

Rôle et régulation de l'autophagie dans les lymphomes anaplasiques à grandes cellules ALK positifs

Julie Frentzel

▶ **To cite this version:**

Julie Frentzel. Rôle et régulation de l'autophagie dans les lymphomes anaplasiques à grandes cellules ALK positifs. Cancer. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2016. Français. NNT : 2016TOU30180 . tel-02145698

HAL Id: tel-02145698
https://theses.hal.science/tel-02145698

Submitted on 3 Jun 2019

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

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

Université Fédérale
Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :
Julie FRENTZEL

le 17 octobre 2016

Titre :

Rôle et régulation de l'autophagie dans les Lymphomes Anaplasiques à Grandes Cellules ALK positifs

---

École doctorale et discipline ou spécialité :
ED BSB : Cancérologie

Unité de recherche :
Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse - INSERM U1037

Directeur/trice(s) de Thèse :

Dr. Sylvie GIURIATO et Dr. Fabienne MEGGETTO

Jury :
Pr. Bruno SEGUI, Président du Jury
Pr. Mario P. TSCHAN, Rapporteur
Dr. Mojgan DJAVAHERI-MERGNY, Rapporteur
Dr. Jean-Max PASQUET, Examinateur

« Tout ce que je sais, c'est que je ne sais rien »

Socrate

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le **Pr. Pierre Brousset** pour m'avoir accueillie au sein de son équipe, et de m'avoir permis d'y effectuer ma thèse.

Je voudrais également remercier tous les membres du Jury, le **Pr. Mario Tschan**, le **Dr. Mojgan Djavaheri-Mergy**, le **Dr. Jean-Max Pasquet**, ainsi que le **Pr. Bruno Ségui** qui ont accepté de juger ce travail. Merci d'avoir pris le temps de lire le manuscrit et d'avoir été présents pour la soutenance. Je vous remercie également pour vos nombreux commentaires et vos questions qui m'ont à la fois permis d'améliorer le manuscrit, et qui m'ont aidé à prendre du recul sur mes travaux. J'ai vraiment apprécié la discussion qui a suivi la présentation, et j'espère que vous aussi !

Sylvie, merci de m'avoir proposé l'opportunité de continuer à travailler sur le projet dans le cadre d'une thèse. Un grand merci pour la confiance que tu m'as accordée durant ces 3 ans : tu m'as laissé une certaine autonomie dans mon travail qui m'a permis de choisir les axes que je souhaitais développer, je pense que cet aspect me sera très utile pour la suite. Merci pour avoir été patiente quand je m'embrouillais dans des discussions interminables, ainsi que pour ta gentillesse ! Je te remercie également pour les nombreuses relectures du manuscrit et pour être revenue des Etats Unis pour me préparer à l'oral. Je te souhaite un bon séjour à Boston, et j'espère que tes projets futurs se réaliseront sans embûche.

Fabienne, merci de m'avoir remise sur les rails quand j'allais de travers ! Merci pour tes conseils avisés qui m'ont permis d'améliorer mes manips et mes présentations (promis, je bannirais le rouge et le gris à l'avenir) ☺. Merci pour les relectures finales du manuscrit et pour toutes les discussions que nous avons pu avoir. Continue à gérer toute la troupe, tu le fais si bien !

Je remercie également toutes les personnes qui ont participé à ce projet, et qui ont permis de le faire avancer : **Géraldine** pour avoir mis en place l'étude de l'autophagie au sein de l'équipe, **Estelle et Avédis** pour m'avoir convertie au monde mystérieux de Bcl-2, et pour toutes les discussions et manips communes que nous avons pu effectuer. J'espère que cette histoire sera vite publiée, et que notre collaboration aura porté ses fruits. Un grand merci à **Guillaume Flandin**, pour m'avoir aidé à mettre au point les doses à utiliser pour toutes les combinaisons thérapeutiques utilisées dans ces résultats.

A présent je voudrais dire un grand merci à tous les membres de l'équipe 7 (encore là, ou déjà partis) qui m'ont beaucoup aidée, conseillée, soutenue et aussi fait rire ! Gardez cette bonne ambiance qui fait qu'on a envie de se lever le matin pour aller au labo et qui nous aide à passer des moments de creux quand tout ne marche pas comme il faut ! Vous allez tous me manquer !

Géraldine, merci de m'avoir initiée au monde merveilleux de l'autophagie et aux (nombreux) Westerns associés ! Merci de t'être toujours rendue disponible pour moi que ce soit avant ou après ton départ de l'équipe, et d'avoir eu la patience de me former. J'ai beaucoup apprécié ta rigueur scientifique ainsi que les discussions (nombreuses aussi) que nous avons eues à propos du projet. C'est également grâce à toi que je peux être co-premier auteur sur cette publication. On se prendra encore un petit thé avec une énorme part de gâteau allemand avant que je m'en aille vers d'autres horizons ☺.

Coralie, un grand merci pour tout. On a le droit à une séquence émotion dans les remerciements, et c'est maintenant que je choisis d'utiliser mon joker ! J'ai découvert une personne très équilibrée, très à l'écoute, pleine de conseils toujours pertinents (scientifiques ou non), et surtout très fun ! Merci pour m'avoir aidé à faire avancer mes manips, d'avoir supporté d'écouter mes théories plus ou moins farfelues, et aussi d'avoir accepté de m'écouter parler d'autophagie en long en large et en travers. Un grand MERCI pour tous les conseils et mises au point de manips sur les microARNs. Je te souhaite de

réussir les concours, tu es une des personnes qui le mérite le plus que je connaisse. Pour ce que ça vaut, I believe in you ☺.

Torassian (also M^{elle} Avédis genannt), ich weiß, dass du sehr gut Deutsch sprechen kannst deswegen habe ich in diese Sprache geschrieben. Vergiss meine mehrere **„NEIN“** nicht, Sie werden dich auf dem rechten Weg bringen! Blague à part, tu es le prochain, c'est la dernière ligne droite pour toi. Profite à fond, et fais les manips qui te plaisent, ça passe plus vite qu'on ne le croit ! Merci pour les coups de mains sur Bcl-2 et merci pour m'avoir « prêté » des données incluses dans le manuscrit, Sainte-Rita te le rendra au centuple ! (Pour le commerce de Dollars Brousset, on se recontactera quand je serais dans la douce ville de Gland !).

Estelle, merci beaucoup pour tes conseils et tes suggestions, ainsi que pour toutes les discussions que nous avons eues durant la thèse. Continue à être une enseignante qui transmet la passion de la biologie moléculaire à ses étudiants, c'est une chance d'avoir ce don.

Ficelle (Gastro), la meilleure imitatrice de l'accent belge, souvent imitée, jamais égalée ! Merci d'avoir co-instauré les affiches du mois et d'avoir toujours le sourire. Tu seras à jamais associée à Fidel Castro dans mon esprit (je ne sais pas si c'est vraiment un compliment ! ☺). J'ai aussi beaucoup aimé les brainstormings souvent tardifs sur nos sujets respectifs. J'espère que ton projet va porter ses fruits, et que tu auras tout le succès que tu mérites. Merci aussi à **Martial**, Pastry Chef à Frouzins pour le super buffet de thèse !

Christian, je suis vraiment contente que tu aies pu rejoindre cette équipe. Tu as toujours été disponible pour discuter des manips mais aussi de pleins d'autres sujets divers et variés, tout ça dans la bonne humeur. Continue d'être toujours disponible pour les étudiants, même si ça te coûte parfois, c'est une chance pour eux. Merci de m'avoir ouvert ta caverne d'Ali Baba pleine d'anticorps pour mes investigations. J'espère que tu continueras d'éviter les gamelles en trottinette même si avec l'âge ça risque d'être de plus en plus difficile ! ;-) Ave Reticulum Maximus !

Camille, un grand merci pour ton soutien, pour les longues discussions plus ou moins sérieuses qu'on a eu au labo, pour le protocole de design de primers qui est à toute épreuve, pour les réponses à toutes les questions farfelues que j'avais par SMS, pour toujours tout savoir à ma place ! J'espère qu'on gardera contact et que tu viendras me rendre visite dans la patrie du fromage. Je te souhaite un avenir heureux dans le monde fou des biostats et du clinical data-management.

Srdana, I'm writing this as I just went out of the room of your defense ☺ Congratulations, you really deserve this! Thanks a lot for going through the administrative hell with me. Your crazy energy and positive attitude in all circumstances are really amazing features, don't lose this ability in the future. I wish you all the best, I'm sure you'll soon be part of the parisian team of the CRCT!

Marina, toi qui me faisais peur au début ! ☺ Depuis notre déménagement et nos nombreuses excursions à la cantine, j'ai pu vite constater que tu étais quelqu'un de très gentil et très drôle, en plus d'être douée pour ce métier ! Promis, j'efface cet épisode traumatisant de ma mémoire pour ne retenir que du positif ! Bravo pour ta réussite au concours, tu l'as amplement mérité, je te souhaite une belle série de succès équivalents.

Cathy, toujours disponible, toujours agréable, toujours efficace, malgré de (très) courtes nuits. Quel est ton secret ? J'espère que Quentin finira par dormir, et que tu pourras disposer de tout le sommeil dont tu as besoin ! Merci pour tout.

Annabelle, merci de toujours avoir été là pour me rappeler mon vrai âge, et bravo pour le scénario du film, il est top ! Merci pour les contacts en Suisse (ça fait un peu mafieux de dire ça comme ça), j'espère que tu trouveras ton bonheur et que tu auras apprécié ton séjour dans cette équipe !

Ouafinette, merci beaucoup pour ta gentillesse et ta disponibilité ! J'espère que tu pourras ENFIN obtenir un CDI et continuer ton chemin avec l'esprit tranquille ! Reste zen et n'oublie pas de dire NON de temps en temps en souvenir de moi ☺.

Nina, tu as signé pour 3 ans c'est trop tard pour reculer ! J'espère que tu continueras à rendre des visites régulières à Sainte Rita, qui s'ennuie sans toi. Essaye de ne pas trop martyriser Avédis, mine de rien, j'y tiens ☺. Tu es entre de bonnes mains (pense à ne jamais mettre de rouge et de gris dans tes présentations et tout se passera pour le mieux !), je te souhaite plein de réussite pour ta 2ème thèse, pour pouvoir être docteur².

Morgane, toi aussi tu as signé pour 3 ans de dur labeur. Je pense que tu pourrais bénéficier des voyages de Nina à Albi, vous pourrez partager les frais de péage ! Bon courage pour la suite de la thèse, je suis sûre que tout va bien se passer pour toi.

Laure, merci pour m'avoir toujours soutenue dans la procrastination : heureusement que tu es partie en fait ! :-D Bonne continuation en tant qu'ARC, je suis sûre que tu vas pouvoir t'épanouir dans ce métier.

Etienne, merci d'avoir supporté mes expressions de Lorraine, et la musique qui allait parfois avec ! J'espère que tu trouveras ton bonheur dans un post-doc overseas.

Domenico, thank you for always being nice and friendly and for your supporting emails. I hope that your projects will go as you expect and that you will enjoy your stay in Boston. Don't stop being the heart of the party ☺.

Un grand merci à tous les acteurs, actrices, scénaristes, monteurs et autres perchmans pour la superproduction Hollywoodienne que vous avez produite. C'est top ! Je pense qu'il y a là des pistes de reconversions possibles pour certain(e)s d'entre vous ☺.

Merci également à **Laurence**, et **Romain** et à **Amélie** pour leur soutien et à Jeanine, Benjamin, Cyril et Marie-Pierre.

Merci à **nos voisins les JJF,** et à **Justine, Pauline** et **Marina** pour nos pauses déjeuner/cafés remplies d'histoires de peinture ocre, de brioche dans les oreilles, de jupe rentrée dans la culotte, de restaurants nudistes (et autres variantes), de tranches de jambon XXL et bien d'autres sujets cocasses ! Je vous souhaite bon courage pour les années à venir, je suis sûre que tout se passera très bien pour vous, et j'espère qu'on aura l'occasion de se revoir pour partager des ragots divers et variés (d'ailleurs mention spéciale aux membres du **club des ragots de l'équipe 7**, qui je pense seront soulagés de garder leur anonymat, et qui se reconnaitront).

Enfin, un grand merci à **ma famille** qui a accepté de me laisser vivre en autarcie pendant ces dernières années pour que je me consacre entièrement à ma thèse. Merci également d'être venu à ma soutenance, ça m'a vraiment fait plaisir de vous montrer enfin « ce que je cherche » comme vous dites. Une mention spéciale pour **Thibault**, qui avoir accepté de faire la cuisine, la vaisselle et l'aspirateur quand j'étais trop fatiguée pour le faire moi-même, d'avoir accepté que je passe mes soirées et mes weekends au travail et pour m'avoir écouté me plaindre des millions de fois. Ça aurait été beaucoup plus difficile sans ton soutien. Promis, dès mon arrivée en Suisse, je me charge du ménage ☺.

TABLE DES MATIERES

Remerciements **4**

Table des matières **8**

Liste des illustrations **14**

Liste des tableaux **18**

INTRODUCTION ***20***

Chapitre 1 : Les lymphomes anaplasiques à grandes cellules **22**

1 Aspects cliniques 22

1.1 Place des lymphomes anaplasiques à grandes cellules dans la classification de l'Organisation Mondial de la Santé 22

1.2 Épidémiologie 24

1.3 Symptômes et diagnostic 24

2 Aspects cellulaires 26

2.1 Marqueurs morphologiques et histologiques 26

2.2 Marqueurs immunophénotypiques 28

a. Le marqueur ALK 28

b. Le marqueur CD30 28

c. Cas particulier des marqueurs T 28

d. Autres marqueurs caractéristiques 30

3 Origine du Lymphome Anaplasique à Grandes Cellules 32

4 Aspects moléculaires 34

4.1 La kinase ALK 34

a. Fonctions et localisation 34

b. Structure de ALK 36

- La portion extracellulaire de ALK : 36
- Le domaine transmembranaire de ALK : 36
- La partie intracellulaire de ALK : 36

c. Un ligand pour ALK 38

4.2 Les différents partenaires de ALK 40

a. La nucléophosmine (NPM) 40

- Rôle physiologique de NPM : 40
- Rôle de NPM dans la translocation t(2,5) (p23, q35) : 42

b. Les autres partenaires de fusion impliqués dans les translocations X-ALK 44

c. Implication des protéines X-ALK dans d'autres cancers 46

d. Origine des translocations impliquant ALK 46

4.3 La signalisation en aval de ALK 48

a. Activation constitutive de l'oncogène ALK 48

b. Voies de signalisation activées par ALK 48

- La voie JAK/STAT (Figure 7): ... 50
- La voie des MAP kinases (Figure 8) : ... 52
- La voie de la phospholipase C-gamma (PLCγ) (Figure 8): ... 52
- La voie de la tyrosine kinase SRC (Figure 8) : ... 54
- La voie PI3K/AKT (Figure 9) : ... 54
- Signalisation médiée par le récepteur CD30 (Figure 10) : ... 54

5 Profil d'expression des microARNs dans les LAGC ALK+ ... 56

5.1 Introduction sur les microARNs ... 56

a. Biogenèse des microARNs ... 58

b. Action sur les messagers ... 58

- Action au niveau transcriptionnel ... 60
- Dégradation des ARNm cibles ... 60
- Inhibition de la traduction ... 60

5.2 Les microARNs dans les LAGC ALK+ ... 60

a. Les microARNs dans la pathogenèse des LAGC ALK+ ... 62

- Profils d'expression des microARNs dans les LAGC : ... 62
- miR-101 : ... 62
- Le cluster miR 17-92 : ... 64
- miR-155 et 146a : ... 66
- miR-135b : ... 66
- miR-26a et miR-150 : ... 66
- miR-16 : ... 68

b. Le rôle de NPM-ALK dans la régulation épigénétique de l'expression des microARNs ... 68

Chapitre 2 : Traitements des LAGC ALK+ et résistance aux thérapies ... 72

1 Traitements conventionnels ... 72

1.1 Traitement de 1ère intention ... 72

a. Traitement des adultes ... 72

b. Traitement des enfants ... 74

1.2 Traitements de 2nde intention ... 76

a. Traitements de l'adulte ... 76

b. Traitements de l'enfant ... 78

1.3 Le crizotinib : une thérapie ciblant ALK ... 80

a. Le crizotinib ... 80

- Découverte : ... 80
- Structure et mécanisme d'action : ... 80
- Effets au niveau cellulaire : ... 82
- Mise sur le marché : ... 82

b. Utilisation chez le patient atteint de LAGC ALK+ ... 82

- Utilisation chez le patient adulte : ... 82
- Utilisation chez l'enfant : ... 84

2 Résistance aux thérapies ... 86

2.1 Les mutations du domaine kinase de ALK ... 86

a. Dans les NSCLC : ... 86

b. Dans les LAGC ALK+ : ... 88

2.2 L'amplification de ALK ... 88

2.3 L'activation de voies de signalisation alternatives ... 90

3 Nouvelles options thérapeutiques ... 90

3.1 Autres inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de ALK ... 90

a. L'alectinib (Alecensa®, CH-542402) ... 92

b. Le ceritinib (Zykadia™, LDK378) ... 92

c. Le brigatinib (AP26113) ... 94

d. Autres inhibiteurs de ALK ... 94

3.2 Vaccination « thérapeutique » anti-ALK ... 94

3.3 Autres thérapies ... 96

a. Thérapie anti-CD30 ... 96

b. Inhibiteurs de DNMT ... 98

c. Inhibiteurs de Hsp90 ... 100

d. Combinaisons thérapeutiques ... 100

Chapitre 3 : L'autophagie : mécanisme et régulation ... 104

1 Différents types d'autophagie ... 104

1.1 La microautophagie ... 104

1.2 L'autophagie associée à des protéines chaperonnes ... 106

1.3 La macro-autophagie ... 108

a. Description générale ... 108

b. Sélectivité du processus ... 108

2 La machinerie de l'autophagie ... 110

2.1 Origine de la membrane autophagosomale ... 110

2.2 Initiation : Le complexe Unc-51-Like (ULK1) ... 112

2.3 Nucléation : Le complexe PI3K de classe III ... 114

2.4 Elongation : Les systèmes de conjugaison « ubiquitin like » ... 116

a. Le système de conjugaison Atg12/Atg5/Atg16L ... 116

b. Le système de conjugaison LC3-Phosphatidyléthanolamine ... 116

2.5 Maturation, Fusion et dégradation ... 116

2.6 Autophagie non canonique ... 118

3 Techniques de mesure de l'autophagie ... 118

3.1 La microscopie électronique ... 120

3.2 La mesure du taux de dégradation des protéines à durée de vie longue ... 120

3.3 Le Western Blotting 120
3.4 Les sondes fluorescentes 122
1.1 Les colorants acides 122
1.2 Analyse du flux autophagique in vivo 124
4 Régulation de l'autophagie 124
4.1 La voie mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) 126
a. Les complexes mTORC1 et mTORC2 126
b. Signalisation cellulaire en amont de mTORC1 128
- Intégration des signaux relatifs à la teneur en facteurs de croissance (Figure 28) 128
- Intégration des signaux provenant de stress énergétiques (Figure 28) 128
- Intégration de signaux provenant de stress oxydatifs (Figure 28) 128
- Intégration de signaux provenant des acides aminés (Figure 28) 130
c. Signalisation cellulaire en aval de mTORC1 130
- Régulation de l'autophagie 130
- Régulation de la traduction 132
- Autres voies régulées par mTORC1 132
4.2 Régulation de l'autophagie par les microARNs 134
a. Exemples de microARNs impliqués dans la régulation de l'autophagie 134
- Le miR-30a : 134
- Le miR-101 : 134
- Le miR-34a : 136
- Le miR-7 136
b. Base de données ARN (Autophagy Regulation Network) 136
Chapitre 4 : Rôle de l'autophagie dans le cancer 140
1 Rôle de l'autophagie dans la tumorigenèse 140
1.1 Fonctions anti-tumorales de l'autophagie 140
a. Prévention de la transformation de cellules normales 142
- Gestion de la réponse à l'instabilité génomique 142
- Diminution de la réponse inflammatoire 142
- Dégradation de pathogènes carcinogènes 144
b. Maintien de l'homéostasie métabolique 144
c. Participation à des mécanismes oncosuppresseurs 144
- Mort cellulaire par autophagie 144
- Contrôle de la prolifération cellulaire : impact sur la sénescence induite par des oncogènes 146
- Dégradation de protéines oncogéniques 146
d. Activation de l'immunité anti-tumorale 148
1.2 Fonctions pro-tumorales de l'autophagie 148
a. Résistance aux stress (stress métabolique, hypoxie et carence en nutriments) 150

b. Rôle dans la survie de cellules dormantes 150
c. Rôle duel de l'autophagie dans la formation de métastases 152
1.3 Importance du stade de développement tumoral 154
2 Rôle de l'autophagie en réponse aux traitements anti-cancéreux 154
2.1 Rôle cytoprotecteur 156
2.2 Rôle cytotoxique 156
2.3 Rôle cytostatique 156
2.4 Rôle non-protecteur 158
3 « Switch » du rôle fonctionnel de l'autophagie 158
3.1 De la cytoprotection à la cytotoxicité 158
3.2 Le cas du couple Beclin 1/BCL-2 160
a. Généralités sur la protéine BCL-2 160
b. Rôle de Bcl-2 : de l'apoptose à l'autophagie 160
c. Beclin 1/BCL2 : un frein à l'activation d'autophagie cytotoxique 162
d. Les microARNs dans le « switch » autophagique 164
4 Modulation de l'autophagie dans les cancers 164
4.1 Outils pharmacologiques permettant la modulation de l'autophagie 166
a. Inhibiteurs d'autophagie 166
- Agents lysomotropiques 166
- Inhibiteurs de PI3Kinases 168
- Inhibiteurs de ULK1 168
b. Activateurs d'autophagie 170
4.2 Outils moléculaires permettant la modulation de l'autophagie 170
OBJECTIFS DE LA THESE 174
RESULTATS 178
Partie I : Article I 180
1 Introduction 180
2 Résultats de l'étude 180
2.1 Mise en évidence d'une réponse autophagique après l'inhibition de ALK 180
2.2 Détermination du rôle de l'autophagie induite en réponse à l'inhibition de NPM-ALK 184
Partie II : Suite de l'article I – Travaux en cours 214
1 Validation d'un nouvel outil de mesure du flux autophagique par cytométrie en flux 214
1.1 Effets de l'inhibition de NPM-ALK sur le clone Karpas-299 RFP-GFP-LC3 214
1.2 Effets de différents inhibiteurs de l'autophagie sur le clone Karpas-299 RFP-GFP-LC3 216
2 Autres traitements des LAGC ALK+ : impact sur le flux autophagique 218
2.1 Inhibiteurs de l'activité kinase de ALK de seconde génération 218
2.2 Chimiothérapies 220
2.3 Implication de la voie mTOR 222

Partie III : Autres voies de régulation de l'autophagie dans les LAGC NPM-ALK+ -Travaux en cours 224

1 Introduction 224

1.1 Objectifs de l'étude 224

1.2 Dérégulation de l'expression des microARNs lors de l'inhibition de NPM-ALK par le crizotinib 224

1.3 Le miR-7 : description et fonctions connues 226

a. Localisation et expression 226

b. Rôle de miR-7 dans le cancer 226

c. Cibles potentielles de miR-7 228

2 Résultats obtenus 228

2.1 Quel rôle pour le miR-7 dans le phénotype cellulaire ? 228

a. Dérégulation du miR-7 sous traitement au crizotinib 228

b. Effets de la réexpression ectopique du miR-7 dans les LAGC NPM-ALK+ : 230

c. Rôle potentiel de miR-7 dans le switch autophagique 232

2.2 Recherche de cibles pour miR-7-5p 232

a. Le cas de Bcl-2 : 232

b. Le cas de RAF1 : 236

DISCUSSION GENERALE PERSPECTIVES 240

CONCLUSION 256

BIBLIOGRAPHIE 260

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Profils histologiques des différents variants de LAGC 25

Figure 2 : Marqueurs immunohistologiques des cellules LAGC ALK+ 27

Figure 3 : Modèle présentant une hypothèse d'origine thymique des LAGC ALK+ 31

Figure 4 : Structure de ALK humain 35

Figure 5 : Motifs structuraux caractéristiques d'une tyrosine kinase (telle que ALK) 37

Figure 6 : La protéine de fusion NPM-ALK issue de la translocation t(2;5)(p23;q35) 39

Figure 7 : La voie JAK/STAT 49

Figure 8 : La voie des MAP Kinases et de la PLC-Gamma 51

Figure 9 : La voie PIK3-AKT 53

Figure 10 : La signalisation médiée par le CD30 55

Figure 11 : Mécanisme de la biosynthèse des microARNs 57

Figure 12 : Mécanismes permettant la régulation post-transcriptionnelle d'ARNm cibles par les microARNs 59

Figure 13 : Imagerie d'un patient avant (jour 0) et après traitement au Crizotinib (jour 28) 71

Figure 14 : Plan de traitement de l'essai clinique ALCL99 75

Figure 15 : Structure du Crizotinib 79

Figure 16 : Mécanismes de résistance au Crizotinib retrouvés dans les Cancers du Poumon Non à Petites Cellules (NSCLC) 85

Figure 17 : Mécanisme d'action du Brentuximab-Vedotine 95

Figure 18 : Les différents types d'autophagie 103

Figure 19 : La macroautophagie 107

Figure 20 : Les différents types d'autophagie sélective 109

Figure 21 : La formation de l'omégasome et de l'autophagosome 109

Figure 22 : Le complexe d'initiation ULK1 111

Figure 23 : Les complexes de nucléation (complexes PI3K de classe III) 113

Figure 24 : Les systèmes de conjugaison Atg5-Atg12-Atg16 et LC3-PE 115

Figure 25 : La mesure du flux autophagique par western blotting contre la protéine LC3 (LC3 turnover assay) 119

Figure 26 : Sonde tandem RFP-GFP-LC3 utilisée en cytométrie en flux 121

Figure 27 : Les deux complexes mTORC1 et mTORC2 intervenant dans la voie de signalisation mTOR *(adapté de Laplante et al., 2012)*[361] 125

Figure 28 : Signaux principaux modulant la voie mTORC1 127

Figure 29 : mTORC1 : un régulateur clef de la réponse autophagique 129

Figure 30 : Effets principaux de l'activation de mTORC1 *(adapté de RnDSystems.com)* 131

