kun Pan, Anwen Shao, Qun Wu, Jianmin Zhang, et Yuan Hong. 2014. « Caspases: A Molecular Switch Node in the Crosstalk between Autophagy and Apoptosis ». *International Journal of Biological Sciences* 10 (9): 1072-83. <https://doi.org/10.7150/ijbs.9719>.
- Xie, Chun, Ying Li, Lan-Lan Li, Xing-Xing Fan, Yu-Wei Wang, Chun-Li Wei, Liang Liu, Elaine Lai-Han Leung, et Xiao-Jun Yao. 2017. « Identification of a New Potent Inhibitor Targeting KRAS in Non-small Cell Lung Cancer Cells ». *Frontiers in Pharmacology* 8. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2017.00823>.

- Yan, Chaojun, Longlong Gong, Li Chen, Meng Xu, Hussein Abou-Hamdan, Mingliang Tang, Laurent Désaubry, et Zhiyin Song. 2020. « PHB2 (Prohibitin 2) Promotes PINK1-PRKN/Parkin-Dependent Mitophagy by the PARL-PGAM5-PINK1 Axis ». *Autophagy* 16 (3): 419-34. <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1628520>.
- Yan, J., S. Roy, A. Apolloni, A. Lane, et J. F. Hancock. 1998. « Ras Isoforms Vary in Their Ability to Activate Raf-1 and Phosphoinositide 3-Kinase ». *The Journal of Biological Chemistry* 273 (37): 24052-56. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.37.24052>.
- Yang, Gong, Jennifer Anne Thompson, Bingliang Fang, et Jinsong Liu. 2003. « Silencing of H-Ras Gene Expression by Retrovirus-Mediated SiRNA Decreases Transformation Efficiency and Tumorgrowth in a Model of Human Ovarian Cancer ». *Oncogene* 22 (36): 5694-5701. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206858>.
- Yao, Nan, Chenran Wang, Nan Hu, Yingjie Li, Mingqun Liu, Yuhe Lei, Minfeng Chen, et al. 2019. « Inhibition of PINK1/Parkin-Dependent Mitophagy Sensitizes Multidrug-Resistant Cancer Cells to B5G1, a New Betulinic Acid Analog ». *Cell Death & Disease* 10 (3): 232. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1470-z>.
- Yin, Zhiyong, Hong Qi, Lili Liu, et Zhen Jin. 2017. « The Optimal Regulation Mode of Bcl-2 Apoptotic Switch Revealed by Bistability Analysis ». *Biosystems* 162 (décembre): 44-52. <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2017.09.011>.
- Ying, Haoqiang, Alec C. Kimmelman, Costas A. Lyssiotis, Sujun Hua, Gerald C. Chu, Eliot Fletcher-Sananikone, Jason W. Locasale, et al. 2012. « Oncogenic Kras Maintains Pancreatic Tumors through Regulation of Anabolic Glucose Metabolism ». *Cell* 149 (3): 656-70. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.058>.
- Yoshinaka, Takahiro, Hidetaka Kosako, Takuma Yoshizumi, Ryo Furukawa, Yu Hirano, Osamu Kuge, Taro Tamada, et Takumi Koshiba. 2019. « Structural Basis of Mitochondrial Scaffolds by Prohibitin Complexes: Insight into a Role of the Coiled-Coil Region ». *IScience* 19 (septembre): 1065-78. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.08.056>.
- Youle, Richard J., et Andreas Strasser. 2008. « The BCL-2 Protein Family: Opposing Activities That Mediate Cell Death ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9 (1): 47-59. <https://doi.org/10.1038/nrm2308>.
- Youn, Ahrim, Kyung In Kim, Raul Rabadan, Benjamin Tycko, Yufeng Shen, et Shuang Wang. 2018. « A Pan-Cancer Analysis of Driver Gene Mutations, DNA Methylation and Gene Expressions Reveals That Chromatin Remodeling Is a Major Mechanism Inducing Global Changes in Cancer Epigenomes ». *BMC Medical Genomics* 11 (1): 98. <https://doi.org/10.1186/s12920-018-0425-z>.
- Youn, Ji-Young, Wade H. Dunham, Seo Jung Hong, James D.R. Knight, Mikhail Bashkurov, Ginny I. Chen, Halil Bagci, et al. 2018. « High-Density Proximity Mapping Reveals the Subcellular Organization of mRNA-Associated Granules and Bodies ». *Molecular Cell* 69 (3): 517-532.e11. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.12.020>.
- Yuan, Shujun, et Christopher W. Akey. 2013. « Apoptosome Structure, Assembly, and Procaspase Activation ». *Structure (London, England: 1993)* 21 (4): 501-15. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.02.024>.