Figure 31 : Régulation de l'autophagie par les microARNs 133
Figure 32 : Fonctions anti-tumorales de l'autophagie 141
Figure 33 : Fonctions pro-tumorales de l'autophagie 149
Figure 34 : Rôle de l'autophagie dans l'entrée en dormance des cellules tumorales 151
Figure 35 : Rôle de l'autophagie dans la formation de métastases 151
Figure 36 : Evolution de l'autophagie au cours du développement tumoral 153
Figure 37 : Les voies permettant l'induction de l'apoptose 159
Figure 38 : Interconnexion entre l'autophagie et l'apoptose 161
Figure 39: Acteurs moléculaires de l'interconnection entre l'autophagie et l'apoptose 163
Figure 40 : Applications thérapeutiques et cliniques des microARNs 171
Figure 41 : Induction d'autophagie après traitement au Crizotinib dans le clone Karpas-299-RFP-GFP-LC3 213
Figure 42 : Induction d'autophagie après inhibition moléculaire de ALK (siARN) dans le clone cellulaire Karpas-299 RFP-GFP-LC3 213
Figure 43 : Effets de divers inhibiteurs de l'autophagie sur l'inhibition du flux dans le clone cellulaire Karpas-299 RFP-GFP-LC3 215
Figure 44 : Induction d'autophagie après traitement au crizotinib dans les SU-DHL-1-RFP-GFP-LC3 215
Figure 45 : Effets de divers inhibiteurs de l'activité kinase de ALK sur le flux autophagique dans les lignées cellulaires de LAGC-NPM-ALK+ 217
Figure 46 : Dose réponse du traitement de cellules de LAGC NPM-ALK+ par la doxorubicine et la vinblastine 219
Figure 47 : Absence d'induction de flux autophagique sous traitement par la doxorubicine et la vinblastine dans les cellules de LAGC NPM-ALK+. 219
Figure 48 : Activation de la voie mTOR en réponse au traitement de cellules de LAGC NPM-ALK+ par différents ITK ciblant ALK, par la doxorubicine ou la vinblastine : 221
Figure 49 : Volcano plot présentant les microARNs dérégulés en réponse au traitement de cellules de LAGC NPM-ALK+ par le crizotinib 225
Figure 50 : Taux d'expression de miR-7 dans plusieurs lignées de LAGC NPM-ALK+ 227
Figure 51 : Effet du traitement par le crizotinib combiné à la réexpression ectopique de miR-7 sur la viabilité de cellules de LAGC NPM-ALK+ 229
Figure 52 : Effet du traitement par le crizotinib combiné à la réexpression ectopique de miR-7 sur l'apoptose et sur le cycle de cellules de LAGC NPM-ALK+ 229
Figure 53 : Effet de la réexpression ectopique de miR-7 avec ou sans traitement au crizotinib sur l'induction d'autophagie dans les cellules de LAGC NPM-ALK+ 231
Figure 54 : Bcl-2 cible potentielle de miR-7-5p 233
Figure 55 : c-Raf est une cible directe de miR-7 dans les LAGC NPM-ALK+ 235

Figure 56 : Modèle présentant le rôle de l'autophagie en réponse au traitement par le crizotinib des LAGC NPM-ALK+ 257

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification de Ann Arbor 23

Tableau 2 : Classification de St Jude 23

Tableau 3 : Protéines de fusion impliquant ALK dans différents cancers. 43

Tableau 4 : MicroARNs impliqués dans l'oncogenèse liée à ALK 61

Tableau 5 : Kinases inhibées par le Crizotinib 79

Tableau 6 : Mutations de ALK décrites dans les Cancers du Poumon Non à Petites Cellules ALK positifs (NSCLC ALK+) et dans les Lymphomes Anaplasiques à Grandes Cellules ALK positifs (LAGC ALK+) en réponse au traitement au Crizotinib 85

Tableau 7 : Efficacité des inhibiteurs de ALK de seconde génération 91

Tableau 8 : Tableau représentant les facteurs de transcription principaux régulant les gènes de l'autophagie 123

Tableau 9 : Tableau présentant les molécules permettant l'inhibition de l'autophagie 165

Tableau 10 : Tableau présentant les molécules couramment utilisées permettant l'induction de l'autophagie 167

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 : LES LYMPHOMES ANAPLASIQUES A GRANDES CELLULES

Les lymphomes sont les hémopathies malignes les plus fréquentes, et représentent environ 5% des cancers rencontrés chez l'adulte[1]. Ils sont dus à la transformation d'une cellule lymphocytaire. Contrairement aux leucémies, les cellules cancéreuses n'envahissent pas la moelle osseuse mais touchent en particulier les ganglions lymphatiques : on dit qu'il s'agit d'une pathologie systémique. On distingue classiquement les lymphomes hodgkiniens (20% de l'ensemble des lymphomes), caractérisés par la présence de cellules caractéristiques appelées cellules de Reed-Sternberg, et les lymphomes non hodgkiniens (80% de l'ensemble des lymphomes). Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons particulièrement à une classe particulière de lymphomes non hodgkiniens : les Lymphomes Anaplasiques à Grandes Cellules qui seront appelés LAGC dans ce manuscrit.

1 ASPECTS CLINIQUES

1.1 Place des lymphomes anaplasiques à grandes cellules dans la classification de l'Organisation Mondial de la Santé

Les Lymphomes Anaplasiques à Grandes Cellules (LAGC) ont été décrits pour la première fois en 1985 par les docteurs Karl Lennert et Harald Stein[2]. Le terme « anaplasique » fait référence à l'apparence des cellules de Reed Sternberg dont l'apparence diffère de celle des lymphocytes T normaux. La classification de l'organisation mondiale de la santé des tumeurs hématopoïétiques (revue en 2008) les place dans la catégorie des lymphomes développés à partir de cellules T périphériques par opposition aux lymphomes développés à partir de précurseurs lymphoïdes[3,4].

On retrouve deux types principaux de LAGC :

- Les **LAGC cutanés primitifs**, prenant naissance dans la peau et y restant confinés.
- Les **LAGC systémiques**, qui affectent principalement les ganglions lymphatiques et qui peuvent ensuite disséminer dans d'autres organes, tels que les poumons, les os, la peau, le foie, le médiastin ainsi que les tissus mous.

Les LAGC systémiques sont séparés en deux entités en fonction de leur profil d'expression génique et de leurs différences épidémiologiques[5] :

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

Tableau 1 : Classification de Ann Arbor
(d'après Carbone et al., 1971)[6]

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

Tableau 2 : Classification de St Jude
(d'après Murphy et al., 1980, et Cairo et al., 2003)[7,8]

- Les LAGC systémiques présentant une translocation chromosomique impliquant le gène codant pour la tyrosine kinase oncogénique ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase), appelés **LAGC ALK positifs** (ou LAGC ALK+).
- Les LAGC systémiques n'exprimant pas l'oncogène ALK, appelés **LAGC ALK négatifs** (ou LAGC ALK-).

Dans la suite de ce manuscrit, nous nous intéresserons uniquement aux LAGC systémiques ALK+ (LAGC ALK+), sur lesquels j'ai mené mon travail de thèse au sein du laboratoire.

1.2 Épidémiologie

Les lymphomes T périphériques sont des lymphomes agressifs, représentant environ 7% du groupe des Lymphomes Non Hodgkiniens (LNH). Les LAGC systémiques ALK+ font partie des lymphomes T périphériques. Diverses études épidémiologiques montrent qu'ils représentent près de 10 à 15% des lymphomes de l'enfant, contre seulement 3% des LNH de l'adulte[9–11].

On distingue deux pics d'âge moyen au diagnostic : chez les enfants et les jeunes adultes (âge médian au diagnostic : 10 ans, minimum : 10 mois, maximum : 17 ans)[12], ou la prévalence est plus élevée, et chez les personnes de plus de 60 ans (âge moyen au diagnostic toutes populations confondues 22.01 ± 10.87 ans), ou la prévalence est plus faible. On trouve également une prédominance masculine, (ratio M/F : 3,0), qui est encore plus marquée chez les enfants et les jeunes adultes (ratio M/F : 6.5)[13].

Aucun facteur causal n'a à ce jour été déterminé, même si certaines études suggèrent que le développement des LAGC ALK+ serait favorisé dans un contexte inflammatoire, par exemple après une piqûre d'insecte[14], ou en association avec une infection par le VIH[15].

1.3 Symptômes et diagnostic

Comme mentionné précédemment, les LAGC ALK+ affectent principalement les ganglions lymphatiques. Ces lymphomes se traduisent généralement par des polyadénopathies superficielles (augmentation du volume des ganglions superficiels), associées à une dégradation de l'état général (forte fièvre persistante sans cause infectieuse, amaigrissement, fatigue inexpliquée, etc.). Une atteinte extraganglionnaire est retrouvée dans 40 à 68% des cas, notamment au niveau des tissus mous, des os, de la peau, des poumons, du foie, et du médiastin. L'atteinte de la moelle osseuse est constatée dans 11 à 30% des cas, alors que celle du système nerveux central reste rare[9,16,17].

Le diagnostic comprend une étape de détermination du stade de la maladie qui est effectué à l'aide de deux systèmes de classification : la classification d'Ann Arbor[6] (principalement utilisée chez les

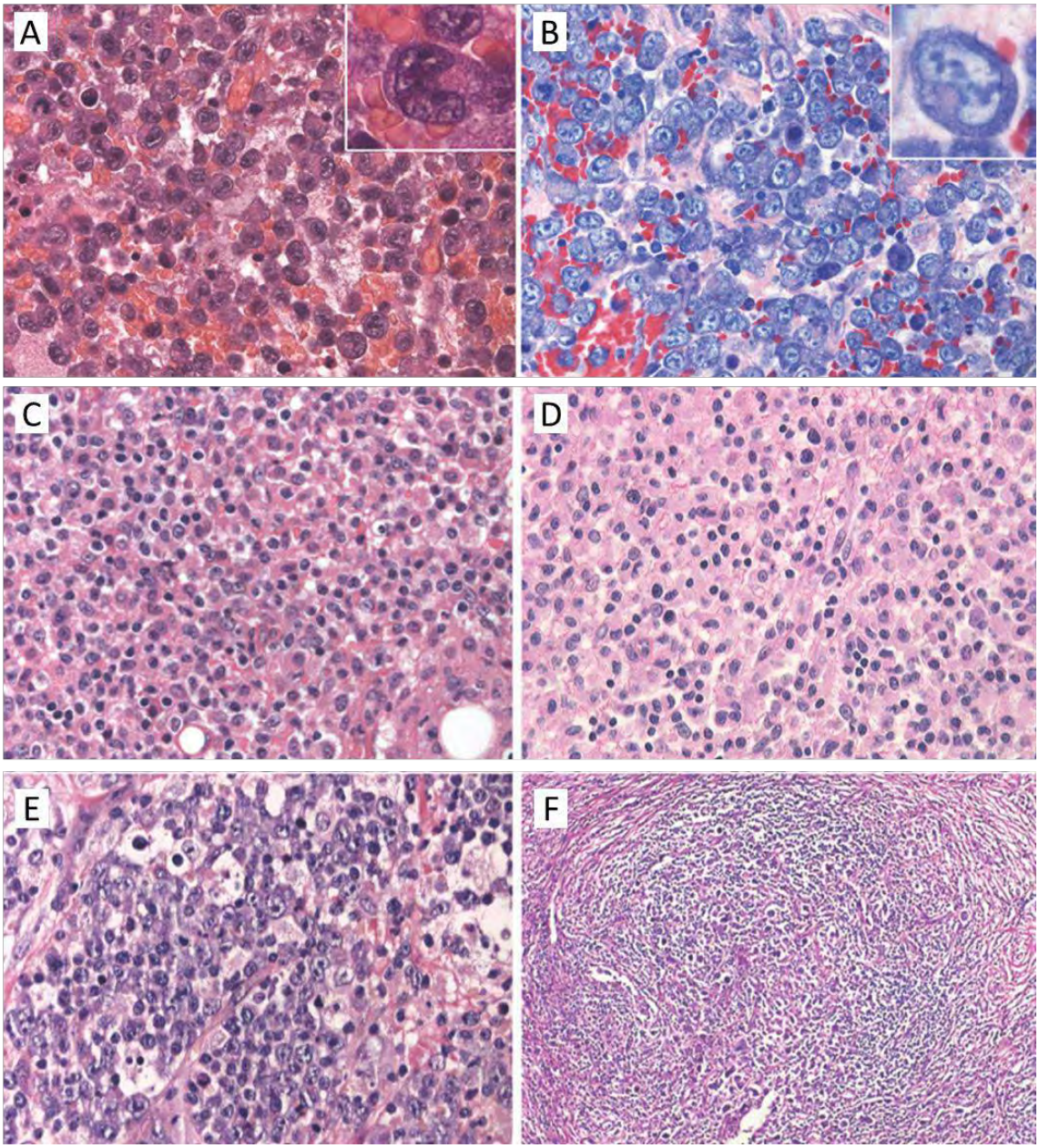


Figure 1 : Profils histologiques des différents variants de LAGC
(d'après Bonzheim et al., 2015)[18]
(A) Type commun : les cellules sont grandes, avec un cytoplasme abondant, avec un noyau en fer à cheval et un appareil de Golgi proéminent (coloration Hemalun & Eosine). **(B) Coloration au Giemsa du type commun** : elle permet de mettre en évidence les caractéristiques morphologiques des cellules tumorales ainsi que la proéminence de l'appareil de Golgi. **(C) Variant à petites cellules** : petits noyaux irréguliers et un cytoplasme pâle. **(D) Variant lymphohistiocytaire** : les cellules néoplasiques sont éclipsées par des histiocytes avec cytoplasme éosinophile abondant. (E) **Variant mixte** : mélange de différents types. On observe ici un variant principalement à petites cellules avec de grandes cellules de type commun. (F) **Variant « Hodgkin-like »** qui mime un sous-type de lymphome Hodgkinien (sclérose nodulaire importante).

adultes) (Tableau 1), et la classification du St. Jude Children's Research Hospital[7,8] (principalement utilisé chez les enfants) (Tableau 2). Ces deux systèmes permettent de définir quatre stades de la maladie, en fonction du nombre et de la localisation des sites ganglionnaires atteints, ainsi que de la présence ou non d'atteintes extraganglionnaires. Ce dernier paramètre représente un critère de gravité de la maladie, et est le plus souvent retrouvé chez les enfants : c'est pourquoi la classification du St. Jude Children's Research Hospital (qui inclut les atteintes extraganglionnaires dès le Stade I) est le plus souvent utilisée pour les populations pédiatriques.

Le diagnostic comprend ensuite généralement un examen physique, un bilan hématologique et biochimique complet, une tomographie du corps entier (CT-scan), une aspiration de la moelle osseuse ainsi qu'une biopsie de la tumeur.

En général, du fait de la présence d'adénopathies périphériques et abdominales, environ 65% des patients présentent une maladie de stade avancé (III ou IV) au diagnostic[9,12,19].

2 ASPECTS CELLULAIRES

2.1 Marqueurs morphologiques et histologiques

Les LAGC ALK+ sont caractérisés par la présence de cellules particulières appelées « hallmark cells ». Ces cellules sont caractérisées par leur grande taille, leur cytoplasme abondant, et leur noyau réniforme ou en forme de « fer à cheval », excentré, présentant un nucléole proéminent et une chromatine dispersée[20]. La morphologie de ces cellules est présentée en Figure 1A et 1B.

La quantité de cellules « hallmark » ainsi que leur taille sont relativement variables en fonction des patients, et ces différences ont donné lieu à une classification des LAGC ALK+ en quatre sous-types morphologiques distincts dans la classification de l'OMS de 2008[21] :

- **La forme commune** correspond au variant initialement identifié en 1985. Elle est retrouvée dans plus de 60% des cas[18,22], et se compose d'une population quasi-exclusive de cellules « hallmark » (Figure 1A et 1B).
- **Le variant à petites cellules** représente environ 5 à 10% des cas, et est caractérisé par la présence de petites cellules cancéreuses associées aux cellules « hallmark » (Figure 1C).
- **Le variant lymphohistiocytaire** représente environ 10% des cas. Il est composé de cellules tumorales de morphologie commune, ou plus petites, mêlées à un nombre important d'histiocytes (Figure 1D). La présence en grand nombre de ces cellules peut masquer la population tumorale et ainsi fausser le diagnostic des LAGC[23].

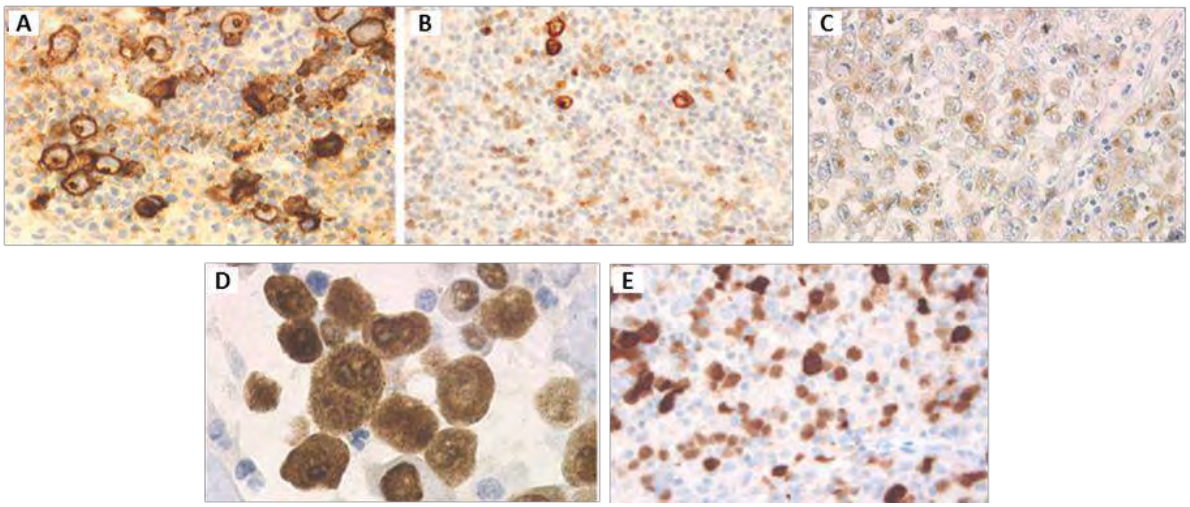


Figure 2 : Marqueurs immunohistologiques des cellules LAGC ALK+
(adapté de Bonzheim et al.,2015)[18]
(A) Marquage CD30 dans le « type commun » : grandes cellules caractéristiques fortement positives pour le CD30 au niveau de la membrane et de l'appareil de Golgi. **(B) Marquage CD30 dans le variant à petites cellules** : les grandes cellules expriment fortement le CD30, tandis que les petites cellules sont hétérogènes avec un marquage faiblement positif. **(C) Marquage de la perforine :** confirme le phénotype cytotoxique des LAGC ALK+. **(D) Marquage de ALK sur une biopsie de LAGC ALK+** : les cellules néoplasiques présentent une coloration cytoplasmique, nucléaire et nucléolaire. **(E) Marquage de ALK sur une biopsie d'un variant à petites cellules** : les petites cellules néoplasiques montrent un marquage ALK restreint au noyau, tandis que les grandes cellules éparses sont fortement positives.

- Dans environ 15% des cas, on retrouve ces trois formes associées dans une même biopsie, on parle alors de **forme mixte** (Figure 1E).
- **Le variant « Hodgkin-like »** est plus rare (3% des cas). Il tire son nom du fait qu'au diagnostic, il peut être confondu avec un lymphome de Hodgkin, à cause de la présence de zones de scléroses nodulaires caractéristiques de cette pathologie[24] (Figure 1F).

2.2 Marqueurs immunophénotypiques

L'analyse des marqueurs immunophénotypiques est déterminante dans le diagnostic de LAGC ALK+, notamment dans le cas de variants à petites cellules ou lymphohistiocytaires, présentant une morphologie cellulaire peu conventionnelle. Les principaux marqueurs caractéristiques des LAGC ALK+ sont présentés ci-dessous.

a. Le marqueur ALK

L'expression du marqueur ALK est bien entendu l'outil clef pour diagnostiquer les LAGC ALK+. L'utilisation au diagnostic d'un anticorps anti-ALK en immunohistochimie (IHC) permet non seulement de discriminer les LAGC ALK+ des LAGC ALK-, mais également d'identifier les différents variants morphologiques. (Figure 2D et 2E).

b. Le marqueur CD30

Un autre marqueur caractéristique des LAGC ALK+ est l'antigène d'activation lymphocytaire CD30 (ou Ki-1). A l'origine, ce marqueur était utilisé pour l'identification des lymphomes de Hodgkin, car il est fortement exprimé par les cellules de Reed Sternberg, qui sont caractéristiques de cette pathologie. L'expression du CD30 est cependant détectée au niveau de la membrane plasmique et de l'appareil de Golgi de toutes les cellules « hallmark », caractéristiques des LAGC ALK+[19] (Figure 2A). Ce marqueur peut également être exprimé par les lymphocytes T activés normaux. Enfin, il faut également noter que l'expression du CD30 au sein des LAGC ALK+ diffère selon les variants morphologiques : le marquage des grandes cellules est très intense alors que celui des petites cellules est plus faible[22,25] (Figure 2A, 2B). D'autres marqueurs sont donc nécessaires pour une identification certaine des LAGC ALK+.

c. Cas particulier des marqueurs T

Bien qu'étant considéré comme un lymphome T périphérique, la présence de marqueurs du lignage T est variable chez les patients atteints de LAGC ALK+ :

- Les cellules peuvent présenter un **phénotype T**, c'est-à-dire qu'elles expriment les antigènes de surface caractéristiques des lymphocytes T (CD3, TCR, CD4 ou CD8, CD2, CD5, CD7). On

- distingue deux sous catégories de phénotype T : (1) le **phénotype T mature,** très peu retrouvé (environ 2.5% des cas), caractérisé par la présence de tous les marqueurs T cités précédemment à la surface des cellules. (2) Le **phénotype T incomplet** (environ 87% des cas), caractérisé par l'absence d'au moins un de ces marqueurs à la surface des cellules. Globalement, pour des cellules de phénotype T, on observe plus de lymphocytes T CD4+ (lymphocytes T auxiliaires) (51% des cas) que de lymphocytes T CD8+ (lymphocytes T cytotoxiques, 29% des cas) dans les LAGC ALK+ (*données obtenues par le Pr. Laurence Lamant, au sein de l'équipe*). Il faut également noter qu'une forte proportion de cellules de LAGC ALK+ présente un phénotype de lymphocyte T auxiliaire CD4+ particulier : les lymphocytes Th17, caractérisé par la production d'interleukine 17[26].
- Dans environ 10% des cas, les cellules présentent un **phénotype dit « nul »**, caractérisé par la perte de nombreux antigènes de surface T. Le rattachement de ces cellules de phénotype nul au lignage T peut cependant être établi car elles présentent un réarrangement clonal des gènes du TCR (T Cell Receptor) au niveau génomique, mais non exprimé à la surface[27].

De plus, la plupart des LAGC ALK+ (85%) expriment des molécules cytotoxiques, telles que le granzyme B, la granulysine, la perforine, ou encore TIA1 (T-cell Intracellular Antigen-1) habituellement exprimées par les cellules T et les cellules Natural Killer (NK). Elles expriment également fortement le récepteur à l'interleukine-2 (CD25), une cytokine participant à la maturation et à la prolifération des lymphocytes T[28].

Il est intéressant de noter qu'en plus de l'hétérogénéité entre les patients, il existe également une hétérogénéité intratumorale pour tous ces marqueurs. Il a notamment été montré que les cellules de LAGC ALK+ de formes commune étaient globalement moins hétérogènes dans l'expression de divers marqueurs membrannaires (comme le CD4 ou le CD8) que les cellules de LAGC ALK+ de type non communs (variants à petites cellules, variants lymphohistiocytaires, etc.)[29].

d. Autres marqueurs caractéristiques

La majorité des LAGC ALK+ sont positifs pour l'antigène épithélial membranaire (EMA)[30], classiquement exprimé dans les épithéliums normaux et néoplasiques. D'autres marqueurs caractéristiques des LAGC sont la clusterine[31] (marqueur des cellules folliculaires) et le facteur de transcription C/EBPβ, régulateur de la différenciation des cellules macrophages[32].

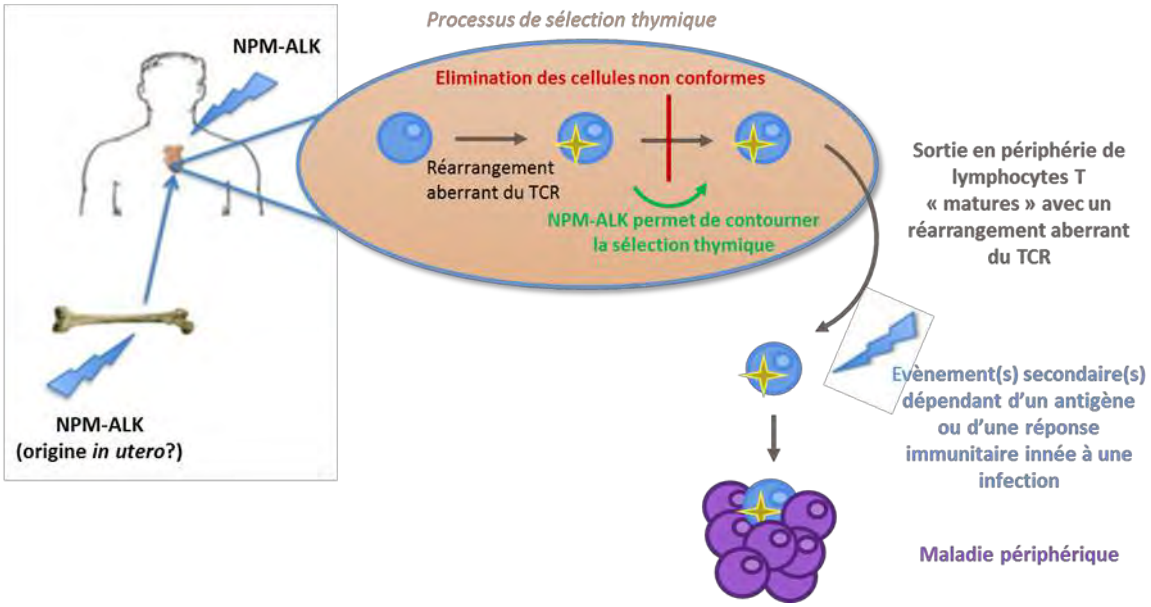


Figure 3 : Modèle présentant une hypothèse d'origine thymique des LAGC ALK+
(adapté de Turner et al., 2016)[27]
Dans ce modèle, l'oncogène ALK est initialement exprimé dans une cellule souche hématopoïétique ou dans des progéniteurs thymiques. Sa présence permet la survie de ces cellules dans le thymus, malgré des réarrangements aberrants du TCR (T-Cell Receptor). Ces cellules passent dans la circulation sanguine où elles ne seraient activées qu'après l'apparition d'un évènement secondaire qui provoquera leur expansion clonale et le développement tumoral. Cet évènement secondaire peut être une réponse inflammatoire (comme le cas des piqûres d'insectes), mais peut également être un autre évènement lié à l'activation de l'immunité innée en réponse à une infection.

3 ORIGINE DU LYMPHOME ANAPLASIQUE A GRANDES CELLULES

L'origine des LAGC ALK+ n'est à ce jour pas clairement définie. Il existe deux hypothèses majeures proposant que l'initiation de la lymphomagenèse se déroule (1) au sein d'un lymphocyte T mature périphérique, ou (2) au sein d'une cellule souche hématopoïétique ou d'un progéniteur thymique précoce.

Le groupe du Dr Wasik a démontré que la transduction par l'oncogène ALK de lymphocytes T CD4+ normaux activés permettait leur transformation. Les cellules sont immortalisées et présentent les caractéristiques phénotypiques retrouvées chez les patients (grandes cellules, expression du marqueur CD30, etc.)[33]. Une étude *in vivo* montre également que la surexpression de l'oncogène ALK dans des lymphocytes T matures entraîne le développement de lymphomes T périphériques dans des modèles murins possédant des lymphocytes T déficients[34]. Ces deux études corroborent l'hypothèse d'une origine T mature périphérique des LAGC ALK+.

L'identification d'une signature génique caractéristique de progéniteurs thymiques précoces au sein de cellules initiatrices de LAGC ALK+[35] tendrait à supporter la deuxième hypothèse (2). Cette hypothèse est confirmée par la possibilité de détection de l'oncogène ALK dans quelques échantillons (2/103) de sang de cordon (contenant des cellules souches hématopoïétiques)[36], ainsi que dans des cellules mononuclées du sang périphérique[37] provenant d'une population saine. Ces deux observations suggèrent que la transformation par l'oncogène ALK pourrait être un évènement précoce, nécessitant un environnement thymique, ou des évènements spécifiques aux lymphocytes T.

Le groupe du Dr Turner a récemment démontré que de nombreuses cellules de LAGC ALK+ présentaient des réarrangements moléculaires anormaux du TCR (T-cell receptor), un récepteur cellulaire nécessaire à la fonction cytotoxique des lymphocytes T [38]. En conditions normales, les cellules exprimant ces réarrangements aberrants (qui aboutissent à la formation d'un TCR non-fonctionnel) sont éliminées par un processus de sélection au niveau du thymus, appelé sélection β. La présence de ces réarrangements non-fonctionnels du TCR dans les cellules de LAGC ALK+ laisse entendre que la présence de l'oncogène ALK permet aux progéniteurs thymiques de passer outre cette sélection, et ainsi d'éviter leur élimination.

Ces résultats sont à la base de l'établissement d'un modèle permettant de mieux comprendre l'origine des LAGC ALK+, présenté en Figure 3. La cellule d'origine du lymphome, c'est-à-dire la première cellule ayant acquis l'oncogène ALK, serait une cellule souche hématopoïétique ou un précurseur thymique

ayant la capacité de survivre aux processus de sélection thymique malgré l'expression d'un réarrangement aberrant du TCR. Ce clone pourrait ainsi passer dans la circulation sanguine, et ne serait activé qu'en réponse à un évènement secondaire, qui entraînerait l'expansion clonale et le développement tumoral en périphérie[27].

Il est intéressant de noter que l'hypothèse de l'origine thymique des LAGC ALK+ concorde avec la prédominance de la malade chez l'enfant et le jeune adulte, car le thymus est soumis à un phénomène d'involution (perte de masse, atrophie), au cours du vieillissement.

4 ASPECTS MOLECULAIRES

Plusieurs groupes ont montré que la tyrosine kinase ALK présente un pouvoir oncogénique suite à son activation constitutive. Celle-ci est induite par une translocation chromosomique réciproque permettant la fusion de la partie 3' du gène ALK (portant son activité catalytique), à la partie 5' d'un gène partenaire (comportant généralement un domaine d'oligomérisation). La première de ces translocations chromosomiques identifiée est la t(2 ; 5) p(23 ; q25) impliquant la nucléophosmine (NPM) et ALK[39]. Par la suite, de nombreux autres partenaires de fusion de ALK ont été rapportés. Dans cette partie, nous décrirons les acteurs moléculaires majeurs responsables du pouvoir oncogénique de ALK.

4.1 La kinase ALK

La kinase ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase), ou CD246, est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase (RTK), appartenant à la superfamille des récepteurs à l'insuline, qui a été clonée en 1997[40]. ALK présente une forte homologie avec le récepteur LTK (Leucocyte Tyrosine Kinase), ce qui suggère que ces deux protéines dérivent d'un même gène ancestral[41].

a. Fonctions et localisation

Le rôle physiologique de ALK a été établi grâce à l'étude d'organismes invertébrés, de modèles murins knock-out, et de lignées cellulaires. Dans la littérature, il a été montré que ALK intervient notamment dans la formation de la synapse ou le vieillissement chez *Caenorhabditis Elegans*[42,43], dans le développement (système nerveux central, muscles viscéraux embryonnaires) chez la drosophile[44,45], et dans le développement des crêtes neuronales chez le zebrafish[46]. Néanmoins, le rôle de ALK chez les mammifères reste encore incertain. Certaines études ont montré que l'expression de ALK, aussi bien au niveau de l'ARN messager que de la protéine, diminue après la naissance pour être maintenue à un niveau minimal chez l'adulte. ALK est retrouvée en majorité au niveau du cerveau et des tissus nerveux intestinaux. Ceci suggère que ALK pourrait jouer un rôle dans le développement et le

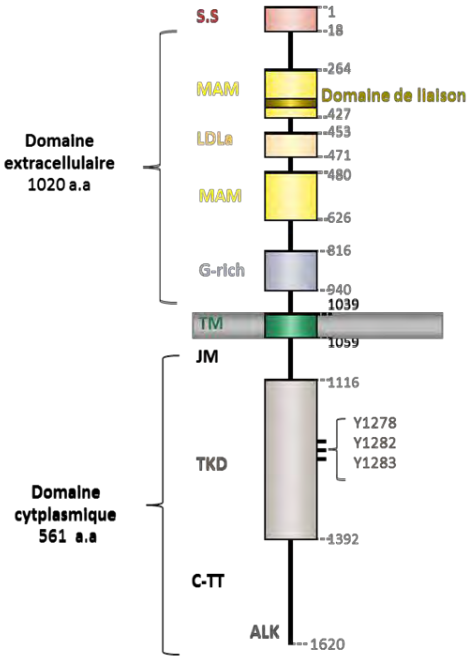


Figure 4 : Structure de ALK humain

(d'après Roskoski et al., 2013 et Hallberg et al., 2013)[47,48]

La région N-terminale de ALK humain comprend deux domaines MAM (Meprin, A5 protein, and receptor tyrosine phosphatase µ, acides aminés 264-427 et 480-626), un domaine de LDLa (Low Density Lipoprotein class A, acides aminés 453-471) et une région riche en glycines (G-rich, acides aminés 816-940). Un domaine transmembranaire (TM, acides aminés 1039-1059) relie la région extracellulaire à la région juxtamembranaire (JM, 1060-1115) du domaine intracellulaire (1060-1620). Le domaine tyrosine kinase (TKD) s'étend des acides aminés 1116 à 1383 et est suivi d'une queue C-terminale (C-TT, C-Terminal Tail).

fonctionnement du système nerveux central et périphérique chez l'adulte[48]. Cependant, la délétion de ALK chez la souris n'engendre aucun phénotype particulier, et n'affecte pas leur développement[49].

b. Structure de ALK

La protéine kinase ALK possède **un domaine extracellulaire** permettant la liaison au ligand, un **domaine transmembranaire**, ainsi qu'un **domaine intracellulaire** portant l'activité tyrosine kinase (Figure 4). Le gène ALK code pour une protéine d'environ 176 kDa, qui, après modifications post-traductionnelles telles que la N-glycosylation du domaine extracellulaire, donne naissance à une protéine mature d'environ 220kDa[47].

- *La portion extracellulaire de ALK :*

Celle-ci est composée de plusieurs domaines différents[47,48] (Figure 4):

- Un **peptide signal** (S-S) de 18 acides aminés, en position N-terminale,
- Deux **segments MAM** (Meprin, A5 protein, and receptor tyrosine phosphatase μ), composés chacun d'environ 170 résidus, contenant quatre cystéines, et pouvant former deux ponts disulfures. Ces domaines possèdent des fonctions adhésives, et semblent participer aux interactions cellule-cellule[50],
- Un **domaine LDLa** (Low Density Lipoprotein class A), qui est caractérisé par un segment contenant deux ou plusieurs ponts disulfures ainsi qu'un groupe de résidus chargés négativement et dont la fonction pour ALK est encore incertaine.
- Une **région riche en glycines**, dont la fonction pour ALK commence à être élucidée : récemment il a été montré que des mutations au sein de cette région diminuaient considérablement l'interaction de ALK avec son ligand[51].

- *Le domaine transmembranaire de ALK :*

Il est constitué de 21 acides aminés, suivi d'un domaine juxtamembranaire de 56 acides aminés qui contient un domaine de liaison à IRS-1 (Insulin Receptor Substrate-1)[47] (Figure 4).

- *La partie intracellulaire de ALK :*

Celle-ci comporte le domaine à activité tyrosine kinase de ALK. Il est composé (1) d'un petit **lobe amino-terminal** et (2) d'un **lobe carboxyterminal** plus grand (Figure 5).

(1) Le **lobe N-terminal** contient cinq feuillets β antiparallèles, une hélice αC (αC-regulatory helix) pouvant être dans une conformation active ou inactive, et un domaine de liaison à l'ATP riche en glycine (P-loop).

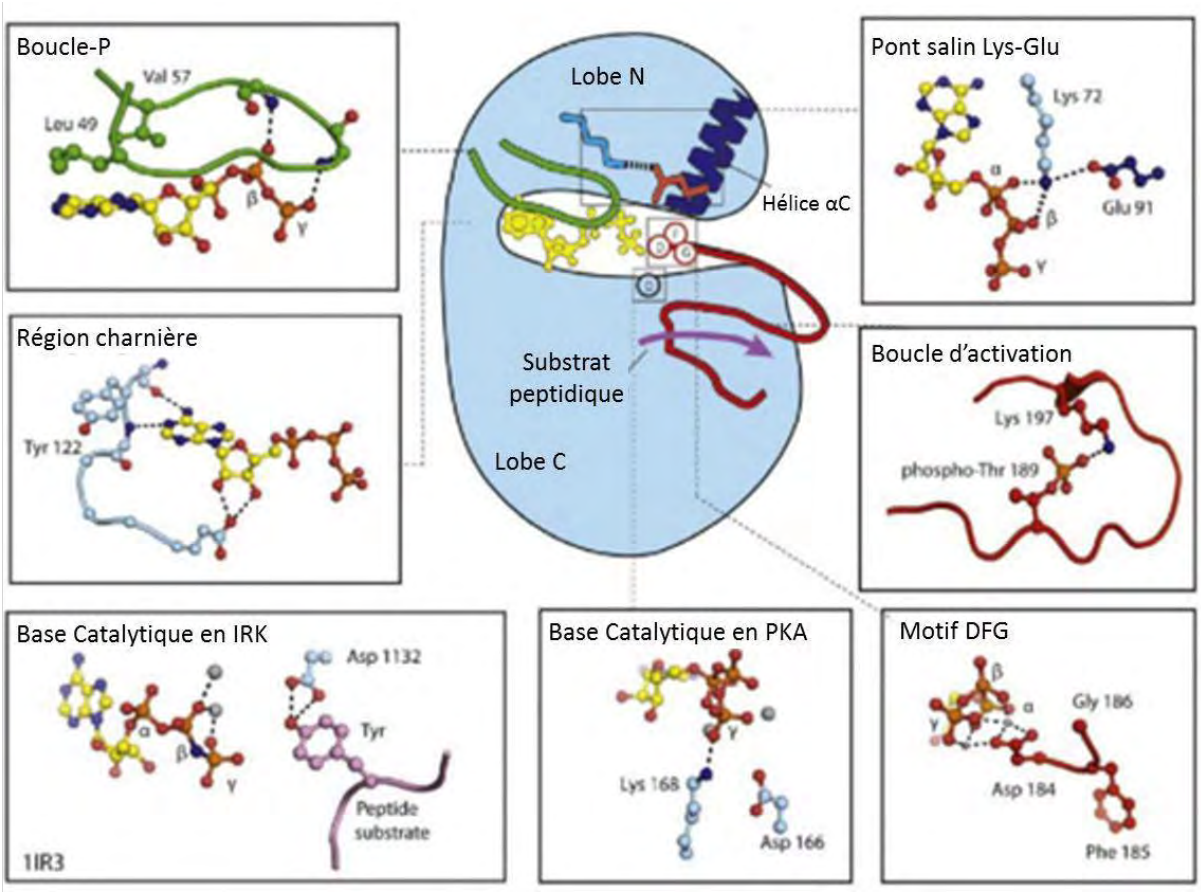


Figure 5 : Motifs structuraux caractéristiques d'une tyrosine kinase (telle que ALK)
(d'après Wang et al., 2014)[52]
La conformation active de la kinase est représentée en bleu clair. L'hélice Cα, la boucle P, la boucle d'activation et le pont Lys-Glu sont représentés en « bâtonnets ». Des changements de conformation de ces régions impactent directement l'activité de la kinase. L'ATP lié à la kinase est représenté en jaune. Le motif Acide Aspartique-Phénylalanine-Glycine (DFG) est représenté par des cercles rouges. Les zooms représentent les points de vue atomistique des différents éléments régulateurs, les liaisons hydrogène sont classiquement représentées par des lignes pointillées, et Mg^{2+} et Mn^{2+} par des sphères grises. Ces figures ont été obtenues à l'aide du logiciel Pymol.

(2) Le **lobe C-terminal** quant à lui est composé de cinq hélices α et de deux feuillets β. Il comprend deux régions essentielles à l'activité de la kinase :

- *La boucle d'activation* (activating-loop, A-loop) qui commence par un motif Acide aspartique-Phénylalanine-Glycine (motif DFG) et qui a pour fonction de moduler l'efficacité de liaison au substrat ainsi que la vitesse de catalyse. Elle comprend un motif type des récepteurs à l'insuline (motif YxxxYY) comprenant trois tyrosines (Y1278, Y1282, et Y1823) qui représente les principaux sites d'autophosphorylation de la kinase. La phosphorylation de la tyrosine Y1278 est nécessaire à l'auto-activation du domaine kinase de ALK[53]. D'autres tyrosines ont également été identifiées comme sites de phosphorylation de la kinase[54,55].
- *Le site catalytique* de la kinase, composé de résidus permettant le transfert du phosphate sur le substrat.

Tous ces éléments sont relativement mobiles, et permettent une flexibilité conformationnelle de la kinase , qui impactera directement sur son activité[56].

Il est également intéressant de noter que l'extrémité C-terminale du domaine intracellulaire de ALK contient de nombreux résidus tyrosine phosphorylés permettant notamment l'interaction avec la protéine SHC1 (SHC [Src Homology 2 domain Containing] transforming protein 1), ou avec la

phospholipase C-ϒ (PLC-ϒ)[57]. Ainsi, l'activité tyrosine kinase de ALK permet l'activation de nombreuses voies de signalisation en aval. Ce point sera abordé dans la partie 4.3.b.

c. Un ligand pour ALK

ALK a longtemps été décrit comme un récepteur orphelin. Cependant, une étude récente a permis l'identification de ligands potentiels conduisant à son activation[51].

Chez les invertébrés, les ligands de ALK sont connus : il s'agit de JEB (Jelly Belly) chez la drosophile[58] et de HEN-1 (hesitation behaviour-1) chez C.Elegans[59]. Ces deux protéines ne sont pas conservées chez les mammifères.

Les travaux de l'équipe du Dr Palmer démontrent que les facteurs de sécrétion FAM150A et FAM150B, peuvent se lier à ALK pleine taille chez la drosophile, mais également dans des lignées cellulaires de rat et surtout dans des lignées humaines de neuroblastomes exprimant ALK de façon endogène, entrainant ainsi son hyper-activation[51]. Ces facteurs de sécrétion étaient déjà connus pour activer le récepteur LTK, homologue de ALK au niveau de son domaine tyrosine kinase[60].

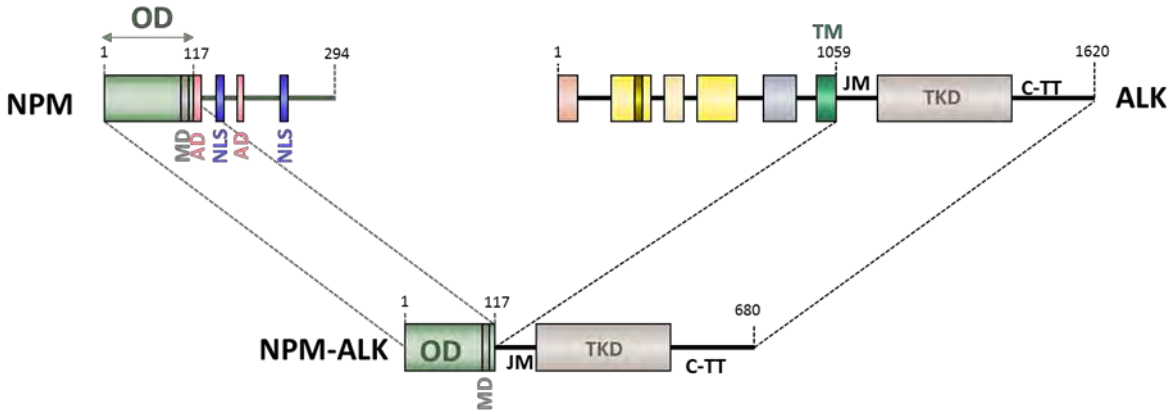


Figure 6 : La protéine de fusion NPM-ALK issue de la translocation t(2;5)(p23;q35)
(adapté de Duyster et al., 2001 et Palmer et al., 2009)[55,61]
La fusion entre le chromosome 5, codant pour la nucléophosmine, et le chromosome 2, codant pour ALK, résulte en l'expression d'une tyrosine kinase chimérique NPM-ALK constitutivement active. NPM contient un domaine d'oligomérisation (OD: résidus 1-117), un domaine de liaison métallique (MD : résidus 104-115), deux groupes d'acides aminés acides (AD : domaine riche en Asp/Glu; résidus 120-132 et 191-188) qui sont des régions recevant les signaux de ciblage nucléolaire, et deux signaux de localisation nucléaire (NLS : résidus 152-157 et 191-197). La structure de ALK est décrite en figure 4 (TM : domaine transmembranaire, JM : domaine juxtamembranaire, TKD : domaine tyrosine kinase, C-TT : queue C-terminale).

Il a également été montré que l'héparine pouvait directement se lier à la partie N-terminale de ALK, et induire sa dimérisation dans un modèle de neuroblastome[62]. Cette liaison peut être empêchée par des anticorps anti-ALK spécifiques du domaine extracellulaire.

Pour réconcilier ces différentes études, on pourrait supposer que l'héparine agirait en tant que co-ligand, pour permettre la dimérisation de ALK[63]. FAM150A et FAM150B, quant à eux joueraient le rôle de ligand activateur de la tyrosine kinase.

Une dernière étude présente ALK comme un récepteur à dépendance aux effets duaux, dont la fonction serait directement liée à la présence ou à l'absence d'un ligand. En l'absence d'un stimulus, la kinase ALK serait inactive et pourrait induire l'apoptose, alors que l'activation induite par la liaison d'un ligand bloquerait l'apoptose[64,65]. La pertinence de ces résultats reste à être explorée dans d'autres modèles, en particulier *in vivo*.

4.2 Les différents partenaires de ALK

Comme mentionné précédemment, de nombreux partenaires de fusion permettant l'activation constitutive de la kinase ALK, ainsi que son expression dans les lymphocytes T ont été décrits. Le partenaire de fusion le plus fréquemment retrouvé dans les LAGC ALK+ est la nucléophosmine (NPM) : on parle alors de LAGC NPM-ALK+, qui correspondent au modèle sur lequel mes travaux de thèse ont été effectués.

a. La nucléophosmine (NPM)

Il est désormais admis que environ 75% des LAGC ALK+ sont associés à une translocation chromosomique équilibrée : la t(2,5) (p23, q35). Le clonage des points de cassure a permis l'identification des gènes impliqués dans ce phénomène : on retrouve la kinase ALK, sur le chromosome 2, et la nucléophosmine (NPM), sur le chromosome 5. Ce réarrangement chromosomique entraîne la formation d'une protéine de fusion NPM-ALK, de 80kDa, comprenant le domaine d'oligomérisation de NPM (117 premiers résidus), et la partie C-terminale de ALK, comprenant son domaine à activité tyrosine kinase (Figure 6)[39,66].

- *Rôle physiologique de NPM :*

En temps normal, NPM est une phosphoprotéine nucléolaire de 38kDa portant une séquence NLS (Nuclear Localization Signal) ainsi qu'un domaine d'oligomérisation. Son rôle principal est de permettre aux protéines néosynthétisées de faire la navette entre le cytoplasme et le noyau. NPM joue également un rôle important dans la biogenèse des ribosomes, la régulation du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, la transcription, ainsi que dans la stabilité génomique[67]. Dans les LAGC NPM-ALK+,

la protéine NPM physiologique ne participe pas au processus de transformation : plusieurs groupes ont montré que seuls les domaines d'oligomérisation de cette protéine étaient nécessaire à la transformation de cellules de LAGC ALK+[55].

Il faut également noter que *NPM1* (gène codant pour NPM) est considéré comme un gène suppresseur de tumeur, dont l'haplo-insuffisance entraîne l'apparition d'hémopathies malignes chez la souris[68,69]. Cette hétérozygotie est retrouvée dans les LAGC NPM-ALK+. Afin d'étudier l'impact de cette hétérozygotie dans la transformation maligne, le groupe du Dr Turner a développé un modèle murin exprimant ALK au niveau des lymphocytes T, et homozygote, ou hétérozygote pour le gène codant pour NPM. Aucune différence n'a été observée dans le délai d'apparition, le phénotype ou l'incidence des tumeurs, entre ces deux modèles[70], ce qui indique l'absence de rôle de cette hétérozygotie dans le processus tumoral.

- *Rôle de NPM dans la translocation t(2,5) (p23, q35) :*

Suite à la translocation t(2 ; 5) (p23 ; q25) , le partenaire NPM va permettre l'expression de ALK dans les lymphocytes T, ainsi que l'homodimérisation des protéines de fusion NPM-ALK, *via* son domaine d'oligomérisation. Cette homodimérisation va mimer l'effet d'un ligand, et entrainer l'autophosphorylation du domaine tyrosine kinase de ALK, et ainsi, son activation constitutive[47]. C'est à la fois la capacité de dimérisation de NPM, et l'activité kinase de ALK qui confèrent un pouvoir transformant à la protéine chimère NPM-ALK[71].

NPM permet également de réguler la localisation subcellulaire de NPM-ALK : lorsque les protéines de fusion sont homodimérisées, elles sont localisées au cytoplasme, alors que lorsqu'elles forment des hétérodimères avec la protéine NPM sauvage qui possède le motif de localisation nucléaire et nucléolaire, elles seront retrouvées à la fois dans le noyau et dans le nucléole[55]. Il a été démontré que la localisation nucléaire de NPM-ALK n'était pas requise à son activité oncogénique[71], ce qui est confirmé par l'observation de variants X-ALK possédant un pouvoir oncogénique bien qu'étant majoritairement cytoplasmiques (Tableau 3). Une étude récente du groupe du Dr Chiarle a cependant montré que dans les LAGC NPM-ALK+, environ 50% de la protéine NPM-ALK était localisée dans le noyau, et était inactive, de par son hétérodimérisation avec NPM sauvage. La relocalisation forcée de NPM-ALK dans le cytoplasme, et donc l'activation de NPM-ALK à plus de 50% entraîne l'induction de mort cellulaire dans ce modèle[72]. Ces résultats indiquent que la protéine NPM sauvage pourrait participer à la progression tumorale en maintenant un niveau de NPM-ALK actif trop important dans les cellules.

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

Tableau 3 : Protéines de fusion impliquant ALK dans différents cancers.
(Adapté de Roskoski et al., 2013)[47]
ALCL, Lymphome anaplasique à grandes cellules ; DLBCL, Lymphome B diffus à grandes cellules ; IMT, tumeurs myofibroblastiques inflammatoires ; NSCLC, cancer du poumon non à petites cellules ; BC, cancer du sein ; CRC, cancer colorectal ; ESCC, cancer de l'œsophage ; RCC, cancer du rein ; ND, non déterminé.

b. Les autres partenaires de fusion impliqués dans les translocations X-ALK

Depuis la découverte de la translocation t(2,5) (p23, q35), 9 autres translocations impliquant ALK ont été décrites dans les LAGC ALK+[47,61] (Tableau 3), et représentent les 25% des cas restants de LAGC. La deuxième translocation la plus fréquente est la t(1 ; 2) (q25 ; p23) (environ 18% des cas de LAGC ALK+) qui entraine la fusion de la protéine TPM3 (Tropomyosine 3), une protéine impliquée dans la régulation du cytosquelette et de la motricité cellulaire, avec ALK.