- Yun, Jihye, Carlo Rago, Ian Cheong, Ray Pagliarini, Philipp Angenendt, Harith Rajagopalan, Kerstin Schmidt, et al. 2009. « Glucose Deprivation Contributes to the Development of KRAS Pathway Mutations in Tumor Cells ». *Science (New York, N.Y.)* 325 (5947): 1555-59. <https://doi.org/10.1126/science.1174229>.
- Yurugi, H., F. Marini, C. Weber, K. David, Q. Zhao, H. Binder, L. Désaubry, et K. Rajalingam. 2017. « Targeting Prohibitins with Chemical Ligands Inhibits KRAS-Mediated Lung Tumours ». *Oncogene* 36 (33): 4778-89. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.93>.
- Yurugi, Hajime, Yinyin Zhuang, Farid A. Siddiqui, Hong Liang, Sebastian Rosigkeit, Yongpeng Zeng, Hussein Abou-Hamdan, et al. 2020. « A Subset of Flavaglines Inhibits KRAS Nanoclustering and Activation ». *Journal of Cell Science* 133 (12): jcs244111. <https://doi.org/10.1242/jcs.244111>.
- Zampieri, Luca X., Catarina Silva-Almeida, Justin D. Rondeau, et Pierre Sonveaux. 2021. « Mitochondrial Transfer in Cancer: A Comprehensive Review ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (6): 3245. <https://doi.org/10.3390/ijms22063245>.
- Zeng, Mei, Yuan Xiong, Nozhat Safaee, Radosław P. Nowak, Katherine A. Donovan, Christine J. Yuan, Behnam Nabet, et al. 2020. « Exploring Targeted Degradation Strategy for Oncogenic KRASG12C ». *Cell Chemical Biology* 27 (1): 19-31.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2019.12.006>.
- Zhao, Meng, Shuyun Liu, Chengshi Wang, Yizhuo Wang, Meihua Wan, Fang Liu, Meng Gong, et al. 2021. « Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Attenuate Mitochondrial Damage and Inflammation by Stabilizing Mitochondrial DNA ». *ACS Nano* 15 (1): 1519-38. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c08947>.
- Zhao, Rui, George A. Follows, Philip A. Beer, Linda M. Scott, Brian J. P. Huntly, Anthony R. Green, et Denis R. Alexander. 2008. « Inhibition of the Bcl-XL Deamidation Pathway in Myeloproliferative Disorders ». *The New England Journal of Medicine* 359 (26): 2778-89. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0804953>.
- Zhao, Rui, David Oxley, Trevor S. Smith, George A. Follows, Anthony R. Green, et Denis R. Alexander. 2007. « DNA Damage-Induced Bcl-XL Deamidation Is Mediated by NHE-1 Antiport Regulated Intracellular PH ». *PLoS Biology* 5 (1): e1. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050001>.
- Zhou, Jiaojiao, Qishan Chen, Yiheng Zou, Huihui Chen, Lina Qi, et Yiding Chen. 2019. « Stem Cells and Cellular Origins of Breast Cancer: Updates in the Rationale, Controversies, and Therapeutic Implications ». *Frontiers in Oncology* 9 (août): 820. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00820>.
- Zhou, Yong, et John F. Hancock. 2015. « Ras Nanoclusters: Versatile Lipid-Based Signaling Platforms ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, SI: Nanoscale Membrane Organisation, 1853 (4): 841-49. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.09.008>.
- Zhou, Yong, Hong Liang, Travis Rodkey, Nicholas Ariotti, Robert G. Parton, et John F. Hancock. 2014. « Signal Integration by Lipid-Mediated Spatial Cross Talk between Ras Nanoclusters ». *Molecular and Cellular Biology* 34 (5): 862-76. <https://doi.org/10.1128/MCB.01227-13>.