Toutes les protéines chimères impliquant ALK (X-ALK) partagent des caractéristiques communes[55,61] :

- Le point de cassure sur le gène ALK est situé dans la même région pour toutes les chimères (intron 19-20).
- ALK est fusionné à la partie N-terminale du partenaire, qui est exprimé normalement dans les lymphocytes (à l'exception de TRAF1 (TNF receptor-associated factor 1, très peu exprimé dans les lymphocytes). Le promoteur du gène partenaire entraîne donc la transcription du gène de fusion.
- Le partenaire de ALK présente généralement un domaine d'oligomérisation qui permet l'autophosphorylation de ALK et ainsi l'activation constitutive de la protéine chimère.
- Dans tous les cas, la localisation subcellulaire de la protéine de fusion sera déterminée par le partenaire de fusion : elle est cytoplasmique dans la majorité des cas.

Même s'il est clair que le pouvoir transformant des protéines X-ALK est lié à l'activation constitutive de la tyrosine kinase, certaines études se sont penchées sur le rôle du partenaire de fusion dans ce processus. Il a notamment été suggéré que la nature du partenaire de fusion, et par conséquent la localisation subcellulaire de la protéine chimérique, pourrait moduler son pouvoir oncogénique. Au sein de notre laboratoire, une étude a notamment démontré que la protéine de fusion TPM3-ALK possédait le pouvoir invasif le plus fort dans des fibroblastes murins exprimant l'oncogène ALK. Cette caractéristique serait due au fait que TPM3 est le seul partenaire de ALK possédant la capacité de se lier au cytosquelette d'actine dans ces cellules murines[73]. TPM3-ALK pourrait ainsi activer des voies de signalisation différentes des autres protéines chimères, et notamment affecter l'organisation du réseau d'actine, ce qui peut perturber la motilité cellulaire et ainsi impacter le potentiel métastatique des cellules portant cette translocation[74]. Malgré cette observation, les études cliniques effectuées n'ont pas permis de démontrer un impact de la nature du partenaire de fusion sur l'agressivité tumorale, ni sur le pourcentage de survie des patients atteints de LAGC ALK+[22]. Des travaux réalisés dans un modèle transgénique conditionnel de lymphome ALK+ ont d'ailleurs démontré que le pouvoir

transformant de la protéine de fusion TPM3-ALK était identique à celui de NPM-ALK[75], ce qui pourrait expliquer l'absence de différence observé au niveau clinique.

c. Implication des protéines X-ALK dans d'autres cancers

L'expression anormale de variants X-ALK a également été rapportée dans d'autres cancers, à la fois hématologiques et solides (Tableau 3). En plus des LAGC ALK+, NPM-ALK est retrouvée dans les lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL). Les protéines de fusion comme TPM3-, TPM4- (Tropomyosine 4), ATIC- (5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide Transformylase and IMP Cyclohydrolase), et CTLC-ALK (clathrin heavy chain-ALK, protéine structurelle), initialement identifiées dans les LAGC sont également fréquemment retrouvées dans les tumeurs myofibroblastiques inflammatoires (IMT). D'autres protéines de fusion impliquant ALK ont été mises en évidence dans les cancers de poumon non à petites cellules (NSCLC), qui représentent 80 à 85% des carcinomes pulmonaires et qui sont la cause la plus fréquente de décès par cancer dans le monde. C'est le cas en particulier de EML4-ALK (Echinoderm Microtubule-associated protein-Like 4-ALK), qui est présente dans 6% de ces NSCLC. L'implication potentielle de ALK dans cette pathologie a donc entraîné une accélération considérable du développement d'inhibiteurs spécifiques de l'activité tyrosine kinase de ALK (ces inhibiteurs seront développés en détail dans le chapitre 2 partie 3.1)[47]. On retrouve également des translocations impliquant ALK dans les cancers du côlon, du sein, dans le carcinome rénal, le carcinome épidermoïde de l'œsophage, ou dans le plasmocytome extramédullaire (Tableau 3).

Il faut également noter que la forme pleine taille de ALK peut, elle aussi jouer le rôle d'oncogène dans plusieurs tumeurs (neuroblastome, glioblastome, mélanome, carcinome thyroïdien), soit après surexpression, soit après une mutation entrainant un gain de fonction[47,48].

d. Origine des translocations impliquant ALK

L'équipe du Dr Mathas s'intéresse à l'étude de la formation de la translocation NPM-ALK t(2,5) (p23, q35), et plus particulièrement au rôle de la transcription dans ce phénomène[76]. Généralement, les translocations chromosomiques résultent de la formation de cassures doubles brins au niveau d'au moins deux sites chromosomiques. Si ces cassures ne sont pas réparées, elles peuvent se rapprocher physiquement, et former des gènes de fusion[77]. L'hypothèse de ce groupe se base sur le fait que la transcription génère des forces mécaniques au sein du génome, et que l'observation de cassures doubles brins serait plus fréquente au niveau des gènes en cours de transcription. Ils évoquent également le concept « d'usine transcriptionnelle », c'est-à-dire de zone où plusieurs gènes peuvent être transcrits simultanément. Ces « usines transcriptionnelles » permettraient à la fois de conserver une proximité spatiale entre deux gènes, mais aussi de les sensibiliser aux cassures doubles brin. Ils ont pu mettre en évidence plusieurs gènes ayant une forte activité transcriptionnelle, et localisés dans

une zone proche des points de cassure sur les chromosomes 2p et 5q. Il s'agit de gènes codant pour une tyrosine kinase oncogénique CSFR1 (Colony Stimulating Factor 1 Receptor), pour un facteur de transcription Fra2 (Fos-like antigen 2), et pour la protéine ID2 (Inhibitor of DNA binding 2). La transcription simultanée de ces gènes au sein de la même « usine de transcription » permettrait la modification de la position des chromosomes dans l'espace nucléaire, et rapprocherait ainsi les partenaires de la translocation t(2,5). Ces évènements joueraient un rôle clef dans la mise en place du phénotype tumoral, en favorisant les translocations impliquant ALK[76,78].

4.3 La signalisation en aval de ALK

a. Activation constitutive de l'oncogène ALK

Le pouvoir transformant de la protéine chimère NPM-ALK provient de son activation constitutive, qui est médiée par son autophosphorylation sur tyrosine[79]. Comme mentionné précédemment (partie 4.1.b), ALK est caractérisée par le motif « YxxxYY » présent au niveau de la boucle d'activation de la kinase. Le mécanisme le plus probable permettant d'expliquer l'activation de ALK au niveau structurel, impliquerait la transphosphorylation d'une tyrosine contenue dans la boucle d'activation (Y1278) par le partenaire de dimérisation, suivie de la transphosphorylation des deux autres tyrosines (Y1282, Y1283) présentes au niveau du motif « YxxxYY »[53]. La kinase ainsi triphosphorylée pourrait alors catalyser la transphosphorylation des tyrosines du motif « YxxxYY » du second partenaire de dimérisation de la protéine chimère, comme c'est le cas pour les récepteurs à insuline[80]. Ces étapes de phosphorylations successives entrainent l'induction de changements conformationnels, qui vont conduire à l'ouverture de la boucle d'activation, et ainsi permettre l'accès de l'ATP et du substrat au site actif de la kinase.

Un autre mécanisme d'activation possible passerait par la phosphorylation de résidus tyrosines au niveau juxtamembrannaire. Ces phosphorylations permettraient à l'hélice Cα de passer en conformation active, et permettrait également, à terme, la phosphorylation des résidus tyrosines présents au niveau de la boucle d'activation de ALK[47].

Des expériences additionnelles sont encore nécessaires pour déterminer la séquence exacte de phosphorylation ayant lieu lors de l'auto-activation de ALK.

b. Voies de signalisation activées par ALK

L'activation de ALK par trans-autophosphorylation va permettre la phosphorylation d'autres résidus situés dans la partie C-terminale de son domaine kinase. Certains de ces résidus peuvent alors servir de points d'ancrage, et permettent la liaison de protéines participant à la transduction du signal

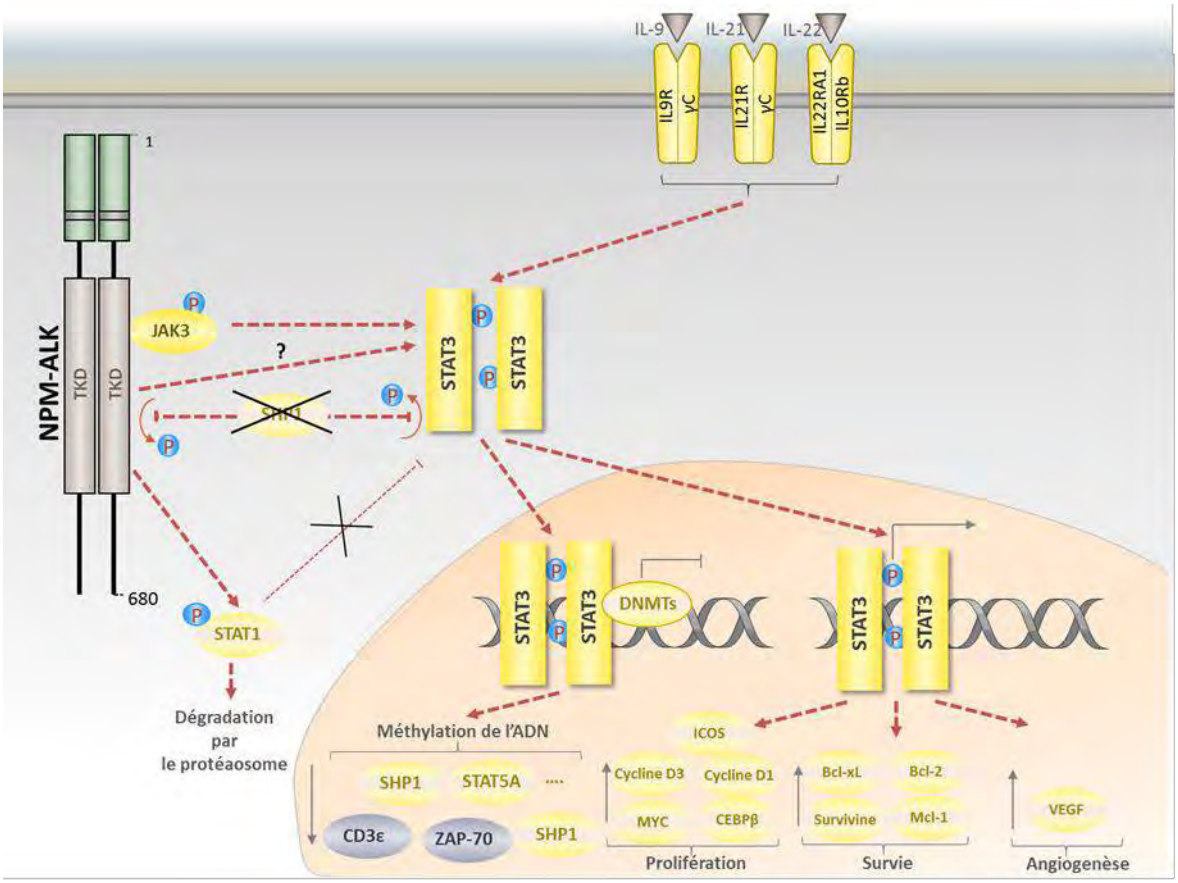


Figure 7 : La voie JAK/STAT

(d'après la thèse de Camille Daugrois : adapté de Roskoski et al., 2013, Pearson et al., 2012 et Chiarle et al., 2008)[47,81–83]

dépendant de ALK[47]. Les voies de signalisation induites en réponse à l'activation de NPM-ALK sont fortement interconnectées, et sont connues pour favoriser à la fois la prolifération et la survie cellulaire, mais aussi la migration cellulaire (*via* des réarrangements du cytosquelette). Parmi ces voies, on trouve notamment les voies de la phospholipase C-γ (PLC-γ), des MAP Kinases, de la PI3 Kinase-Akt, ainsi que la voie majoritaire JAK/STAT. Ces différentes voies sont détaillées ci-dessous.

- *La voie JAK/STAT (Figure 7):*

Le facteur de transcription STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) joue un rôle clef dans la tumorigenèse médiée par NPM-ALK. On le retrouve activé à la fois dans des lignées cellulaires de LAGC ALK+, dans des cellules isolées à partir de souris transgéniques NPM-ALK[84], et également dans des échantillons de patients[85–87]. NPM-ALK peut induire l'activation de STAT3 en le phosphorylant directement, ou en passant par l'activation de JAK3 (Janus Kinase 3)[86,88,89] (Figure 7). Il a également été décrit que NPM-ALK entraînait la phosphorylation de STAT1, et ainsi sa dégradation par le protéasome[90](Figure 7). Il est intéressant de noter que la majorité des tumeurs ALK+ (81%) montrent une activation constitutive de JAK3 par rapport aux tumeurs ALK négatives (11%)[91].

Une fois activé, STAT3 peut se dimériser et migrer dans le noyau où il pourra activer la transcription de gènes anti-apoptotiques tels que BCL-2 (B-cell Lymphoma 2), BCL-XL (BCL2L1, BCL-2 Like 1), MCL-1 (Myeloid cell leukemia sequence 1), ou la survivine. STAT3 contrôle également la prolifération cellulaire en activant les cyclines D3 et D1, ICOS (Inducible T-cell co-stimulator), ainsi que les facteurs de transcription CEBPβ et Myc[82,83]. Il permet aussi de favoriser les mécanismes d'angiogenèse en augmentant la transcription du VEGF (Vascular endothelial growth factor)[92] (Figure 7). L'inhibition de STAT3 par différentes méthodes (pharmacologiques, interférence à l'ARN) induit à la fois de l'apoptose et un arrêt du cycle cellulaire[93,94], et contribue à la suppression tumorale *in vivo*[93] : STAT3 contribue donc à la lymphomagenèse induite par NPM-ALK.

D'autres études démontrent que le rôle pro-tumoral de STAT3 passe par la modulation de la méthylation de promoteurs de gènes suppresseurs de tumeurs (Figure 7). En effet, il a été montré que STAT3 pouvait d'une part activer la transcription de gènes codant pour des ADN méthyltransférases (DNMT)[95], et d'autre part, qu'il pouvait servir de cofacteur à ces DNMT afin de permettre leur recrutement au niveau de gènes cibles[96]. On peut notamment citer l'exemple de STAT5A, un gène suppresseur de tumeur, qui réprime l'expression de NPM-ALK[97] : dans les LAGC NPM-ALK+, STAT3 sert de cofacteur aux DNMT et permet la méthylation du promoteur de STAT5A. Cette hyperméthylation entraine la sous-expression de STAT5A, et ainsi le maintien de l'expression de NPM-ALK.

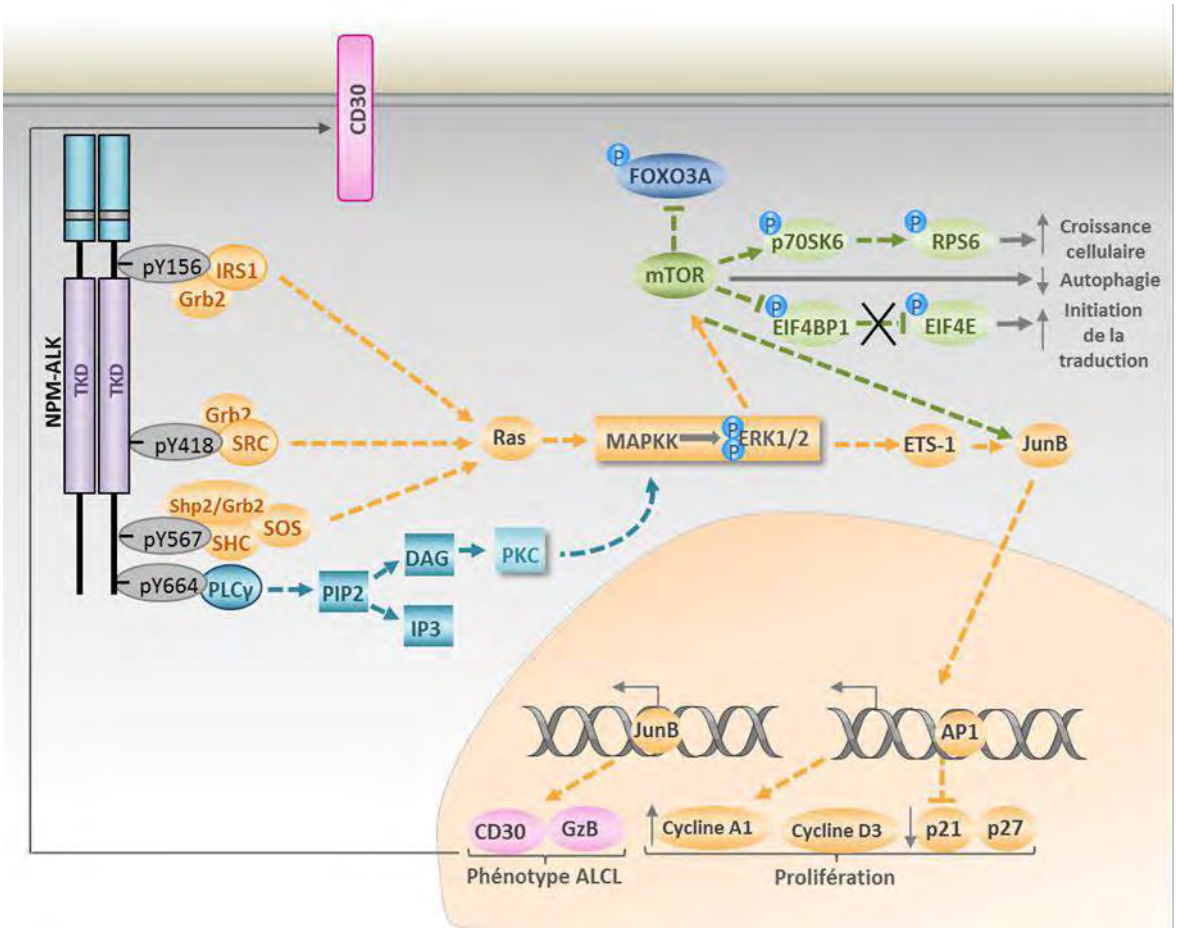


Figure 8 : La voie des MAP Kinases et de la PLC-Gamma
(d'après la thèse de Camille Daugrois : adapté de Roskoski et al., 2013, Pearson et al., 2012 et Chiarle et al., 2008)[47,81–83]

En plus de gènes suppresseurs de tumeurs, STAT3 permet également la régulation par méthylation d'un grand nombre de microARNs : c'est notamment le cas du miR-150, qui est sous-exprimé chez les patients atteints de LAGC NPM-ALK+, et qui agit comme un suppresseur de tumeur lorsqu'il est ré-exprimé dans des modèles cellulaires exprimant NPM-ALK[98]. Le profil d'expression de différents microARNs en aval de NPM-ALK sera détaillé dans la partie 5.2.

- *La voie des MAP kinases (Figure 8) :*

La voie des MAPK (Mitogen-activated protein kinases) est impliquée dans la croissance, la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire. Cette voie a été montrée comme étant activée à la fois dans des lignées cellulaires ainsi que chez des patients atteints par les LAGC NPM-ALK+[99,100].

Plusieurs protéines adaptatrices en amont de la voie des MAPK jouent un rôle primordial dans la transduction de signaux cellulaires et peuvent se lier à ALK *via* leur domaine SH2. Parmi celles-ci, on peut citer GRB2 (Growth factor receptor bound protein2), IRS-1 (Insulin Receptor Substrate 1), SHC (SH2 domain-containing transforming protein), et SRC (SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase)[83] (Figure 8). Cependant, seule l'activation de la protéine GRB2 semble essentielle à l'effet oncogénique médié par ALK, car la mutation des points d'ancrage d'IRS-1 et de SHC au niveau de NPM-ALK ne perturbe pas le pouvoir transformant de l'oncogène[66]. Une fois phosphorylées, ces protéines peuvent recruter SOS (Son Of Sevenless), un activateur des protéines Ras (proto-oncogènes), et induire l'activation de la voie Ras/ERK1/2. Il est intéressant de noter que l'activation de la voie des MAPK semble se faire indépendamment de c-Raf dans les cellules de LAGC NPM-ALK positives[101], contrairement à ce qui a été décrit dans d'autres modèles.

L'activation de la voie des MAPK aboutit d'une part à l'activation de la voie mTOR (mammalian Target Of Rapamycin), et d'autre part à l'activation du facteur de transcription JunB[102]. L'activation de JunB va entraîner la formation du facteur de transcription AP-1 (complexe contenant JunB et FOS) ce qui induit la transcription de cyclines (A1, D3)[102] et l'inhibition de la transcription de gènes codants pour des inhibiteurs du cycle cellulaire (p21, p27)[103] (Figure 8). JunB influe également sur les caractéristiques phénotypiques de ce lymphome en activant les lymphocytes T *via* la stimulation de la transcription du CD30[99] et du granzyme B[104]. Les effets de l'activation de la voie mTOR, en particulier ceux reliés à l'autophagie, seront présentés en détails dans le chapitre 3 partie 4.1.

- *La voie de la phospholipase C-gamma (PLCγ) (Figure 8):*

NPM-ALK contrôle également la prolifération cellulaire en interagissant directement avec la PLCγ. L'amarrage de cette protéine sur NPM-ALK (Y664) induit l'hydrolyse du phosphatidylinositol en inositol trisphosphate (IP3) et en diacylglycérol (DAG). Ces signaux vont permettre l'activation de la protéine

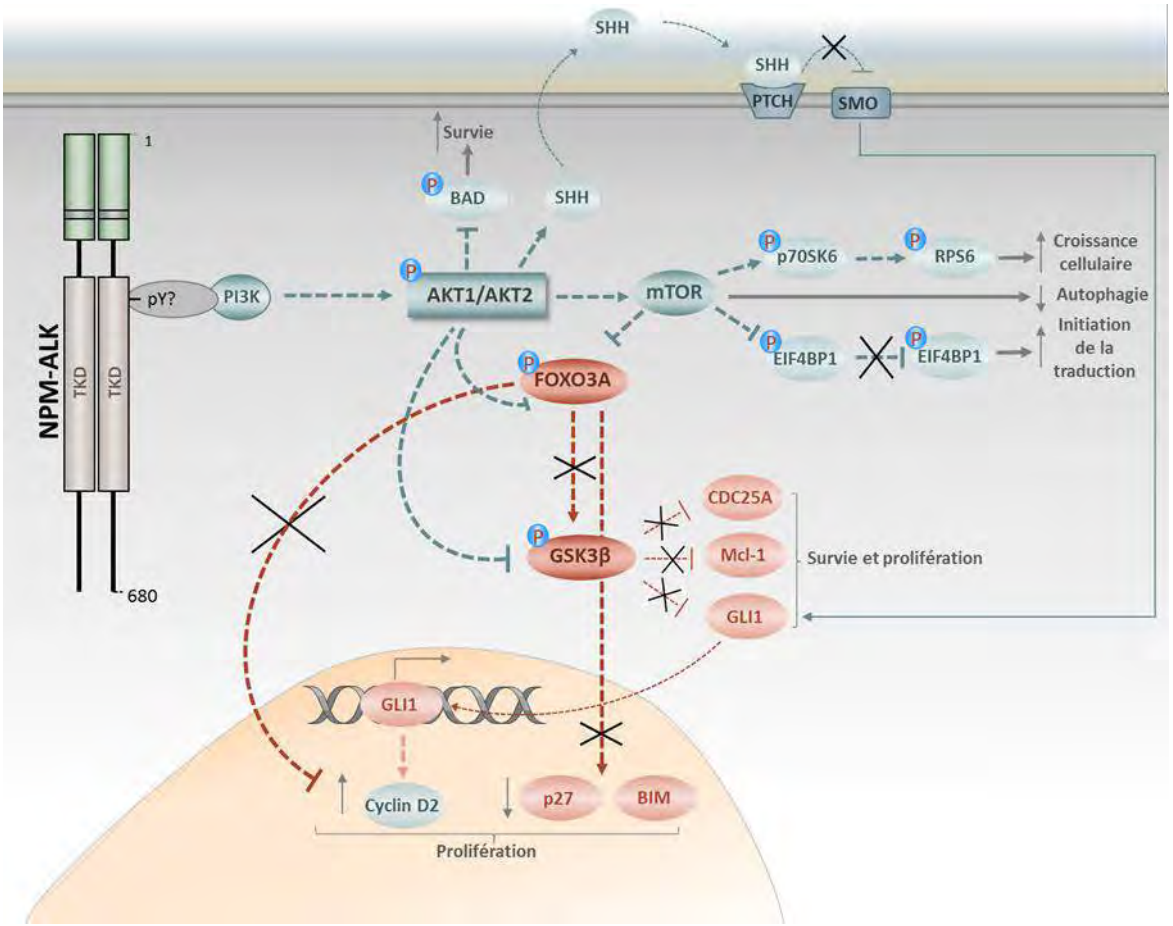


Figure 9 : La voie PIK3-AKT
(d'après la thèse de Camille Daugrois : adapté de Roskoski et al., 2013, Pearson et al., 2012 et Chiarle et al., 2008)[47,81–83]

kinase C (PKC), soit directement par le DAG, soit indirectement par la libération du calcium contenu dans les compartiments intracellulaires médiée par l'IP3. La PKC est elle-même en amont de ERK1/2, et permet l'activation de cette voie de signalisation, et ainsi la prolifération des cellules indépendamment de Ras[105,106].

- *La voie de la tyrosine kinase SRC (Figure 8) :*

SRC (SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase), est une tyrosine kinase qui joue un rôle important dans la migration, la croissance et la prolifération cellulaire. Dans les LAGC ALK+, SRC se lie directement au résidu tyrosine Y418 de NPM-ALK, ce qui permet son activation, et la phosphorylation de Ras, en amont de la voie des MAPK[47,107].

Il est également intéressant de noter qu'un des substrats de SRC est la protéine Vps34, essentielle à l'induction de l'autophagie[108].

- *La voie PI3K/AKT (Figure 9) :*

L'activation de la PI3K (Phosphatydilinositol 3 Kinase) est médiée par son interaction directe avec NPM-ALK[109,110] et conduit à la phosphorylation et à l'activation de la sérine/thréonine kinase AKT. Cette dernière va favoriser la survie cellulaire grâce à différents intermédiaires présentés en Figure 9 :

- Elle permet d'inhiber l'activation de la caspase 9[111].
- Elle empêche l'action inhibitrice de BAD (BCL2-associated agonist of cell death) sur le facteur anti-apoptotique BCL-XL[111].
- Elle entraine l'inhibition par phosphorylation d'une sérine thréonine kinase, GSK-3β (Glycogen Synthase Kinase 3β). Cette inhibition va empêcher la dégradation de la protéine anti-apoptotique MCL1 (Myeloid Cell Leukemia 1), et la dégradation de la phosphatase CDC25A (un régulateur positif du cycle cellulaire)[112], et aura donc un effet promoteur de tumeur.
- Elle induit la phosphorylation du facteur de transcription FOXO3a (Forkhead Box O3a) ce qui conduit à sa séquestration dans le cytoplasme. Il ne pourra donc pas activer la transcription de ses gènes cibles tels que BIM (Bcl-2-like protein 11) ou p27 connus pour promouvoir respectivement l'apoptose ou l'arrêt du cycle cellulaire[113].
- Elle permet l'activation de la voie mTOR, une voie majeure dans le contrôle de la croissance et de la prolifération cellulaire, connue également pour son rôle de régulateur clef de l'autophagie. Cette voie sera détaillée dans le chapitre 2, partie 4.1.

- *Signalisation médiée par le récepteur CD30 (Figure 10) :*

Comme décrit précédemment, la surexpression de CD30 est induite indirectement par NPM-ALK *via* le facteur de transcription JunB[99,114], et son expression peut également être contrôlée par STAT3[99]. Dans

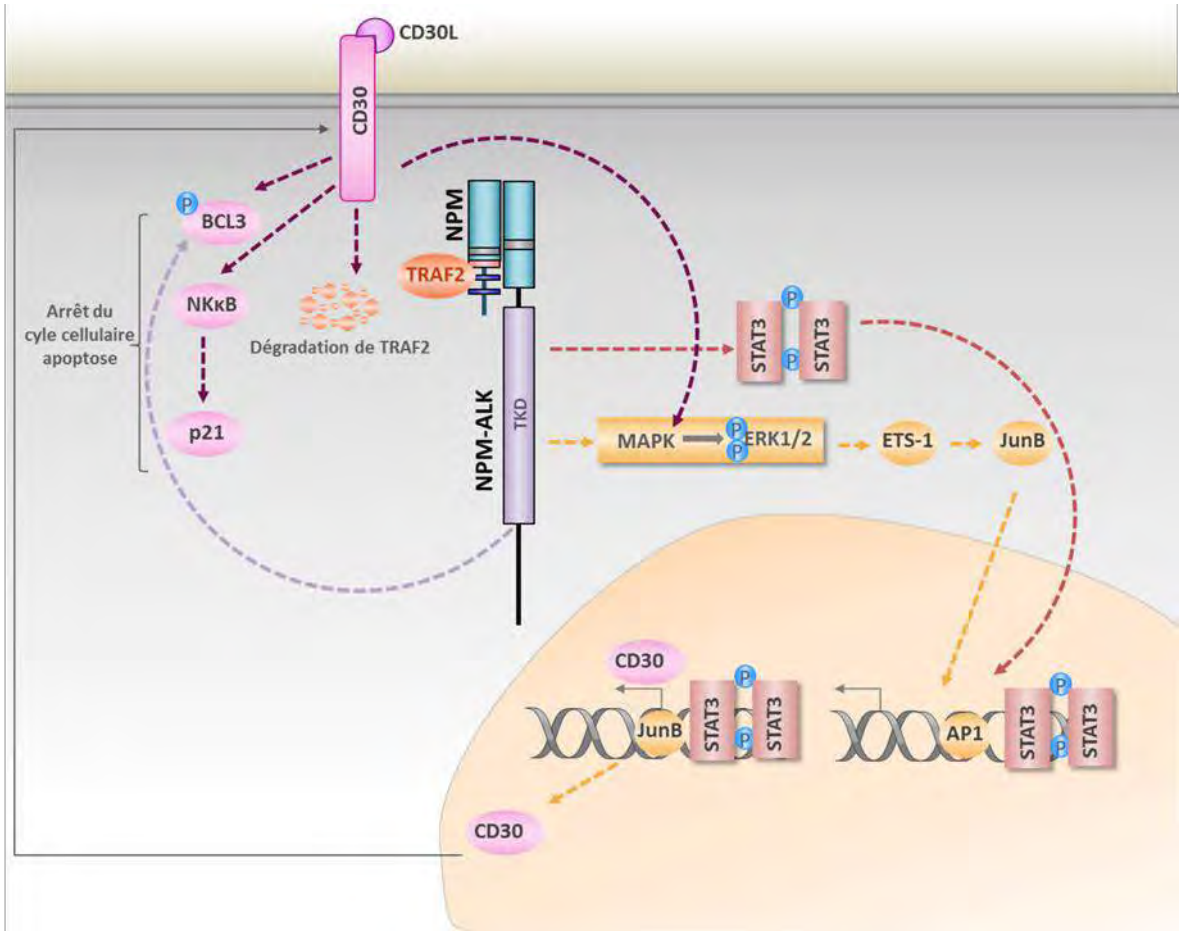


Figure 10 : La signalisation médiée par le CD30
(d'après la thèse de Camille Daugrois : adapté de Roskoski et al., 2013, Pearson et al., 2012 et Chiarle et al., 2008)[47,81–83]

les LAGC ALK+, l'engagement du CD30 par son ligand CD30L aboutit à plusieurs effets opposés et très controversés incluant l'inhibition/activation du cycle cellulaire, la différenciation cellulaire ou l'apoptose. Ces effets sont le résultat du recrutement des protéines anti-apoptotiques TRAFs (Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factors), au niveau du domaine intracytoplasmique du CD30, ce qui entraine l'activation du facteur de transcription NFκB, connu pour être impliqué dans la réponse immunitaire ainsi que la réponse au stress[115].

Il a été montré que les effets de la stimulation du CD30 par son ligand naturel sur la survie dépendent de l'intensité et de la durée de l'engagement du CD30[116]. Après stimulation du CD30, une fraction de LAGC entre rapidement en apoptose suite à la dégradation de la protéine TRAF2. L'autre fraction, qui survit, présente une activation importante de NFκB qui entraîne l'augmentation de l'expression de $p21^{WAF1,}$ un inhibiteur du cycle cellulaire[116] (Figure 10). NPM-ALK permet aussi l'activation de BCL3 (une protéine inhibitrice de NFκB)[117]. La signalisation *via* le CD30 participe également l'activation de la voie de signalisation MEK/ERK/JunB[99].

Des études récentes montrent que l'invalidation du gène CD30 permet l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S[118], et que le traitement de lignées de LAGC ALK+ avec un anticorps anti-CD30 chimérique (SNG-30) induit la mort des cellules par apoptose[119]. Ces résultats suggèrent que le CD30 pourrait être utilisé en tant que cible thérapeutique dans les LAGC ALK+, et des essais cliniques utilisant un anticorps monoclonal anti-CD30 (le brentuximab) sont actuellement en cours (voir Chapitre 2, partie 3.2).

5 PROFIL D'EXPRESSION DES MICROARNS DANS LES LAGC ALK+

L'oncogène NPM-ALK permet la régulation de l'expression de nombreux gènes codants, impliqués dans le développement et la croissance tumorale (voies de signalisation cellulaires, voir partie 4.3.b), mais pas seulement. En effet, de nombreuses études ont montré qu'il était à l'origine de la dérégulation de gènes non codants, et en particuliers de microARNs. L'altération de l'expression de ces petits ARNs non codants est rapportée dans de nombreuses pathologies, et en particulier dans le cancer, où ils peuvent jouer à la fois un rôle oncogène ou suppresseur de tumeur. L'objectif de cette partie est de comprendre les mécanismes de biogenèse de ces microARNs, ainsi que leur mode d'action, afin dans un dernier temps d'observer leur rôle dans l'oncogenèse liée à NPM-ALK.

5.1 Introduction sur les microARNs

Les microARNs (miRs) sont des petits ARN non codants, d'environ 22 nucléotides de long, que l'on retrouve chez les plantes, les animaux, chez certains virus ainsi que chez la levure. Leur découverte remonte à 1993 dans l'organisme *Caenorhabditis Elegans*[120]. Ils jouent un rôle de régulateurs

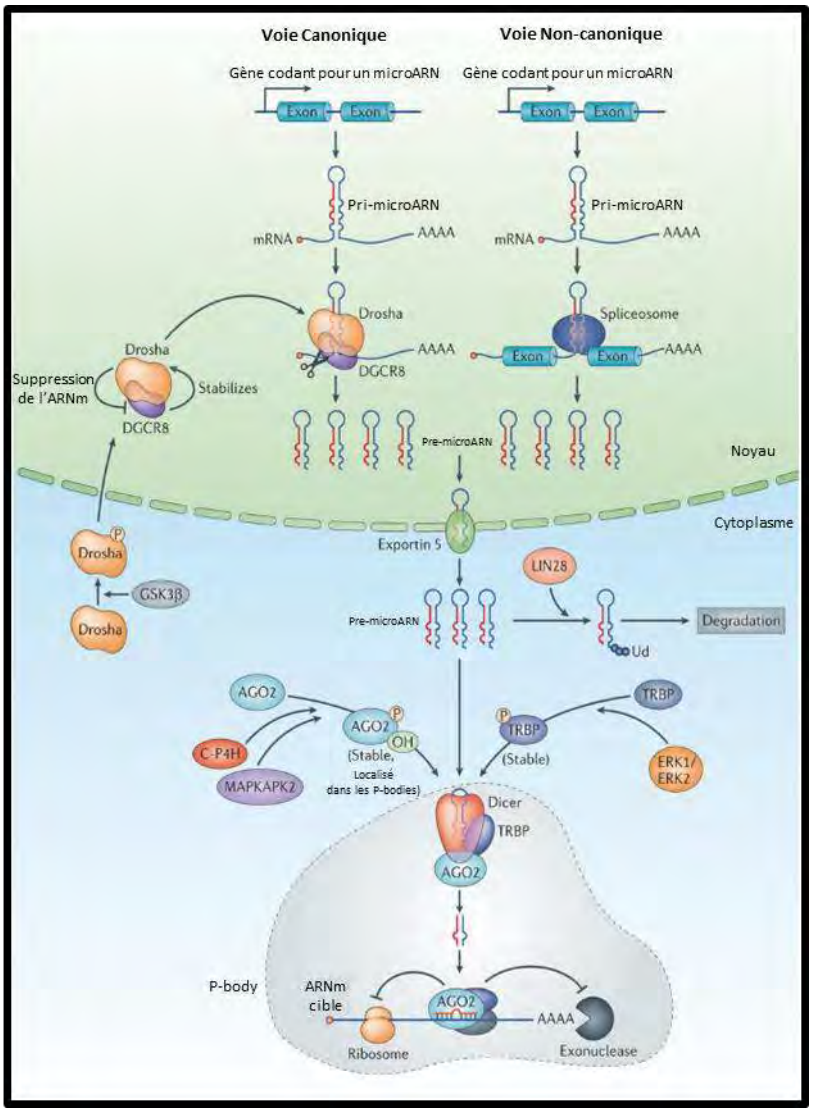


Figure 11 : Mécanisme de la biosynthèse des microARNs
(d'après Li et al., 2014)[121]
La voie de biosynthèse canonique des microARNs (miRs) passe par la transcription de pri-miRs par l'ARN polymérase II. Ces pri-miRs sont ensuite pris en charge et clivés par Drosha-DGCR8 (Di Georges critical syndrom 8) pour former des pré-miRs. Ces pré-miRs sont exportés dans le cytoplasme *via* l'exportine 5 où ils seront processés par Dicer-TRBP (Tar-RNA binding protein 2) puis chargés sur le complexe RISC (RNA-induced silencing complex) *via* la protéine Ago2. C'est ce complexe qui confère aux miRs une activité de régulation post-transcriptionnelle en permettant soit l'inhibition de la traduction, soit la dégradation d'ARNm. Il existe également des voies non canoniques de biosynthèse de miRs ne nécessitant pas l'action de Drosha-DGCR8, comme par exemple les miRtrons (microARNS contenus dans des introns), processés par le spliceosome avant d'être exportés dans le cytoplasme.

transcriptionnels négatifs de l'expression génique en se fixant sur des ARN messagers (ARNm) cibles, et en permettant en général l'inhibition de leur traduction ou leur dégradation. Il faut cependant noter que plus récemment, des études ont montré que les miRs pouvaient également activer la traduction de certaines cibles[122–124], mais cette fonction ne sera pas détaillée dans ce manuscript.

a. Biogenèse des microARNs

La forme mature de ces petits ARNs est générée à partir de longs transcrits primaires, les pri-miRs. Ceux-ci sont produits principalement par l'ARN polymérase II[125], ils sont donc coiffés et polyadénylés[126], et présentent une structure tige-boucle caractéristique. Les pri-miRs peuvent être produits à partir d'unités de transcriptions indépendantes au niveau de régions intergéniques[127], mais également au niveau d'introns et d'exons présents sur les ARN codants et non codants[128].

Une fois transcrits, les pri-miRs sont pris en charge par un complexe « microprocesseur » composé de Drosha (une RNAse III) et de DGCR8 (DiGeorge syndrom critical region 8) (une protéine de liaison aux ARN double brin). Ce complexe permet le clivage de la structure tige boucle du pri-miR, pour former le pre-miR (environ 60 nucléotides de long) au sein du noyau de la cellule. Le pre-miR sera ensuite exporté dans le cytoplasme *via* l'exportine 5[129]. Dans le cytoplasme, les pre-miRs sont pris en charge par un deuxième complexe protéique contenant Dicer (une autre RNAse III), qui permet de libérer, à partir du pre-miR, un duplex microARN (brin guide)/microARN*(brin passager) de taille comprise entre 19 et 24 nucléotides[130]. Ce duplex est alors chargé sur un complexe nommé pre-RISC (pre-RNA induced silencing complex) composé de divers partenaires, notamment une protéine de la famille des Argonautes (Ago), et une protéine de la famille GW182[131]. Après plusieurs étapes de maturation, un des deux brins du duplex d'ARN est dégradé[132] entrainant la formation du complexe miRISC (microRNA induced silencing complex) mature. Ce processus est présenté sur la Figure 11.

L'intensité de la répression transcriptionnelle induite par les microARNs dépend de plusieurs facteurs, notamment du nombre et de l'accessibilité de séquences de liaison sur l'ARN messager ciblé, ainsi que de l'appariement parfait ou non entre le miR et l'ARNm[133,134]. Cette répression transcriptionnelle peut être médiée par différentes voies résumées sur la figure 12.

b. Action sur les messagers

Le microARN va pouvoir guider le complexe miRISC vers ses transcrits cibles, et ainsi réguler leur expression. La spécificité d'action d'un miR sur ses cibles est majoritairement médiée par une région « seed », de 6 à 8 nucléotides, présente sur le microARN. La reconnaissance de ses cibles se fait alors par appariement entre la région « seed » du miR, et la région correspondante sur le transcrit cible[135]. Les séquences reconnues par les miRs sont le plus souvent situées dans la région 3'UTR (3'

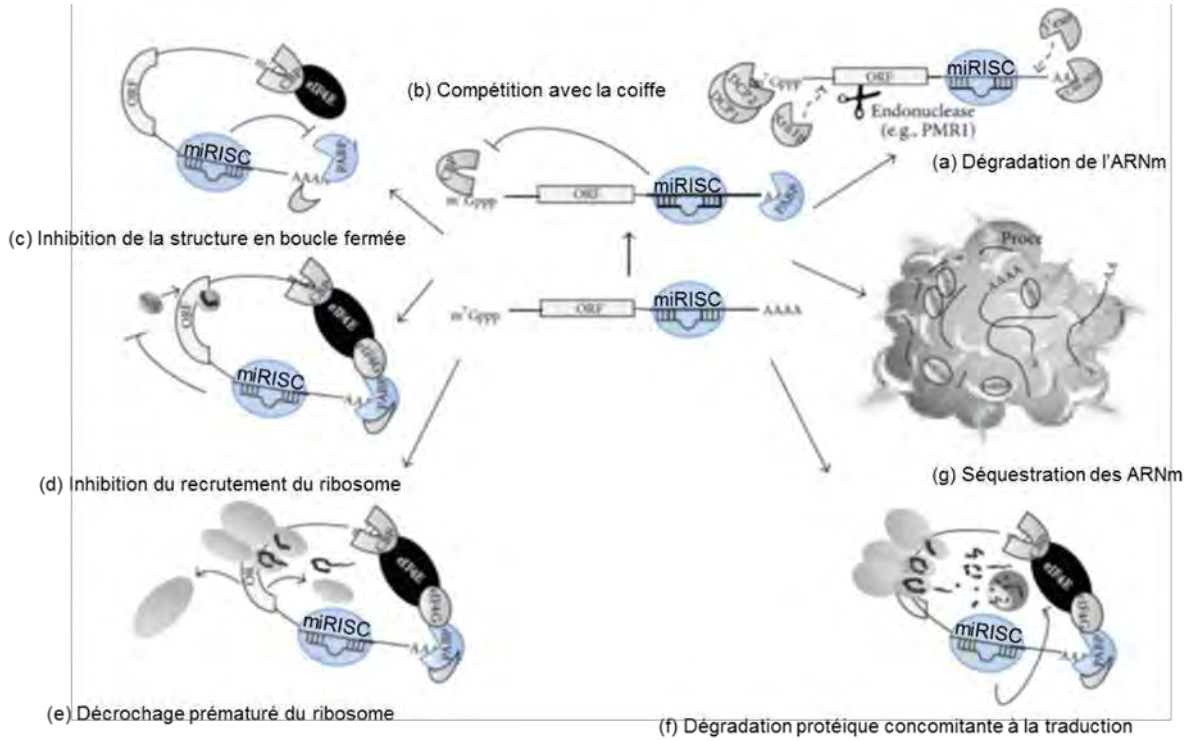


Figure 12 : Mécanismes permettant la régulation post-transcriptionnelle d'ARNm cibles par les microARNs *(d'après Orang et al., 2014)*[136]

La fixation du microARN sur sa cible peut avoir plusieurs conséquences. (a) le complexe miRISC permet le recrutement d'enzymes de déadénylation, de décoiffage, d'exo- et d'endonucléases, provoquant la dégradation du messager cible. (b,c) Les protéines de la famille des Argonautes entrent en compétition avec des facteurs d'initiation de la traduction et inhibent la formation de la structure en boucle fermée de l'ARN. (d,e) Le complexe miRISC interfère avec les sous unités ribosomales en empêchant leur recrutement ou en provoquant leur dissociation de l'ARNm. (f) Le complexe miRISC peut induire une dégradation protéique concomitante à la traduction. (g) Les ARNm cibles peuvent être séquestrés dans des corps P (processing bodies), où ils pourront être dégradés.

UnTranslated Region) des transcrits, bien que certains reconnaissent des régions situées au niveau du 5'UTR et/ou de la séquence codante[137,138].

- *Action au niveau transcriptionnel*

Certaines études montrent que chez les mammifères, les microARNs permettent le recrutement d'une protéine Argonaute spécialisée et la formation d'un complexe RITS (RNA-induced transcriptional silencing), qui entraine un remodelage de la chromatine et ainsi l'extinction transcriptionnelle de certains gènes[139,140].

- *Dégradation des ARNm cibles*

Les microARNs peuvent agir en induisant la dégradation de leur ARNm cibles. Le complexe miRISC permet le recrutement d'enzymes de déadénylation et/ou de décoiffage au niveau du messager qui, ainsi modifié, sera exposé à l'action d'exonucléases cytoplasmiques, ou sera l'objet de clivages endonucléolytiques induits par la protéine PMR1 (polysomal ribonuclease 1)[141].

- *Inhibition de la traduction*

Le complexe miRISC peut également inhiber l'initiation de la traduction : la protéine de la famille Ago recrutée au niveau du complexe entre en compétition avec de nombreux facteurs d'initiation de la traduction, comme par exemple eIF4E. Ago est également capable d'inhiber la formation de la structure secondaire « en boucle fermée » de l'ARNm, ce qui va réduire l'efficacité de la traduction[142].

Les microARNs peuvent aussi contrôler des étapes suivant l'initiation de la traduction. Le complexe miRISC interagit avec divers facteurs d'élongation, ce qui permet à la fois l'inhibition du recrutement du ribosome sur l'ARNm cible, la dissociation des sous-unités ribosomales, et la terminaison prématurée de la traduction[143,144]. Notons aussi que le complexe miRISC peut entrainer la dégradation des protéines en cours de synthèse[145].

Il est également intéressant de mentionner que les microARNs fonctionnent en étroite relation avec une structure cellulaire particulière appelée corps P (Processing-bodies, ou P-bodies). La plupart des protéines nécessaires à l'extinction des gènes par interférence à l'ARN (telles que GW182, ou les Argonautes), sont localisées au niveau de ces corps P. Les microARNs permettraient donc le recrutement des corps P au niveau de leurs cibles. Ces structures sont connues pour séquestrer les ARN messagers et elles participent également à leur dégradation[146,147].

5.2 Les microARNs dans les LAGC ALK+

Les microARNs sont dérégulés dans de nombreuses pathologies, notamment dans les hémopathies malignes[148], et ces dérégulations peuvent être à l'origine de nombreuses conséquences physiologiques

MicroARN	Expression	Cibles	Références
miR-16	Sous-exprimé	VEGF	Dejean et al., 2011
Cluster miR 17-92	Sur-exprimé Expression dépendante de STAT3	BIM	Liu et al., 2013 Spaccarotella et al., 2014
miR-21	Sous-exprimé	DNMT1	Zhang et al., 2011a
miR-26a	Sous-exprimé	iNOS	Zhu et al., 2013
miR-29a	Sous-exprimé Expression dépendante de STAT3 Mise sous silence épigénétique par DNMT1 et DNMT3b	Mcl-1	Desjobert et al., 2011
miR-96	Sous-exprimé	ALK	Vishwamitra et al., 2012
miR-101	Sous-exprimé	mTOR, Mcl-1	Merkel et al., 2010
miR-135b	Sur-exprimé	GATA3, STAT6, FOXO1	Matsuyama et al., 2011
miR-219	Sous-exprimé	ICOS	Zhang et al., 2011b
miR-146a	Sous-exprimé	IRAK1	Merkel et al., 2014
miR-150	Sous-exprimé	MYB	Hoareau-Aveilla et al., 2015

Tableau 4 : MicroARNs impliqués dans l'oncogenèse liée à ALK
(*Adapté de Hoareau-Aveilla et al., 2015*)[98]

et pathologiques. Dans la littérature, plusieurs travaux ont mis en évidence le rôle des microARNs dans la signalisation oncogénique induite par ALK dans les LAGC NPM-ALK+[26,149–153], et il a été montré que NPM-ALK lui-même pouvait être régulé par le microARN miR-96[154]. Ces observations indiquent que les microARNs sont impliqués dans le phénotype cellulaire et la pathogenèse des LAGC NPM-ALK+, ce qui en fait des biomarqueurs potentiels avec des applications cliniques incluant l'identification de nouveaux sous-types de cancers, et le développement de nouvelles thérapies[155]. Les différents microARNs impliqués dans l'oncogenèse liées à ALK sont présentés sur le Tableau 4.

a. Les microARNs dans la pathogenèse des LAGC ALK+

- *Profils d'expression des microARNs dans les LAGC :*

Le groupe du Dr Olaf Merkel a réalisé une des premières analyses utilisant des puces à microARNs dans les LAGC (parue en 2010). Cette étude compare des échantillons tissulaires de LAGC NPM-ALK+, et ALK- ; des lignées cellulaires NPM-ALK+ et ALK- ainsi que des tumeurs issues de modèles de souris transgéniques NPM-ALK+ à des lymphocytes T CD3+ issus de donneurs sains[156]. Différents microARNs potentiellement intéressants ont été mis en évidence dans ces travaux : on peut notamment citer le miR-101, le cluster miR 17-92 et son homologue le cluster miR-106a-363, le miR-155 et le miR-146a.

Une autre étude, parue en 2013 s'est également intéressé au profil d'expression des microARNs dans les LAGC[157]. En utilisant la qPCR à haut débit sur des échantillons de patients, les auteurs ont a pu mettre en évidence 7 microARNs dérégulés dans les LAGC NPM-ALK+ par rapport aux ALK- : cinq de ces miR sont surexprimés (miR-512-3p, miR-886-5p, miR-886-3p, miR-708 et miR-135b), et deux sont sous-exprimés (miR-155, et miR-146a).

Enfin, récemment (en 2015), une étude utilisant le séquençage à haut débit a été utilisée, également afin mettre en évidence les microARNs différentiellement exprimés entre les LAGC ALK+ et ALK-[158]. On retrouve 26 microARNs déjà validés dans les deux études précédentes dont le cluster miR 17-92, miR-101, miR-135b, miR146a et miR-155. D'autre part, ces travaux rapportent que 228 microARNs sont différentiellement exprimés entre les LAGC NPM-ALK+ et les lymphocytes T normaux CD3+. On peut notamment citer la dérégulation de miR-26a et de miR-150, ce dernier présentant la valeur statistique la plus haute[158].

Chacun de ces microARNs participe à l'oncogenèse médiée par NPM-ALK *via* des mécanismes différents qui sont détaillés ci-dessous :

- *miR-101 :*

Les travaux du groupe du Dr Kenner[156] montrent que miR-101 est sous-exprimé dans tous les modèles de LAGC NPM-ALK+ analysé (lignées cellulaires, tissus, modèles murins), par rapport aux lymphocytes

T CD3+ normaux. La réexpression ectopique de ce microARN induit une diminution de la prolifération cellulaire (blocage en phase G0/G1), ainsi qu'une augmentation de l'apoptose dans des cellules de LAGC NPM-ALK+. MiR-101 est connu pour cibler mTOR, ainsi que la protéine anti-apoptotique Mcl-1, ce qui permet d'expliquer le phénotype observé.