Zuo, Zhenying, Kaipeng Jing, Hongluan Wu, Shujun Wang, Lin Ye, Zhihang Li, Chen Yang, Qingjun Pan, Wei Jing Liu, et Hua-feng Liu. 2020. « Mechanisms and Functions of Mitophagy and Potential Roles in Renal Disease ». *Frontiers in Physiology* 0. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00935>.

Titre : Modulation de l'activité de l'oncogène KRAS par BCL-xL : aspects mécanistiques

Résumé : En plus de son rôle canonique de régulateur de la perméabilisation de la membrane externe des mitochondries, BCL-xL exerce diverses fonctions non canoniques contribuant à l'agressivité des cellules cancéreuses, et en particulier il régule les niveaux d'activation intracellulaires de KRAS. Nous avons exploré ici la base mécanistique de cet effet par une approche protéomique de marquage à la biotine restreinte dans l'espace, conçue pour caractériser les protéines dont la proximité avec KRAS, utilisé comme appât, dépend de BCL-xL. La perte de BCL-xL, qui déstabilise KRAS, le relocalise à proximité des protéines mitochondriales lorsque la masse mitochondriale diminue.

Les protéines proximales comprennent la prohibitin 2 (PHB2), une protéine d'échafaudage mitochondrial, qui interagit également avec BCL-xL et dont la régulation à la baisse empêche les effets délétères de KRAS sur la masse mitochondriale. La perte de BCL-xL conduit à une accumulation de KRAS aux sites de contact entre les mitochondries et les endosomes et à une augmentation de la production d'exosomes transportant KRAS lui-même et des protéines mitochondriales telles que PHB2. Ces résultats indiquent que BCL-xL empêche une régulation par rétroaction négative de la stabilité intracellulaire de KRAS par l'interférence de KRAS avec le contrôle de qualité mitochondrial.

Mots clés : Oncogènes, Mitochondrie, BCL-xL, KRAS

Title : Modulation of KRAS oncogene activity by BCL-xL: mecanistic aspects

Abstract : In addition to its canonical role as a regulator of mitochondrial outer membrane permeabilisation, BCL-xL exerts diverse non canonical functions contributing to cancer cell aggressiveness, and in particular it regulates KRAS intracellular levels. We herein explored the mechanistic basis for this effect by a spatially restricted biotin-labelling proteomic approach designed to characterize proteins whose proximity to KRAS, used as a bait, is BCL-xL dependant. BCL-xL loss, which destabilizes KRAS, relocalizes it to the vicinity of mitochondrial proteins as mitochondrial mass decreases.

Proximal proteins include the mitochondrial scaffold prohibitin 2 (PHB2), which also interacts with BCL-xL and the downregulation of which prevents BCL-xL sensitive effects of KRAS on mitochondrial mass. BCL-xL loss leads to KRAS accumulation at contact sites between mitochondria and endosomes and to an increase in the production of exosomes carrying KRAS itself and mitochondrial proteins such as PHB2. These results argue that BCL-xL prevents a negative feedback regulation of KRAS intracellular stability by KRAS interference with mitochondrial quality control.

Keywords : Oncogenes, Mitochondria, BCL-xL, KRAS