- *Le cluster miR 17-92 :*

Le cluster miR-17-92 (OncomiR-1) comprenant miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b-1, miR-20a et miR-92a-1 est localisé sur le chromosome 13. Ce cluster présente des homologies de séquence avec deux autres clusters de microARNs : le cluster miR-106a-363 comprenant miR-106a, miR-18b miR-20b, miR-19b-2, miR-92a-2 et miR-363 situé sur le chromosome X, ainsi que le cluster miR-106b-25 comprenant miR-106b, miR-93 et miR-25, situé sur le chromosome 7[159].

L'étude du groupe du Dr Kenner met également en lumière la surexpression de ce cluster miR 17-92 ainsi que de son homologue miR-106a-363 dans les LAGC NPM-ALK+, par rapport aux LAGC ALK-. Ce résultat a par la suite été confirmée dans d'autres études indépendantes, qui rapportent également la surexpression du cluster miR-106b-25 dans les mêmes conditions[153,157,160]. Le rôle de ces clusters homologues dans la prolifération et le cycle cellulaire, ainsi que dans l'apoptose et dans l'angiogenèse a été montré[159] et s'effectuerait *via* la répression de certaines cibles telles que E2F1 (E2F transcription factor 1), ainsi que des suppresseurs de tumeur tels que PTEN (Phosphatase and Tensin homolog), et p21[161,162].

De plus, un site de liaison au facteur de transcription STAT3 a été identifié sur le promoteur de ce cluster miR 17-92[163], et une autre étude démontre le rôle direct de STAT3 dans la dérégulation de ce cluster dans les LAGC NPM-ALK+[164]. L'inhibition pharmacologique et/ou moléculaire de STAT3, ou de NPM-ALK, entraine la sous-expression du cluster miR 17-92. La réexpression de ces microARNs dans ces mêmes modèles permet de contrer partiellement les effets de l'invalidation en maintenant la prolifération et la survie des cellules[153]. Ce phénomène pourrait s'expliquer par la répression de la protéine pro-apoptotique BIM (Bcl-2-like protein 11), qui serait une cible du cluster miR 17-92[153]. Toutes ces données suggèrent que le cluster miR 17-92 permettrait de maintenir les propriétés oncogéniques de NPM-ALK *via* le facteur de transcription STAT3 dans les LAGC NPM-ALK+.

Il est également intéressant de noter que certains microARNs présents au sein de ce cluster permettent la régulation de l'autophagie par le ciblage de la sérine thréonine kinase ULK1 (unc-51 like autophagy activating kinase 1), responsable de l'initiation de ce processus. Une étude récente a montré que le traitement des NSCLC par des inhibiteurs de la kinase Src entrainait à la fois la diminution de l'expression des miR-106a et 20b (présents dans le cluster miR 17-92), et l'induction d'autophagie[165].

Or, une des cibles proposées pour miR-106a dans la littérature est la sérine-thréonine kinase ULK1, responsable de l'initiation du processus autophagique[166]. La réexpression du miR-106a permet la sensibilisation des cellules tumorales au traitement par l'inhibiteur de Src. Ces observations démontrent encore une fois l'importance du cluster miR 17-92 dans l'oncogenèse, et soulignent son potentiel pouvoir thérapeutique.

- *miR-155 et 146a :*

La sous-expression des miR-146a et miR-155 dans les LAGC NPM-ALK+ a été mise en évidence par plusieurs groupes, et leur expression a été montré comme étant fortement augmentée suite à l'activation des lymphocytes T[167]. Ces informations laissent supposer que ces microARNs jouent un rôle important dans la régulation de la réponse immunitaire innée des LAGC NPM-ALK+. Les cibles putatives de ces miRs seraient IRAK1 (IL-1 Receptor-Associated Kinase 1), une protéine indispensable à la signalisation inflammatoire et à l'activation de la voie NFκB, pour miR-146a[168], et CEBPβ (CCAAT/enhancer-binding protein beta), un facteur de transcription nécessaire au pouvoir transformant de NPM-ALK pour miR-155[168].

- *miR-135b :*

Le miR-135b est sur-exprimé dans les LAGC ALK+ par rapport à d'autres lignées de lymphomes T[26,169], et une étude a mis en évidence la dépendance des LAGC ALK+ pour ce microARN[26] : il participerait donc également au phénotype tumoral. MiR-135b cible FOXO1 (Forkhead box O1), STAT6 (signal transducer and activator of transcription 6), et GATA3, des régulateurs transcriptionnels indispensables dans les lymphocytes Th2 (une classe de lymphocytes T CD4+). L'inhibition de miR-135b dans les LAGC NPM-ALK+ a un impact sur l'angiogenèse et sur la croissance des cellules tumorales à la fois *in vitro* et *in vivo* et supprime la production d'IL-17 (une cytokine pro-inflammatoire)[26]. Les résultats de cette étude laissent donc penser que miR-135b favoriserait un phénotype de type Th17 dans les LAGC NPM-ALK+.

- *miR-26a et miR-150 :*

Comme mentionné précédemment, les travaux du groupe du Dr Quintanilla-Martinez ont permis de mettre en évidence la dérégulation de miR-26a et de miR-150, ce dernier présentant la valeur statistique la plus haute[158].

Mir-26a a été décrit comme ayant un impact sur la prolifération et la migration cellulaire, ainsi que sur le développement de métastases[170]. La réexpression de miR-26a dans des cellules de LAGC NPM-ALK+ est associée à une diminution de la viabilité cellulaire, de l'adhésion sur les cellules endothéliales et de la migration des cellules, phénotype probablement médié par la diminution de l'expression de la

protéine iNOS (NOS2 ; Nitric Oxyde Synthase 2 inducible), et à une réduction de libération d'oxyde nitrique par les cellules[171].

MiR-150, quant à lui, joue un rôle important dans la différentiation des lymphocytes T, et agirait comme un suppresseur de tumeur[172]. Cette hypothèse a été validée par des travaux effectués au sein de notre équipe dans les LAGC NPM-ALK+[98]. En effet, miR-150 est sous-exprimé dans les cellules de LAGC NPM-ALK+ dans différents modèles testés (murins, cellulaires, échantillons de patients) comparé aux cellules normales mononuclées humaines du sang périphérique (PBMC, Peripheral Blood Mononuclear Cells), aux lymphocytes T CD4+ activés ou non, ainsi qu'aux ganglions réactionnels. La répression de ce microARN est dépendante de l'activité de NPM-ALK, et est médiée par STAT3, car l'inhibition de STAT3 (pharmacologique ou moléculaire) est corrélée à la réexpression d'une cible majeure de miR-150 : l'oncogène MYB (v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog). Cette répression est le résultat de la mise en silence épigénétique du gène hôte de miR-150 par méthylation, *via* DNMT1 (DNA methyltransferase 1), une enzyme catalysant le transfert de groupements méthyl sur l'ADN. Cette étude confirme également le rôle suppresseur de tumeur de miR-150, car la réexpression ectopique de ce microARN induit l'inhibition de la prolifération cellulaire, ainsi que le blocage du cycle en phase G0/G1. D'autre part, le traitement par décitabine (une molécule inhibant les DNMTs), de cellules NPM-ALK+ résistantes au crizotinib (un inhibiteur de ALK), entraine une réexpression de miR-150, et une inhibition de la croissance cellulaire.

- *miR-16 :*

Au sein de notre laboratoire, la sous-expression de miR-16 dans des cellules tumorales ganglionnaires de souris exprimant le transgène NPM-ALK a été observée[149]. La réexpression de ce microARN dans des lignées cellulaires de LAGC ALK+, inhibe l'expression du VEGF (VEGFA, Vascular Endothelial Growth Factor A), facteur de croissance essentiel à la mise en place de l'angiogenèse. L'activation de NPM-ALK permet donc la modulation du microenvironnement tumoral, et en particulier la stimulation de l'angiogenèse *via* un mécanisme dépendant de miR-16. Ces résultats ont été validés sur des biopsies de patients, dans lesquelles on retrouve une corrélation inverse entre l'expression du miR-16 et du VEGF. Dans des modèles de xénogreffe de souris nude, la croissance tumorale de cellules ré-exprimant le miR-16 est ralentie par rapport à celle des cellules parentales, ce qui montre bien le potentiel anti-tumoral de ce microARN.

b. Le rôle de NPM-ALK dans la régulation épigénétique de l'expression des microARNs

Les processus de méthylation de l'ADN occupent une place importante dans l'oncogenèse médiée par NPM-ALK. Il a notamment été montré l'ADN methyltransférase 1 (DNMT1), une enzyme responsable

de la méthylation de promoteurs de gènes cible, est fortement exprimée dans les lignées cellulaires et échantillons de patients atteints de LAGC ALK+[173]. De plus, de nombreux gènes participant à la signalisation du TCR sont hyperméthylés dans cette pathologie[164]. De nombreux arguments démontrent que cette modulation épigénétique dans les LAGC NPM-ALK+ dépend du facteur de transcription STAT3 :

- STAT3 peut interagir directement avec les DNMT dans les LAGC NPM-ALK+ : cette interaction permettrait de favoriser le recrutement de ces enzymes au niveau du promoteur de leur gènes cibles, et ainsi favoriser leur méthylation[174].
- STAT3 permet également l'induction de la transcription de DNMT1 dans les LAGC NPM-ALK+[95], et favorise son expression *via* la répression de miR-21 (miR ciblant DNMT1)[175].
- STAT3 induit également la répression de miR-29a *via* l'action de DNMT1 et de DNMT3b. Il s'agit d'un cas particulier car miR-29a a pour cible DNMT3b : celle-ci contrôle donc sa propre expression en inhibant miR-29a[150]. Une étude de notre laboratoire montre que cette répression de l'expression de miR-29a contribue au maintien du phénotype tumoral, car l'expression de MCL-1, un facteur anti-apoptotique cible de miR-29a est maintenue[150].
- STAT3 permet également la répression de miR-219 décrit comme pouvant cibler ICOS (Inducible T-cell costimulator), une protéine impliquée dans la promotion de la croissance cellulaire[176]. Cependant le mécanisme de répression exact n'est pas encore décrit.

En résumé, l'analyse des profils d'expression des microARNs dans les différents modèles de LAGC NPM-ALK+, ont permis d'approfondir les connaissances sur la biologie de ces lymphomes. Certains microARNs, comme par exemple le cluster miR 17-92 sont retrouvés dans plusieurs études, et leur ciblage thérapeutique pourrait être envisagé, en particulier pour les cas réfractaires au traitement initial, ou ceux développant une résistance aux nouvelles thérapies ciblées telles que les inhibiteurs pharmacologiques de ALK. Le nombre croissant d'études sur l'épigénétique dans les hémopathies en général laisse entendre que la modulation de l'expression de certains microARNs par des traitements déméthylants est également une possibilité dans le développement de stratégies de traitement alternatives.

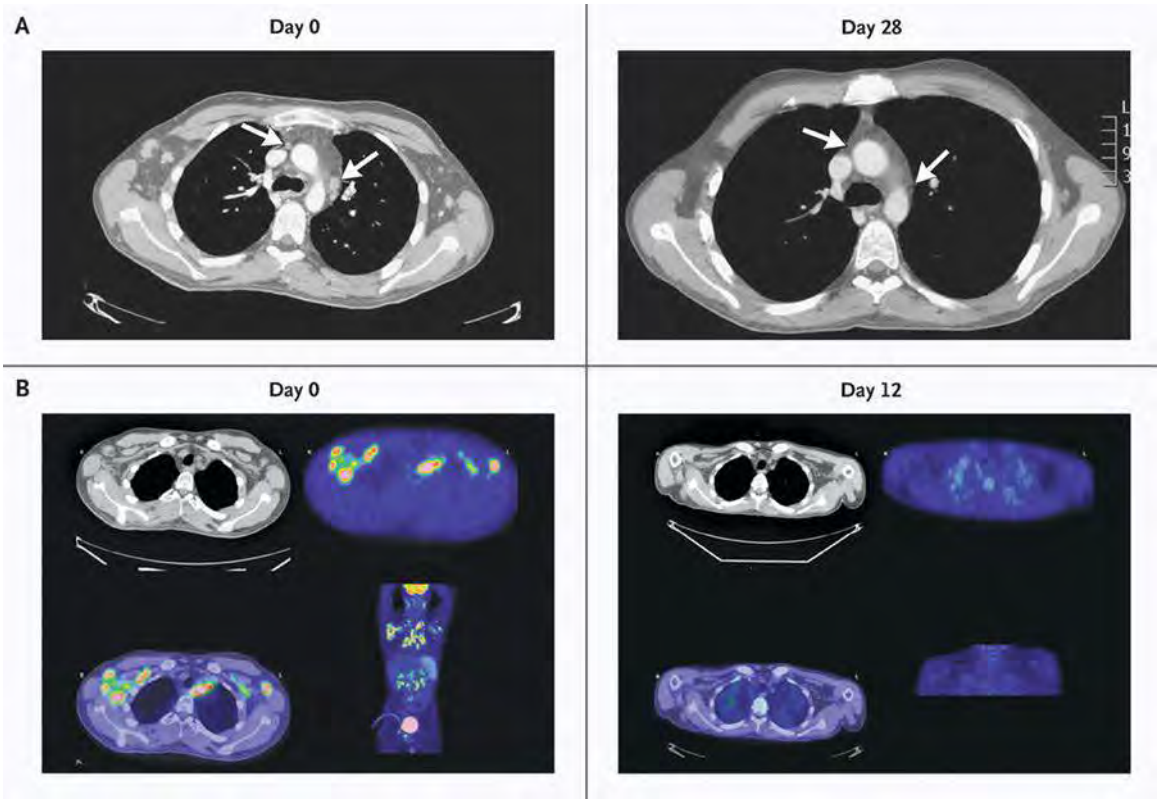


Figure 13 : Imagerie d'un patient avant (jour 0) et après traitement au Crizotinib (jour 28)
(d'après Gambacoti-Passerini et al, 2011)[177]
Patient de 20 ans, atteint de LAGC ALK$^+$, présentant une adénopathie axillaire et inguinale. Les images obtenues par (A) scanner à J0 et J28 et par (B) TEP-FDG (Tomographie par émission de positons - fluorodesoxyglucose) à J0 et J12 montrent une régression de la masse tumorale.

CHAPITRE 2 : TRAITEMENTS DES LAGC ALK+ ET RESISTANCE AUX THERAPIES

1 TRAITEMENTS CONVENTIONNELS

Actuellement, il n'existe pas de consensus international, européen ou même national pour le traitement des LAGC. Celui-ci varie également en fonction de l'âge du patient car l'agressivité de la pathologie est plus importante chez les enfants. L'évaluation de la réponse au traitement repose principalement sur la mesure du volume tumoral chez le patient. La tomoscintigraphie par émission de positons (TEP ; PET Scan) est un outil puissant pour le clinicien[178]. Elle permet notamment de détecter les masses tumorales actives, et utilise une injection de fluor-18-fluoro-désoxyglucose (18FDG), un composé proche du glucose mais n'étant ni métabolisable ni déphosphorylable, et s'accumulant ainsi dans les cellules fortement consommatrices de glucose (Figure 13).

1.1 Traitement de 1ère intention

a. Traitement des adultes

Chez les adultes, la majorité des traitements de première intention sont à base d'anthracyclines. C'est le cas de la combinaison CHOP, qui est considérée comme le traitement standard des lymphomes agressifs[179]. Ce protocole de chimiothérapie combine[180] :

- **Le cyclophosphamide**, un **agent alkylant** appartenant à la famille des moutardes azotées. Il agit par interaction directe sur l'ADN, en formant des liaisons covalentes avec des substrats nucléophiles par l'intermédiaire de ses radicaux alcoyles. Cette action engendre la formation de ponts alkyles intrabrins ou interbrins, et ainsi une inhibition de la transcription et de la réplication de l'ADN, lors de la division cellulaire, aboutissant à la mort cellulaire par apoptose. Son action antimitotique est cycle-dépendante**,** il n'a aucune action sur les cellules en phase Go.
- **La doxorubicine** (anciennement appelée hydroxydaunorubicine ou adriamycine), une anthracycline produite par des bactéries du genre *Streptomyces*. Elle fonctionne comme un **agent intercalant de l'ADN**, et permet également l'inhibition de la topoisomérase II, une enzyme impliquée dans le maintien de la structure tridimensionnelle de l'ADN lors de sa transcription et de sa réplication.

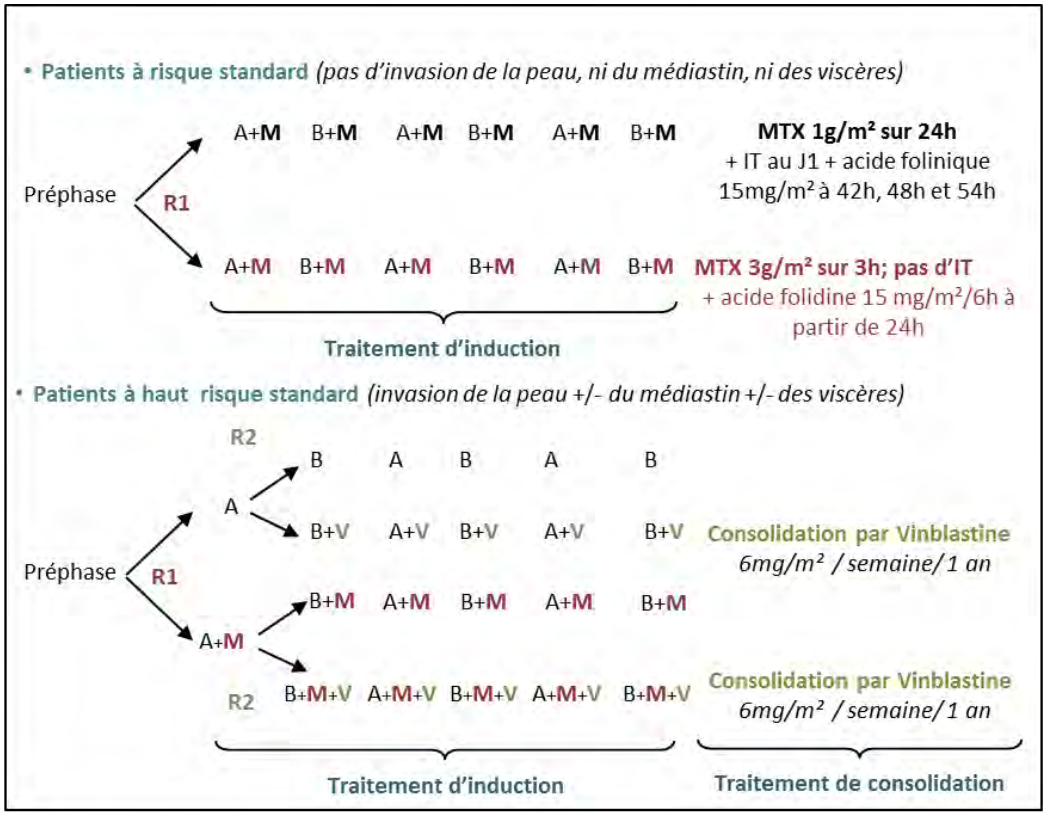
- **La vincristine** (Oncovin), un alcaloïde extrait de la pervenche de Madagascar. Elle a pour effet **d'empêcher la polymérisation des microtubules** en se fixant sur des dimères de tubuline libres, ce qui entraine un arrêt des mitoses, et déclenche le processus d'apoptose.
- **La prednisone**, un **anti-inflammatoire stéroïdien**, dérivé de la cortisone. Ce produit est principalement utilisé pour son effet anti-inflammatoire puissant.

Plusieurs études ont démontré l'efficacité des protocoles à base de CHOP dans les LAGC ALK+ : le pronostic des patients après traitement est généralement favorable[181–183]. Le traitement CHOP a également été comparé à d'autres polychimiothérapies intensives de type VIP (1) comprenant l'étoposide (inhibiteur de la topo-isomérase-II) ainsi que l'Ifosphamide et la cisplatine, (agents alkylants de l'ADN) ; ABVD (2) comprenant la doxorubicine, la bléomycine (antibiotique cytotoxique), la vinblastine (poison du fuseau mitotique) et la dacarbazine (agent alkylant) ; ou ACVBP (3) comprenant la doxorubicine, le cyclophosphamide, la vindésine (poison du fuseau mitotique), la bléomycine, et la prednisone. Les résultats de ces études ne montrent aucune différence entre les patients traités par CHOP, et les autres[182,184]. Cependant, l'ajout d'étoposide au traitement CHOP pourrait améliorer la survie des patients atteints de lymphomes T périphériques, dont les LAGC NPM-ALK+[181].

Certains patients à haut risque de rechute nécessitent une intensification thérapeutique, qui entraine une augmentation de la toxicité hématologique du traitement chimiothérapeutique. Dans ces cas, les cliniciens ont recours à la greffe de cellules souches hématopoïétiques autologues (autogreffe), en première intention, afin de pallier à cette toxicité accrue. Cette technique consiste à recueillir et à conserver des cellules souches du patient avant une chimiothérapie intensive hématotoxique, puis à les réinjecter quelques jours avant la fin du traitement. Les cellules souches vont se loger dans la moelle osseuse et reproduire des cellules sanguines saines dans un délai de 10 à 20 jours. Pendant cette aplasie, le patient est en général placé dans une chambre stérile : il s'agit donc d'un traitement lourd nécessitant une hospitalisation de 3 à 4 semaines dans un service spécialisé. Cette approche n'est pas considérée comme une approche standard pour les LAGC ALK+, malgré les résultats favorables obtenus lorsqu'on considère la totalité des lymphomes T périphériques[185].

b. Traitement des enfants

La stratégie européenne de traitement des LAGC ALK+ pédiatriques se base sur une chimiothérapie intensive en cures courtes et discontinues semblable à celle utilisée pour les lymphomes B agressifs qui sont des lymphomes de l'adulte, et dont l'agressivité est comparable à celle des LAGC ALK+ pédiatriques. Le but premier est d'optimiser les thérapies tout en limitant les séquelles à long terme des molécules utilisées (un enjeu majeur, notamment dans le traitement d'une population



Préphase	
Dexamethasone	5 mg/m² à J1 et J2; 10mg/m² à J3 et J5
Cyclophosphamide	200mg/m² à J1 et J2
Injection intrathécale triple	À J1
Cycle A (A)	
Dexamethasone	10mg/m² de J1 à J5
Methotrexate (MTX)	Randomisation à J1 (R1)
Ifosfamide	800 mg/m² de J1 à J5
Cytarabine	150 mg/m²x2 à J4 et J5
Etoposide	100 mg/m² à J4 et J5
Cycle B (B)	
Dexamethasone	10mg/m² de J1 à J5
Methotrexate	Randomisation à J1 (R1)
Cyclophosphamide	200 mg/m² de J1 à J5
Doxorubicine	25 mg/m² à J4 et J5

Figure 14 : Plan de traitement de l'essai clinique ALCL99
(D'après la thèse de Camille Daugrois, Brugières et al., 2009; Le Deley et al., 2010)[81,186,187]
patients à risque standards sont divisés en deux bras de randomisation (R1) ou une moitié recevra un traitement au méthotrexate (MTX) à 1g/m² en complément d'une alternance de cycles de chimiothérapie A et B. L'autre bras recevra un traitement au méthotrexate (MTX) à 3g/m² en complément d'une alternance de cycles de chimiothérapie A et B. Les patients à fort risque de rechutes sont divisés une première fois en deux bras de randomisation (R1) le premier groupe recevra un cycle A de chimiothérapie, et le second recevra un traitement au méthotrexate (MTX) à 3g/m² en complément de ce cycle A. Les patients sont alors divisés une seconde fois en deux bras de randomisation (R2), et le traitement à la vinblastine sera ensuite administré différentiellement au sein de ces groupes

pédiatrique). Le protocole de référence pour le traitement des enfants est **le protocole ALCL99** comprenant plusieurs cycles de chimiothérapies présentées en Figure 14. L'essai au cours duquel ce protocole a été testé visait à évaluer le bénéfice de l'injection de méthotrexate (antimétabolite, inhibiteur de la dihydrofolate réductase capitale dans le métabolisme de l'acide folique) dans la prophylaxie méningée en remplacement d'injections intrathécales de chimiothérapies (à l'intérieur de l'arachnoïde, une fine enveloppe entourant le cerveau), et d'estimer le bénéfice d'un traitement d'entretien par vinblastine pour les groupes à haut risque de rechute (Figure 14). Les résultats de cette étude ont permis de montrer une forte efficacité de l'administration de méthotrexate à forte dose[186]: ce traitement permet d'éviter les injections intrathécales de chimiothérapie, et permet la prévention des rechutes au niveau des méninges. L'ajout de vinblastine en traitement de consolidation pour les patients à haut risque de rechute permet de retarder l'apparition de rechutes, sans pour autant diminuer leur incidence[187].

Le taux de rémission complète obtenu après traitement est actuellement supérieur à 90%, et la survie sans évènements (EFS, délai entre l'entrée dans un essai clinique et l'échec du traitement) est de près de 70%. Cependant, dans la majorité des essais pédiatriques concernant les LAGC ALK+, 25 à 35% des patients ont rechuté ou progressé sous traitement[188]. Des traitements de seconde intention ont donc été développés et sont utilisés pour lutter contre ces rechutes.

1.2 Traitements de 2nde intention

a. Traitements de l'adulte

Pour les patients adultes réfractaires ou ayant rechuté après la première ligne de traitements, les cliniciens utilisent en général la chimiothérapie à haute dose accompagnée d'une autogreffe. Il n'existe qu'une petite série de patients correspondant à ces critères : on sait néanmoins que l'EFS à 3 et 5 ans pour l'utilisation de l'autogreffe chez des patients atteints de lymphomes T périphériques en rechute (dont les LAGC NPM-ALK+) varie entre 25 et 75%[189–191]. Il existe encore moins de données sur le rôle de la greffe de cellules allogéniques pour les patients réfractaires au traitement ou en rechute, et comme pour l'autogreffe, les études regroupent tous les sous-types de lymphomes T périphériques[192]. Un des avantages de l'allogreffe est qu'elle entraine le développement d'une réaction des lymphocytes du greffon contre la tumeur (Graft *vs* Lymphoma effect), ce qui améliore l'effet de la chimiothérapie. Cependant, un des effets secondaires majeurs de cette technique est l'attaque potentielle des cellules hôtes saines par les lymphocytes du greffon (Graft *vs* Host Disease).

Très peu d'informations sont disponibles sur les patients réfractaires au traitement ou en rechute, non éligibles pour une greffe de cellules souches hématopoïétiques. Une étude a montré que pour les

patients atteints de LAGC (dont 11 ALK+) non éligibles pour une greffe, la survie globale médiane était de 3 mois, et la survie sans progression (délai entre le début du traitement et la progression de la maladie ou la mort) était de 1.8 mois[193].

b. Traitements de l'enfant

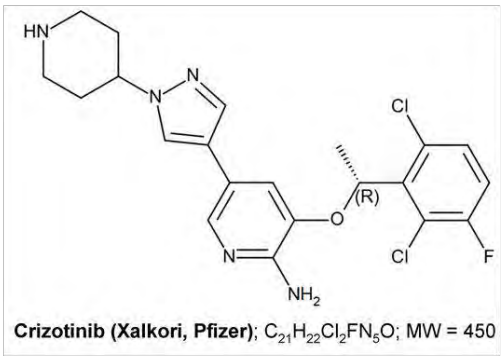
A la différence des autres lymphomes non-hodgkiniens pédiatriques, les patients en rechute sont en général sensibles à la chimiothérapie, et leur survie après traitement est bonne. Il n'existe cependant pas de consensus dictant l'utilisation d'un traitement particulier. Les cliniciens disposent de différentes options thérapeutiques à la rechute parmi lesquelles on trouve la chimiothérapie à haute dose suivie d'une autogreffe ou d'une allogreffe[190], ou encore la vinblastine en perfusion hebdomadaire[194].

Une étude récente a permis de confirmer l'efficacité de l'allogreffe[195], cependant la plupart des cliniciens considèrent que le recours à cette technique serait plus approprié en cas de deuxième rechute, en particulier à cause de la morbidité élevée qu'elle entraine.

Une étude européenne actuellement en cours (NCT00317408, https://clinicaltrials.gov) a pour but d'évaluer l'efficacité d'un traitement hebdomadaire à la vinblastine pour les patients en rechute : une analyse intermédiaire (présentée au 4^{e} symposium international des lymphomes non-hogkiniens de l'enfant et du jeune adulte) confirme l'efficacité de la vinblastine qui confère une EFS à 2 ans de 87% (suivi médian de 34 mois), et qui permet de retarder l'apparition des rechutes chez les patients. Les résultats définitifs de cette étude sont donc très attendus.

En résumé, tous ces résultats indiquent que les patients atteints de LAGC ALK+ répondent très bien à la chimiothérapie, en comparaison aux autres lymphomes agressifs. Cependant, l'EFS à long terme reste toujours de 70% pour les adultes et de 25 à 30% chez les enfants quelle que soit la combinaison thérapeutique utilisée. Les thérapies actuellement proposées en seconde intention sont lourdes, et ont un fort impact sur la qualité de vie des patients (notamment pour les enfants). Il faut également noter que certains patients ne sont pas éligibles pour des thérapies impliquant la greffe de cellules souches hématopoïétiques : c'est dans ce cadre que le développement de nouvelles thérapies ciblées, incluant des inhibiteurs de ALK comme le crizotinib trouvent leur place, et laissent entrevoir des résultats prometteurs.

A



Crizotinib (Xalkori, Pfizer); $C_{21}H_{22}Cl_2FN_5O$; MW = 450

B

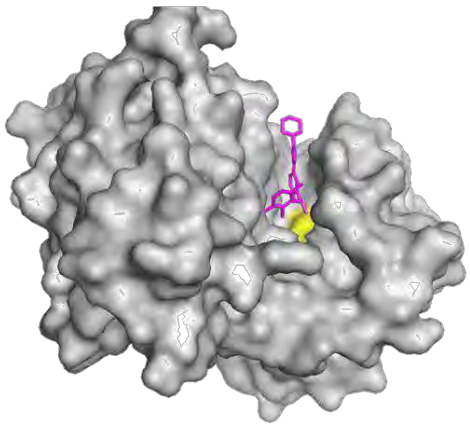


Figure 15 : Structure du Crizotinib

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

Kinases Cibles du Crizotinib	IC50 (nM)
C-MET	8,0
ALK	20
RON	80
AXL	294
TIE2	448
TRKA	580
TRKB	399
ABL	1159
IR	2887
LCK	2741

Tableau 5 : Kinases inhibées par le Crizotinib

(d'après Cui et al., 2011)[196]

Le Crizotinib a été initialement développé pour l'inhibition de c-MET Il permet aussi l'inhibition de nombreuses autres kinases, notamment ALK et RON, avec des IC50 relativement faibles.

1.3 Le crizotinib : une thérapie ciblant ALK

a. Le crizotinib

- *Découverte :*

Le crizotinib, (PF-02341066, Xalkori®, Pfizer) ou (R)-3-[1-(2,6-dichloro-3-fluoro-phenyl)-ethoxyl]-5-(1-piperidin-4-yl-1H-pyrazol-4-yl)-pyridin-2-ylamine, est un inhibiteur de tyrosines kinases développé par la société Pfizer (Figure 15A). Cette molécule a été initialement développée dans le but de cibler la tyrosine kinase c-MET (HGFR, Hepatocyte Growth Factor Receptor), impliquée dans le développement de nombreux cancers. Après criblage pharmacologique, plusieurs composés ayant la capacité de se lier et d'inhiber c-MET ont été découverts. Cependant, leurs propriétés ADME (Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion), n'étaient pas appropriées pour une utilisation en clinique. C'est pourquoi, des modifications chimiques ont été apportées à ces molécules : ce sont ces modifications qui, à terme, ont donné naissance au crizotinib. Par la suite, afin de vérifier son efficacité ainsi que sa spécificité, un criblage de 120 kinases différentes a été effectué. Parmi toutes ces protéines, il a été montré que le crizotinib permettait l'inhibition de 13 kinases différentes (voir Tableau 5), dont en particulier c-MET, le récepteur à activité tyrosine kinase RON (Récepteur d'Origine Nantais) (dont le domaine kinase partage 63% d'homologie avec celui de c-MET), et ALK (36% d'homologie)[196]. Dans ce manuscript, nous nous intéresserons uniquement à liaison du crizotinib avec ALK, bien qu'il puisse cibler d'autres kinases.

- *Structure et mécanisme d'action :*

La structure cristallisée de ALK en complexe avec le crizotinib a été modélisée (code Protein Data Bank 2xp2, Figure 15B) et a permis d'observer une conformation particulière de la kinase[196]. Comme décrit dans la partie 4.1.b du chapitre 1, le domaine kinase de ALK est composé de deux lobes, comprenant notamment une hélice α-C, et une boucle d'activation (A-loop) qui portent un motif DFG (Asp-Phe-Gly). Ces structures sont essentielles à l'activité catalytique de ALK, et leur orientation détermine l'état actif ou inactif de la kinase[52,56]. Les expériences de cristallographie effectuées montrent que le crizotinib lie ALK lorsque celui-ci est dans un état intermédiaire (actif/inactif)[196]. En effet, comme pour les kinases en conformation inactive, on observe :

- Une fermeture des lobes N et C terminaux,
- Un décalage de l'hélice α-C (en position inactive),

Ces deux éléments interfèrent avec la fixation de l'ATP sur la kinase, et avec sa capacité de se lier à son substrat.

En revanche, ALK ne présente pas toutes les caractéristiques des kinases en position inactive :

- La boucle d'activation ne bloque pas le site de liaison à l'ATP (comme elle le fait classiquement dans un état inactif)
- Cette même boucle est en conformation « DFG-in », ce qui est caractéristique d'une conformation active d'une kinase.

Cet état intermédiaire observé est appelé « auto-inhibiteur » (autoinhibitory state), et permet d'expliquer pourquoi ALK n'est pas phosphorylé (donc inactif), en présence de crizotinib[197]. On considère donc que le crizotinib agit comme un inhibiteur compétitif de l'ATP dans ce modèle.

- *Effets au niveau cellulaire :*

Au niveau cellulaire, plusieurs études ont montré que le crizotinib entraine l'inhibition de la phosphorylation de ALK, et qu'il permet l'inhibition de la prolifération de cellules tumorales ALK positives, aussi bien dans des modèles présentant une translocation (LAGC, NPM-ALK ; NSCLC, EML4-ALK, etc.), que dans des lignées de neuroblastomes présentant une mutation activatrice de ALK pleine taille[198,199]. Le crizotinib induit l'inhibition de la prolifération cellulaire, associée à l'arrêt du cycle en phase G1/S, l'inactivation des voies cellulaires en aval de ALK (ERK1/2, STAT3, AKT, PLCY) ainsi qu'un effet pro-apoptotique. De plus, le traitement de modèles murins porteurs de xénogreffes tumorales par le crizotinib favorise la diminution de la croissance tumorale[198].

- *Mise sur le marché :*

En août 2011, la FDA (Food and Drug Administration) a délivré une autorisation de mise sur le marché, aux Etats Unis, pour le traitement en seconde intention de patients atteints de NSCLC ALK+, et l'ANSM (Agence Nationale de sécurité du médicament et des produits de santé) a suivi pour la France en octobre 2012[200].

En novembre 2015, cette autorisation a été étendue pour le traitement en première intention des NSCLC ALK+ aux Etats Unis[201]. La place du crizotinib dans le traitement des LAGC ALK+ est discutée plus en détail ci-dessous :

b. Utilisation chez le patient atteint de LAGC ALK+

- *Utilisation chez le patient adulte :*

La première utilisation clinique du crizotinib a été publiée en 2010 pour deux cas d'adultes ayant subi une rechute après traitement par chimiothérapie et greffe autologue de cellules souches[202]. Cet inhibiteur spécifique de ALK a également été utilisé en deuxième intention comme un « pont » entre un traitement de première intention inefficace et une transplantation de cellules souches chez deux patients[203,204]. Une autre étude concernant l'administration de crizotinib en clinique a été effectuée par l'équipe du Pr. Carlo-Gambacorti-Passerini. Elle inclue un total de 11 patients atteints de LAGC

ALK+ réfractaires à la chimiothérapie, ou ayant rechuté. Tous les patients ont répondu à la thérapie ciblée (seule ou en combinaison avec des transplantations de cellules souches hématopoïétiques), et étaient en réponse complète jusqu'à, dans certains cas, plus de 40 mois après le début du traitement[205]. Actuellement, un essai clinique en phase IV (NCT02487316, https://clinicaltrials.gov), mené par l'Université de Pékin est en cours, et a pour but d'étudier l'efficacité de la combinaison du crizotinib avec des traitements chimiothérapeutiques, en première intention pour des patients âgés de 18 à 65 ans.

- *Utilisation chez l'enfant :*

Peu de temps après les premiers résultats obtenus chez l'adulte, le Children's Oncology Group (COG, CA USA) a mis en place un essai clinique de phase I (NCT00939770, https://clinicaltrials.gov), ayant pour but de déterminer la dose maximale tolérée de crizotinib chez les enfants et jeunes adultes, pour pouvoir poursuivre les tests en phase II. Cette étude a enrôlé 79 patients âgés de 1 à 22 ans, et s'est terminée en 2012. Les résultats indiquent que la dose maximale tolérée utilisable en phase 2 est de 280mg/m², administrée deux fois par jour. Neuf patients atteints de LAGC ALK+ qui avaient tous subi un traitement chimiothérapeutique préalable, ont été inclus dans cette étude. Sept réponses complètes ont été rapportées pour ces patients, pour des doses allant de 165 à 280mg/m² [206]. La phase II de cet essai a été initiée, et comprend 122 patients, âgés de 1 à 21 ans. Le but de cette étude est d'évaluer l'efficacité du crizotinib en tant qu'agent anti-tumoral chez ces patients.

L'étude des combinaisons thérapeutiques est également à l'ordre du jour : le COG a démarré un essai clinique (NCT01606878, phase I, https://clinicaltrials.gov) qui permettra d'évaluer l'efficacité de combinaisons thérapeutiques (crizotinib + chimiothérapies), administrées en seconde intention chez des jeunes patients (< 21ans) réfractaires aux traitements de première ligne, ou ayant rechuté. D'autre part, le National Cancer Institute a initié une étude (NCT01979536, actuellement en phase II, https://clinicaltrials.gov) dont l'objectif est de déterminer l'efficacité de thérapies combinées administrées directement en première intention. Les combinaisons comprennent un traitement par chimiothérapies conventionnelles additionné soit de brentuximab (un anticorps monoclonal anti-CD30), soit de crizotinib. Les résultats de ces différents essais cliniques sont attendus afin de pouvoir déterminer avec plus de précision la place du crizotinib dans le traitement des LAGC ALK+.

Il est cependant très important de noter que le traitement par le crizotinib ne doit pas être interrompu : deux cas de patients âgés de 4 et de 26 ans ont rechuté brutalement après l'arrêt du traitement au crizotinib[207]. Chez ces deux patients, l'existence de cellules tumorales résiduelles (cellules quiescentes, voir chapitre 4, partie 1.2.b) a perduré jusqu'à 3 ans après le début du traitement au crizotinib, ce qui

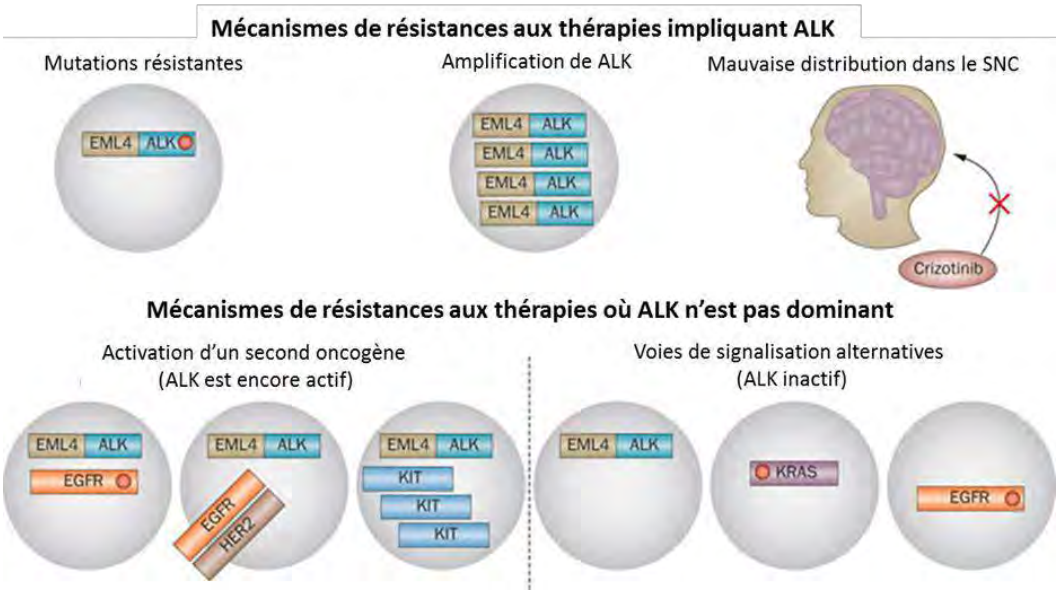


Figure 16 : Mécanismes de résistance au Crizotinib retrouvés dans les Cancers du Poumon Non à Petites Cellules (NSCLC)

(d'après Doebele et al., 2012)[208]

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

	NSCLC (EML4-ALK)	LAGC (NPM-ALK)
Traitement au Crizotinib	1151T-Ins L1152R C1156Y I1171S/T/N/H F1174L/C/V/ V1180L L1196M G1202R D1203N S1206Y G1269A	I1171N/T/S F1174C/V/I L1196Q R291Q R335Q

Tableau 6 : Mutations de ALK décrites dans les Cancers du Poumon Non à Petites Cellules ALK positifs (NSCLC ALK+) et dans les Lymphomes Anaplasiques à Grandes Cellules ALK positifs (LAGC ALK+) en réponse au traitement au Crizotinib

(Shaw et al., 2016, Wu et al., 2016, Sullivan et al., 2016, Amin et al., 2015)[209–212]

laisse penser que des études additionnelles sont encore nécessaires avant d'utiliser les thérapies ciblées en traitement de première intention.

A ce jour, en France, le crizotinib possède, depuis novembre 2013, une Autorisation Temporaire d'Utilisation (ATU) pour le traitement des enfants, depuis novembre 2013.

2 RESISTANCE AUX THERAPIES

Le bénéfice clinique apporté par les thérapies ciblées est relativement court, notamment à cause de l'apparition de résistances. Le premier essai clinique impliquant le crizotinib a été lancé en 2006 dans les NSCLC ALK+[213], et les premières résistances à cet inhibiteur ont été rapportées peu de temps après[208,214–217]. Récemment, ces résistances ont également été observées dans les LAGC ALK+[218,219]. Cette observation laisse penser que les mécanismes de résistance au crizotinib mis en évidence dans les NSCLC, et décrits ci-dessous pourraient à terme être transposables dans les LAGC ALK+. Ces mécanismes sont présentés en Figure 16 et seront détaillés ci-dessous.

2.1 Les mutations du domaine kinase de ALK

a. Dans les NSCLC :

La présence de mutations dans le domaine kinase de ALK est responsable d'en moyenne 30% des résistances au crizotinib dans les NSCLC ALK+[220]. Ce mécanisme a déjà été décrit notamment pour les leucémies myéloïdes chroniques exprimant la tyrosine kinase Bcr-Abl, résistantes à l'Imatinib (un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase Abl)[221], ou dans les cancers impliquant l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), résistants au Gefitinib (un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR)[222]. Plusieurs mutations différentes peuvent apparaitre et entrainer des résistances au crizotinib.

Deux mutations, L1196M et C1156Y ont été détectées pour la première fois chez un patient ayant rechuté après une réponse partielle au traitement par le crizotinib[216]. La mutation L1196M est la plus fréquente et correspond à la mutation du résidu gatekeeper de la kinase, c'est-à-dire du seul résidu de la poche à ATP de la kinase qui permet de contrôler sa sensibilité à différents inhibiteurs. Elle empêche l'action du crizotinib par encombrement stérique[213]. La deuxième mutation la plus fréquemment retrouvée est la mutation G1269A. La mutation G1202R, qui correspond à la mutation G340W de BCR-ABL est notable, car elle confère à ALK un fort pouvoir de résistance au crizotinib[209,214]. De nombreuses autres mutations existent, et se produisent généralement au niveau des résidus 1151, 1152, 1156, 1174, 1202, 1203 et 1206 de ALK[210]. Les exemples de mutations les plus fréquemment retrouvées chez des patients atteints de NSCLC ALK+ sont présentés dans le Tableau 6.

La localisation de ces mutations sur la kinase ALK est variable : elles peuvent se situer au niveau de la partie exposée au solvant (résidus 1202 à 1206), jouxtant ainsi le site de fixation du crizotinib[214], au niveau de l'hélice α-C (résidus 1151 à 1174)[214–216], ou au niveau du site de fixation à l'ATP (résidus 1196 et 1269). Ces mutations confèrent un degré de sensibilité variable au crizotinib : par exemple, la mutation 1151Tins (Insertion d'une thréonine en position 1151) confère une très forte résistance à l'inhibiteur de ALK, alors qu'au contraire, la mutation S1206Y confère un phénotype très peu résistant au crizotinib[209,214].

b. Dans les LAGC ALK+ :

Plusieurs lignées cellulaires de LAGC NPM-ALK+ cultivées en présence de concentrations croissantes de crizotinib ont développé une résistance à cet inhibiteur par mutation du domaine kinase de ALK. De nombreuses mutations différentes ont été décrites, et sont présentées dans le Tableau 7. Parmi celles-ci, on peut notamment mentionner les mutations L1196Q (résidu gatekeeper), et L1171N (résidu situé dans l'hélice αC), présentes dans deux lignées cellulaires résistantes au crizotinib utilisées au laboratoire[218].

Dans la littérature, on trouve peu d'études rapportant l'existence de mutations de ALK induisant une résistance au crizotinib chez les patients atteints de LAGC ALK+. Cependant, récemment, le groupe du Pr. Gambacorti a décrit l'apparition de telles mutations chez deux patients sur onze ayant subi un traitement de seconde intention avec le crizotinib. Ces mutations correspondent à celles déjà décrites dans les lignées cellulaires de LAGC NPM-ALK+[205].

De façon surprenante, l'existence de mutations conduisant à la sensibilisation de ALK au traitement par le crizotinib a également été rapportée[223]. Une analyse rétrospective sur des échantillons de 36 patients atteints de LAGC NPM-ALK+ (séquençage de NPM-ALK) montre l'apparition de ce type de mutations (R291Q, lobe C-terminal et R335Q, boucle d'activation) chez deux de ces patients. Ces deux mutations induisent une sensibilité accrue de ALK au crizotinib, ce qui implique que certains patients pourraient bénéficier du traitement au crizotinib en première intention (utilisation de doses plus faibles et de temps de traitement plus court).

2.2 L'amplification de ALK

Dans 18% des cas de NSCLC ALK+, la résistance des cellules cancéreuses aux thérapies ciblant ALK passe par une amplification (copy number gain) du gène codant pour ALK[214,224]. Ce mécanisme peut avoir lieu seul, ou en combinaison avec une mutation du domaine tyrosine kinase de ALK[209,224] De façon intéressante une étude a montré que le niveau d'expression de ALK, et donc l'intensité de la

signalisation en aval de cette kinase dans la cellule peut jouer un rôle à double tranchant : l'inhibition de ALK par traitement au crizotinib dans des lignées tumorales sensibles au crizotinib (dépendantes de l'oncogène) induit la mort de ces cellules alors que dans des lignées résistantes, cultivées en présence de crizotinib, le retrait de l'inhibiteur induit également la mort des cellules[212]. Une quantité trop importante de ALK, peut donc tout comme une quantité trop faible, être fatale pour la cellule. Le groupe du Pr Gambacorti a également montré que le mécanisme d'amplification de NPM-ALK était prépondérant dans les Karpas-299 (une lignée cellulaire de LAGC NPM-ALK+) résistantes au brigatinib (un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase de ALK de seconde génération)[225].

2.3 L'activation de voies de signalisation alternatives

La résistance des cellules tumorales peut également être due à l'activation de voies de signalisation alternatives limitant de ce fait l'effet du crizotinib. Dans les NSCLC ALK+, l'activation d'autres oncogènes tels que c-KIT, EGFR, KRAS (V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) et IGF1R (insulin-like growth factor 1 receptor) a notamment été décrite (36% des cas)[208,209,224].

Dans les LAGC NPM-ALK+, la résistance aux inhibiteurs de la kinase ALK par l'activation de voies alternatives n'a à ce jour pas été décrite. Des études plus approfondies sont encore nécessaires pour déterminer si cette hypothèse doit être définitivement écartée pour cette pathologie.

Notons également que l'augmentation de l'activité des pompes à efflux peut être observée dans des cellules traitées par un inhibiteur de ALK. Ce mécanisme permet un turn-over rapide, et une excrétion forcée du crizotinib[226], et diminue ainsi son efficacité. Cependant, il n'a à ce jour pas encore été décrit dans les LAGC NPM-ALK+.

L'apparition de tous ces phénomènes de résistance en un laps de temps très court, incite les chercheurs et les cliniciens à se tourner vers le développement de nouvelles thérapies permettant de contrecarrer et idéalement de prévenir l'apparition de résistances et de rechutes tumorales.

3 NOUVELLES OPTIONS THERAPEUTIQUES

3.1 Autres inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de ALK

Les inhibiteurs de deuxième génération ciblant ALK ont été développés pour plusieurs raisons :

- Ils sont plus puissants que le crizotinib c'est-à-dire qu'ils peuvent être utilisés à des doses moins importantes pour inhiber l'activité oncogénique de ALK.
- Ils permettent de contrer le phénomène d'apparition de résistances au crizotinib, en étant actifs même en présence de mutations de ALK

Inhibiteurs de ALK	Autres cibles	Activité contre L1196M	Activité contre C1156Y	Activité contre G1202R	Activité contre d'autres mutations	Pas d'activité contre ces mutations
Ceritinib	IGFR-1, InsR, ROS1	Oui	Non	Non	G1269A, I1171T, S1206Y, L1152R, F1174L, V1180L	F1174C/I/V, G1123S
Alectinib	LTK, GAK	Oui	Oui	Non	G1269A, S1206Y, L1152R*, F1174L*, 1151T-ins	G1202R, V1180L, F1174C/I/V/L*, I1171N/S/T
Brigatinib	ROS1, EGFR	Oui*	Oui	Oui	G1269A, S1206Y, 1151T-ins, F1174C, I1171T, D1203N, E1210K, F1245C	S1206C, F1174I, F1174V+L1198F L1122V + 1196M
Entrectinib	TrkA, TrkB, TrkC, ROS1	Oui	Oui	?	?	?
Lorlatinib	ROS1	Oui	?	Oui	G1269A	?
TSR-011	TRKA, TrkB, TrkC	Oui	?	?	?	?
ASP3026	ROS1, ACK	Oui	?	?	F1174L	F1174V/I
X-396	MET	Oui	Oui	?	?	?
CEP-37440	FAK	?	?	?	?	?

Tableau 7 : Efficacité des inhibiteurs de ALK de seconde génération
(adapté de Ceccon et al., 2015, Wu et al., 2016 et Sullivan et al., 2016)[210,211,225]
** représente des indications contradictoires dans la littérature quant à l'effet de l'inhibiteur sur une mutation.*

- Ils permettent d'améliorer l'activité des thérapies anti-ALK au niveau du système nerveux central (SNC) et pourraient ainsi contribuer à leur efficacité dans la prévention de l'apparition de rechutes. En effet, le crizotinib a un effet limité au niveau du système nerveux central (passage de la barrière hémato-encéphalique réduit)[211]. Le SNC apparaît donc comme un sanctuaire, où les cellules tumorales peuvent disséminer (notamment vrai dans les NSCLC ALK+).

L'intérêt pour le développement d'inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de ALK est croissant, on assiste même à la création de sites internet spécialisés permettant de suivre l'actualité du développement de ces inhibiteurs (http://alkinhibitors.com/). Les différents inhibiteurs de deuxième génération ciblant ALK sont présentés dans le Tableau 7. Dans ce paragraphe nous parlerons de leur efficacité, ainsi que de leur statut actuel dans les essais cliniques.

a. L'alectinib (Alecensa®, CH-542402)

Cette molécule a été développée initialement par Chugai, une sous-division japonaise de Roche, et permet une inhibition très importante de l'activité kinase de ALK (IC50 = 1.9nM)[227]. En plus d'être efficace *in vitro* et *in vivo* sur des lignées de NSCLC et de LAGC ALK+, l'alectinib est également efficace contre les mutations L1196M, C1156Y et F1174L de ALK[228]. Il a obtenu le statut de thérapie de pointe («Breakthrough therapy») en juin 2013. Ce statut particulier a été créé par la FDA en 2012 dans le but d'accélérer le processus d'autorisation de mise sur le marché de traitements dont l'impact sur la santé des patients serait majeur. Il a également obtenu l'autorisation de mise sur le marché au Japon en 2014 pour le traitement des NSCLC ALK+ en rechute, ou réfractaires au traitement[211,229]. L'alectinib aurait également une bonne efficacité contre les métastases cérébrales[220,230].

b. Le ceritinib (Zykadia™, LDK378)

Le Ceritinib est un inhibiteur dérivé du NVP-TAE, un inhibiteur de première génération développé par Novartis. Il a récemment obtenu une autorisation de mise sur le marché par la FDA, pour les patients atteints de NSCLC ALK+ en progression sous traitement par le crizotinib, ou intolérants à cet inhibiteur[231]. Il a une efficacité 20 fois supérieure au crizotinib[232,233], et est efficace contre les mutations L1196M, G1269A, I1171T et S1206Y[232]. Un autre essai clinique a été ouvert au recrutement en juillet 2016 (NCT02729961, https://clinicaltrials.gov) : son objectif est de déterminer l'efficacité d'un traitement de première intention combinant le Ceritinib et le brentuximab (anticorps monoclonal anti-CD30) chez les enfants de moins de 12 ans. L'efficacité de cet inhibiteur sur les métastases cérébrales a également été montrée[234].

c. Le brigatinib (AP26113)

Cet inhibiteur est développé par Ariad Pharmaceuticals, et son efficacité contre des mutations de ALK dont la G1202R a été montrée[235,236]. Ce composé inhibe également l'activité de l'EGFR muté, et est efficace sur les métastases cérébrales[237,238]. Un essai clinique de phase II est actuellement en cours, et a permis de déterminer la dose optimale de Brigatinib à administrer. Ce composé est maintenant testé sur diverses pathologies ALK positives, incluant les LAGC[211] (NCT01449461, https://clinicaltrials.gov).

d. Autres inhibiteurs de ALK

Un grand nombre d'autres inhibiteurs de l'activité kinase de ALK sont actuellement testés[211]. On peut notamment citer :

- L'entrectinib, développé par Ignyta, qui inhibe l'activité des tyrosines kinases de la famille Trk (TrkA, TrkB, TrkC), et ROS1 en plus de ALK. Il a également montré une activité contre les formes mutées L1196M et C1156Y de ALK. Ce composé est actuellement en essais cliniques pour tester son efficacité sur des tumeurs solides, mais également sur des pathologies présentant une translocation de ALK, telles que les LAGC (NCT02568267, https://clinicaltrials.gov).
- Le lorlatinib (ou PF-06463922), développé par Pfizer, qui est dix fois plus efficace que le crizotinib, et qui permet de cibler les mutations L1196M et G1269A de ALK. Il est intéressant de noter qu'une étude a montré que l'apparition d'une mutation de ALK le rendant résistant au Lorlatinib (L1198F), permettait de resensibiliser les cellules au crizotinib[239].
- L'ASP3026, développé par Astellas Pharma, et dont l'activité anti tumorale sur des cellules NPM-ALK positives ainsi que dans des modèles murins de LAGC ALK+ a été démontrée[240].
- Le X-396, développé par Xcovery, qui est, tout comme le crizotinib un inhibiteur de ALK et de c-MET. Il est actif contre la mutation « gatekeeper » de ALK, ainsi que contre la mutation C1156Y.

Cette liste n'est pas exhaustive, et le nombre de composés étudiés démontre l'intérêt que portent les entreprises pharmaceutiques au développement de thérapies ciblées de nouvelle génération ciblant ALK. Ces thérapies sont principalement développées pour être utilisées dans les NSCLC ALK+, où le pronostic vital des patients reste plutôt sombre, mais elles pourront bénéficier à toutes les pathologies impliquant la kinase ALK, et les LAGC NPM-ALK+ en font partie.

3.2 Vaccination « thérapeutique » anti-ALK

L'immunothérapie anti-tumorale est une technique permettant de favoriser le contrôle ou l'élimination de cellules tumorales par le système immunitaire de l'hôte. ALK est une cible idéale pour

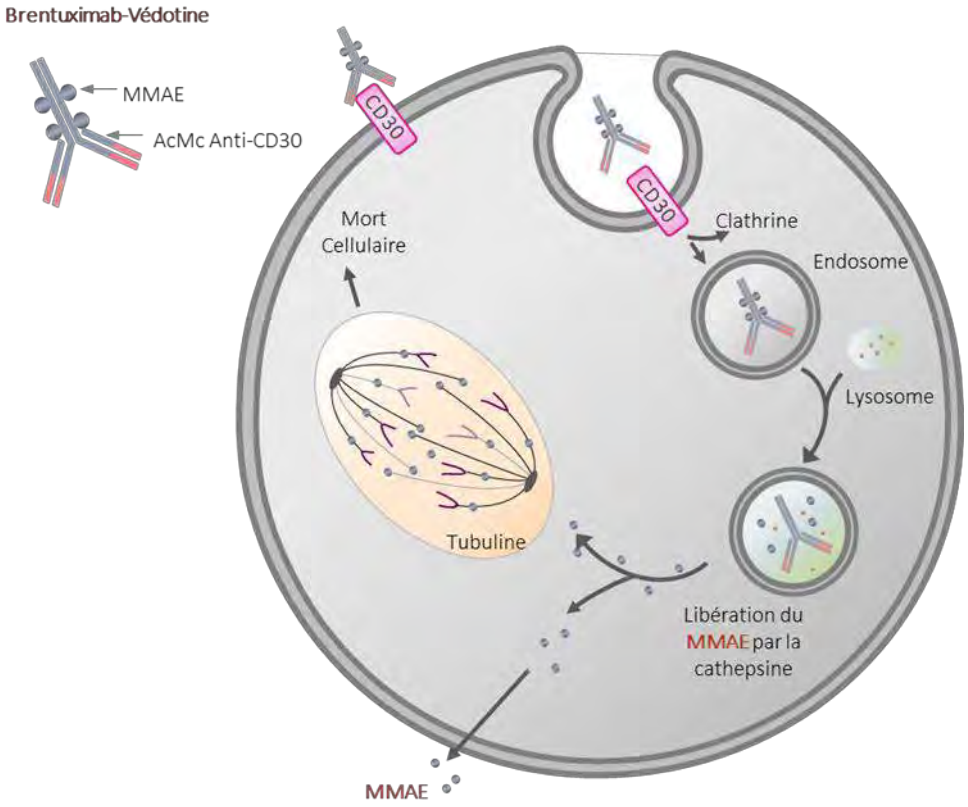


Figure 17 : Mécanisme d'action du Brentuximab-Vedotine
(Adapté de la thèse de Camille Daugrois)[81]
L'anticorps monoclonal (AcMc) humanisé anti-CD30 (Brentuximab) couplé à la La Monomethyl auristatin E (MMAE, ou vedotin) se fixe sur le CD30. Le complexe formé est internalisé par endocytose. La MMAE qui est la molécule active est alors libérée par clivage protéolytique et peut exercer son action inhibitrice de la polymérisation de la tubuline.

ce type de thérapies : (1) ALK est spontanément immunogénique chez les patients atteints de LAGC ALK+. Il provoque spontanément une réponse immunitaire de type T[241,242] ainsi qu'une réponse humorale par production d'anticorps anti-ALK[243], qui persistent dans le sang jusqu'à plus de 10 ans après une réponse complète au traitement[243,244], et qui sont déjà utilisés à des visées pronostiques[245,246]. (2) l'expression « normale » de ALK est restreinte au système nerveux central, ce qui pourrait limiter les réactions auto-immunes pouvant potentiellement avoir lieu suite à l'administration d'un vaccin thérapeutique. (3) les cellules de LAGC ALK+ sont dépendantes de l'oncogène ALK[75].

Deux groupes de recherche se sont intéressés au développement de techniques permettant de déclencher une réponse immunitaire anti-ALK. Le groupe du Dr Gambacorti a démontré que ALK se comportait comme un antigène tumoral, c'est-à-dire qu'il permettait de déclencher une immunité cytotoxique T CD8 anti-ALK spécifique à la fois dans des souris transgéniques et dans les lymphocytes du sang périphérique de donneurs sains (*in vitro*)[247]. Le groupe du Dr Chiarle a mis en place des études précliniques, à la fois dans un modèle murin de LAGC NPM-ALK+ et de NSCLC EML4-ALK+, ou l'efficacité de vaccins « thérapeutiques » anti-ALK à base d'ADN[248] ainsi qu'à base de peptides (Dr Chiarle, communication personnelle) a pu être démontrée. Ces vaccins permettent notamment de limiter le développement tumoral, et ce en stimulant une réponse cytotoxique T CD8.

La vaccination anti-ALK pourrait être potentiellement utilisée en traitement adjuvant de la chimiothérapie, en particulier pour les patients présentant un taux en anticorps anti-ALK faible, afin d'améliorer leur réponse immunitaire, et de prévenir l'apparition de rechutes.

3.3 Autres thérapies

a. Thérapie anti-CD30

Le CD30 est utilisé classiquement comme un marqueur d'activation des lymphocytes B et T. Il représente une cible attractive pour le développement de nouvelles thérapies car il est exprimé par les cellules tumorales de LAGC, mais également par les cellules de Reed-Sternberg de lymphomes Hodgkiniens[19]. De plus, il n'est pas exprimé par les précurseurs lymphocytaires, ni par les lymphocytes matures non activés[2].

Les premiers anticorps utilisés en thérapeutique pour les LAGC ALK+ sont des anticorps monoclonaux anti-CD30 humanisés. Le principe moléculaire de ce traitement repose sur le fait que la liaison de l'anticorps anti-CD30 à son récepteur pourrait entrainer une dégradation de TRAF2, une protéine adaptatrice de CD30 nécessaire à l'activation de la voie NFκB (Figure 17). Cependant, ce type de molécule n'a pas donné l'effet escompté en clinique[249,250].

Le développement d'anticorps humanisés conjugués à des molécules cytotoxiques s'est avéré plus efficace pour cibler les cellules CD30 positives. Ce type d'anticorps permet de délivrer des principes actifs spécifiquement aux cellules tumorales, sans toucher les cellules normales. L'anticorps se fixe sur le CD30, et le complexe ainsi formé est internalisé par endocytose médiée par des vésicules de clathrine. La molécule active est alors libérée par clivage protéolytique et peut exercer son action anti-tumorale (Figure 17). Le produit développé dans ce but est le Brentuximab-Védotine (SGN-35, ADCETRIS®, Figure 17), qui associe le SGN-30 (l'anticorps monoclonal anti CD30) à la monométhylauristatine E (MMAE). La MMAE est un agent cytotoxique qui se lie à la tubuline et empêche sa polymérisation pendant la mitose, ce qui bloque la prolifération des cellules tumorales[251,252].

Plusieurs études cliniques ont montré l'efficacité du SGN-35 dans les LAGC ALK+ réfractaires ou en rechute[253,254], et ces résultats concluants ont conduit à l'approbation du Brentuximab-Védotine par la FDA en août 2011. Par la suite ce composé a obtenu une autorisation de mise sur le marché en Europe et en France pour le traitement des LAGC systémiques récidivants ou réfractaires chez l'adulte.

Cette autorisation a permis le lancement de plusieurs essais cliniques dont les résultats sont très attendus. Des résultats intermédiaires ont déjà démontré l'efficacité du SGN-35 en traitement de première ligne suivie d'une chimiothérapie conventionnelle (CHOP), ou combiné avec une chimiothérapie CHP (retrait de la vincristine, dû à la neurotoxicité des deux produits cumulés)[255], ou en traitement de seconde intention après rechute[256]. Cette thérapie semble très prometteuse, et des résultats supplémentaires sont nécessaires afin de permettre son approbation pour le traitement des LAGC systémiques, ainsi que des lymphomes CD30 positifs en général.

b. Inhibiteurs de DNMT

Comme mentionné précédemment dans la partie 5.2.b du chapitre 1, la méthylation de l'ADN par les DNMTs (via l'axe NPM-ALK/STAT3) joue un rôle important dans la répression de l'expression de certains gènes suppresseur de tumeur *via* la surexpression de la DNMT1[167]. Ainsi l'utilisation d'agents hypométhylants, capables d'induire la réexpression de ces gènes, pourrait être une alternative thérapeutique envisagée pour les patients en rechute ou réfractaires au traitement de première ligne. En 2012, une étude a montré une activité antinéoplasique de la décitabine (5-aza-2'-déoxycitidine, Dacogen®), un analogue de la cytidine qui va s'incorporer dans l'ADN des cellules proliférantes[173]. Ce traitement induit l'apoptose, un blocage du cycle cellulaire ainsi qu'une induction de la sénescence dans des modèles de LAGC ALK+[173]. D'autre part, notre laboratoire a également mis en évidence la réexpression du miR-150 après traitement à la décitabine, et de manière intéressante le traitement de cellules résistantes au crizotinib permet l'inhibition de la croissance cellulaire[98]. Les agents

déméthylants pourraient à terme être inclus dans les options thérapeutiques de traitement des LAGC NPM-ALK+ réfractaires ou en rechute, mais d'autres études plus approfondies traitant en particulier de la résolution des problèmes de spécificité, sont encore nécessaires avant que ce type de traitement puisse être utilisé en routine.

c. Inhibiteurs de Hsp90

La protéine Hsp90 (Heat Shock Protein 90) est une protéine chaperonne jouant un rôle important dans la réponse au stress cellulaire. Cette protéine a pour fonction de permettre le bon repliement tridimensionnel des protéines, en particulier en condition de choc de température[257]. Le rôle de cette protéine dans les cancers a été montré, car elle permet la stabilisation de nombreux oncogènes, et ALK en fait partie[258,259]. Plusieurs études ont montré que l'inhibition de cette protéine chaperonne par la geldanamycine ou par le ganetespib permet de diminuer la viabilité cellulaire dans des LAGC NPM-ALK+[260], et permet également de supprimer la résistance au crizotinib de cellules de NSCLC EML4-ALK+[261]. Quelques essais cliniques incluant des patients atteints de LAGC et proposant l'utilisation du 17-AAG (17-(Allylamino)geldanamycin) sont actuellement en cours de réalisation.

d. Combinaisons thérapeutiques

Le problème de résistance au traitement est un des enjeux majeurs actuels en cancérologie. Malgré la présence de thérapies très efficaces et très ciblées, on constate encore des échecs thérapeutiques dans diverses pathologies. Etudier la cause de la résistance au traitement nous permet de designer de nouvelles molécules plus efficaces et plus ciblées, mais ces molécules permettent également de sélectionner des clones résistants supplémentaires, peut-être même plus agressifs que ceux observés initialement. De plus en plus de cliniciens se tournent vers les options de combinaisons thérapeutiques pour le traitement des patients atteints de LAGC ALK+ : d'après une revue du Dr Feldman, il est probable que dans cinq ans, la première ligne de traitement des LAGC ALK+ combine des chimiothérapies comme le CHOP, et des thérapies ciblées comme le crizotinib, ou le brentuximab-vedotin[262]. Ces associations thérapeutiques permettront d'une part de diminuer les doses des chimiothérapies, entrainant une amélioration de la qualité de vie pour le patient, et une diminution des effets secondaires liés à ces traitements. D'autre part, la combinaison de différentes molécules permettrait de diminuer le nombre de rechutes après première ligne de traitement, en éradiquant le pool de cellules restantes après traitement.

De nombreux essais cliniques proposant diverses combinaisons sont actuellement en cours. Ces combinaisons comprennent des chimiothérapies (CHOP, ALCL-99, Vinblastine…) mais aussi des inhibiteurs de ALK (crizotinib, ceritinib, brigatinib), et des thérapies ciblant le CD30 comme le

brentuximab-vedotin. Ces combinaisons sont testées soit en première ligne de traitement, soit sont administrées en seconde intention, chez des patients réfractaires ou ayant rechuté.

D'autres stratégies telles que le traitement à la décitabine, ou le vaccin anti ALK ne sont pas encore au stade d'essais cliniques, mais semblent prometteurs pour l'amélioration de l'efficacité des traitements actuels. La recherche de nouvelles molécules potentiellement combinables avec des thérapies ciblant ALK, est donc un domaine d'un intérêt particulier.

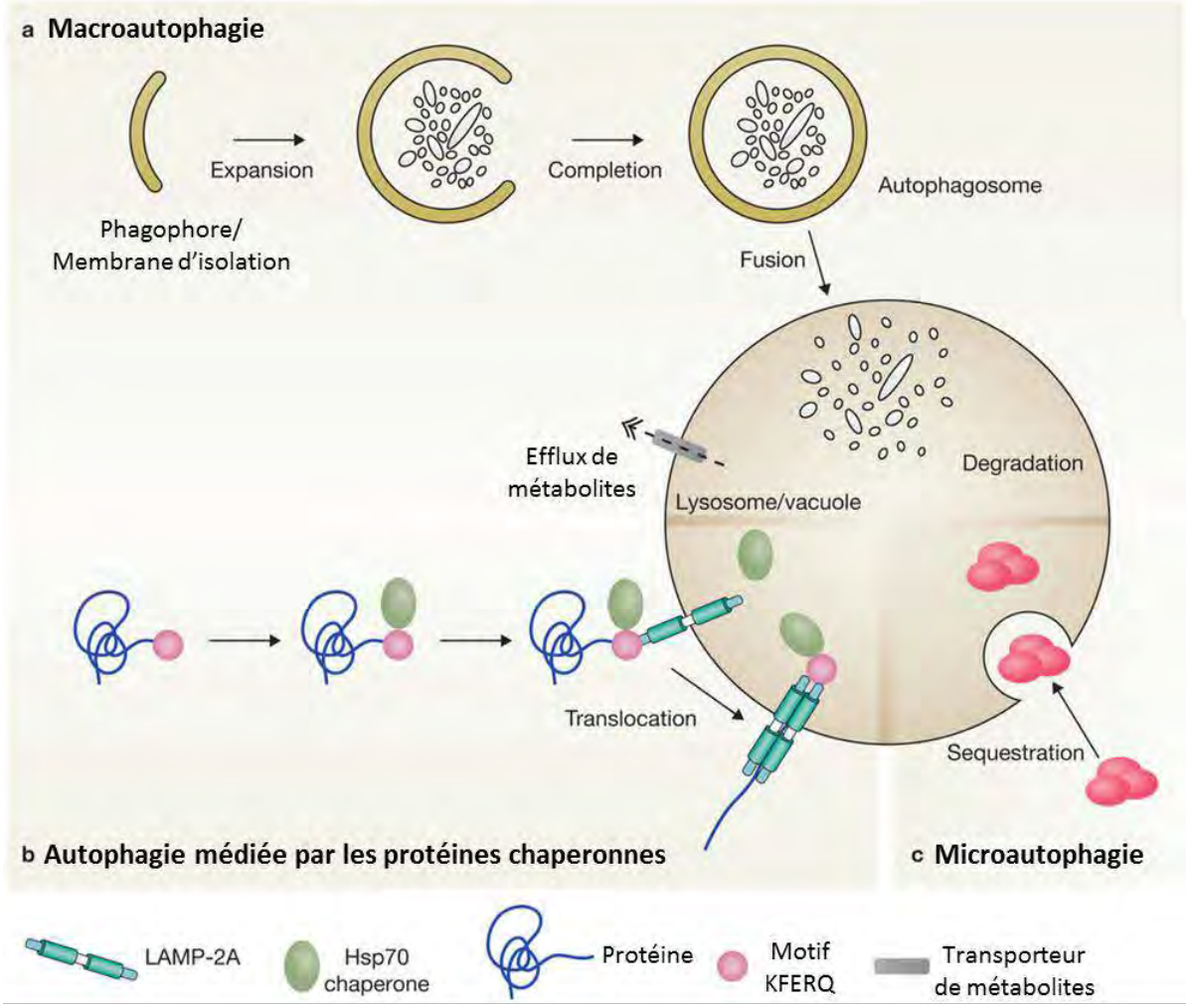


Figure 18 : Les différents types d'autophagie
(d'après Boya et al., 2013)[263]
(A) La macroautophagie est caractérisée par la prise en charge d'un cargo cytoplasmique *via* des vésicules à double membranes appelées autophagosomes. Ceux-ci pourront fusionner avec le lysosome, ce qui entraine la dégradation de leur contenu. **(B) L'autophagie médiée par les protéines chaperonnes (CMA)** permet la reconnaissance de protéines spécifiques portant un motif « KFERQ ». Ces protéines sont prises en charge par la protéine chaperonne Hsp70 et adressées au lysosome. Elles sont alors reconnues par la protéine LAMP2A, dépliées, puis transférées à l'intérieur du lysosome, ce qui assure leur dégradation. **(C) La microautophagie** est une invagination de la membrane de lysosome, permettant la séquestration et la dégradation de portions cytoplasmiques.

CHAPITRE 3 : L'AUTOPHAGIE : MECANISME ET REGULATION

Afin d'assurer son intégrité fonctionnelle, toute cellule doit être capable de maintenir l'équilibre de ses conditions internes grâce à un processus appelé homéostasie. Celle-ci dépend des voies métaboliques permettant la néosynthèse et la dégradation de macromolécules et organites cellulaires. Il existe deux mécanismes principaux permettant la dégradation et l'évacuation des déchets cellulaires : l'un fait intervenir le protéasome, et l'autre fait intervenir les vacuoles lysosomales. Le terme « autophagie », du grec *auto (*soi-même*)* et *phagos* (manger) a été employé pour la première fois en 1966 par le professeur Christian de Duve [264,265], et désigne précisément les mécanismes qui permettent à la cellule de dégrader son propre cytoplasme en faisant intervenir les lysosomes. C'est un processus physiologique qui intervient dans toutes les cellules eucaryotes, et qui permet la prise en charge des macromolécules à durée de vie plutôt longue ainsi que des organites cellulaires endommagés.

Il a été montré que l'autophagie participe à divers processus cellulaires clefs tels que : le développement, le métabolisme énergétique (notamment en cas de carence nutritive), la réponse immunitaire, l'élimination de pathogènes ainsi que la différentiation, la réparation et la survie cellulaires[263,266,267]. De nombreuses études montrent que le processus autophagique est impliqué dans de nombreuses pathologies, comme par exemple les maladies neurodégénératives, infectieuses, cardiaques, métaboliques, pulmonaires, mais également dans le vieillissement et dans le cancer[268,269]. Le rôle de l'autophagie dans le cancer sera présenté dans le chapitre 4.

1 DIFFERENTS TYPES D'AUTOPHAGIE

A ce jour, trois types d'autophagie ont été identifiés : la microautophagie, l'autophagie médiée par des protéines chaperonnes (CMA) et la macroautophagie (Figure 18).

1.1 La microautophagie

Le terme microautophagie fait référence à un processus impliquant l'invagination directe de la membrane lysosomale en un « tube autophagique », qui va se développer, puis se fermer, formant ainsi une vésicule permettant l'inclusion de portions cytosoliques, appelées « cargo », au sein des lysosomes. Le cargo cytosolique est alors dégradé par des hydrolases lysosomales, puis des perméases permettent le relargage des nutriments dans le cytosol, où ils seront recyclés [270]. La preuve de l'existence de la microautophagie dans les cellules de mammifères a été apportée notamment grâce à l'observation de la morphologie des lysosomes par microscopie électronique combinée à la

quantification de protéines à durée de vie longue[271]. Cependant, le mécanisme exact de ce processus reste très peu élucidé: la majorité des indications mécanistiques dont nous disposons actuellement proviennent d'études chez la levure et n'ont pas encore été confirmées chez les mammifères. La difficulté principale réside dans le fait qu'il n'existe aucune technique de détection spécifique de la microautophagie[272].

1.2 L'autophagie associée à des protéines chaperonnes

L'autophagie médiée par des protéines chaperonnes (Chaperone Mediated Autophagy ou CMA) est différente des deux autres formes connues d'autophagie, dans le sens où elle ne fait pas intervenir de trafic vésiculaire. C'est également le seul type d'autophagie décrit jusqu'à présent uniquement chez les mammifères[273,274]. La CMA permet la dégradation sélective de protéines portant un motif pentapeptidique particulier, qui, par interaction avec des protéines chaperonnes, sont amenées au lysosome afin d'être dégradées. Le motif consensus porté par les protéines cibles de ce mécanisme est le motif KFERQ (Lysine-Phénylalanine-Acide glutamique-Arginine-Glutamine). Cependant, des études montrent que ce sont les propriétés physiques des résidus qui importent pour leur reconnaissance par les chaperonnes, et non la séquence exacte, c'est pourquoi on parle également de motifs « KFERQ like »[275]. Ces motifs sont reconnus spécifiquement par la protéine HSC70 (heat shock cognate protein 70), une chaperonne exprimée constitutivement dans les cellules de mammifères. Ce complexe protéique va ensuite se fixer à la partie cytosolique de la protéine LAMP-2A (lysosome-associated membrane protein type 2A), au niveau de la membrane lysosomale [276]. La protéine à dégrader va alors être dépliée puis transloquée dans la lumière du lysosome, pour y être dégradée. La CMA est présente à un niveau basal dans toutes les cellules de mammifères, et il a été démontré que lors d'une carence en nutriments, elle pouvait être fortement activée[277]. Cette observation laisse penser que la CMA joue un rôle prépondérant dans le recyclage des acides aminés en condition de stress nutritionnel. De par sa capacité à éliminer sélectivement certaines protéines, la CMA prend part au « contrôle qualité » protéique, en permettant l'élimination de protéines mal repliées ou endommagées, comme par exemple après un stress oxydatif [278]. Des études plus récentes ont également démontré l'implication de la CMA dans des pathologies auto-immunes, comme le lupus erythémateux[279]. D'autres travaux récents décrivent l'implication de la CMA dans le développement tumoral : il a été notamment été montré que la CMA est augmentée dans différents types de cancers, et qu'elle participe à la survie des cellules malignes en permettant le maintien de leur métabolisme[280–283].

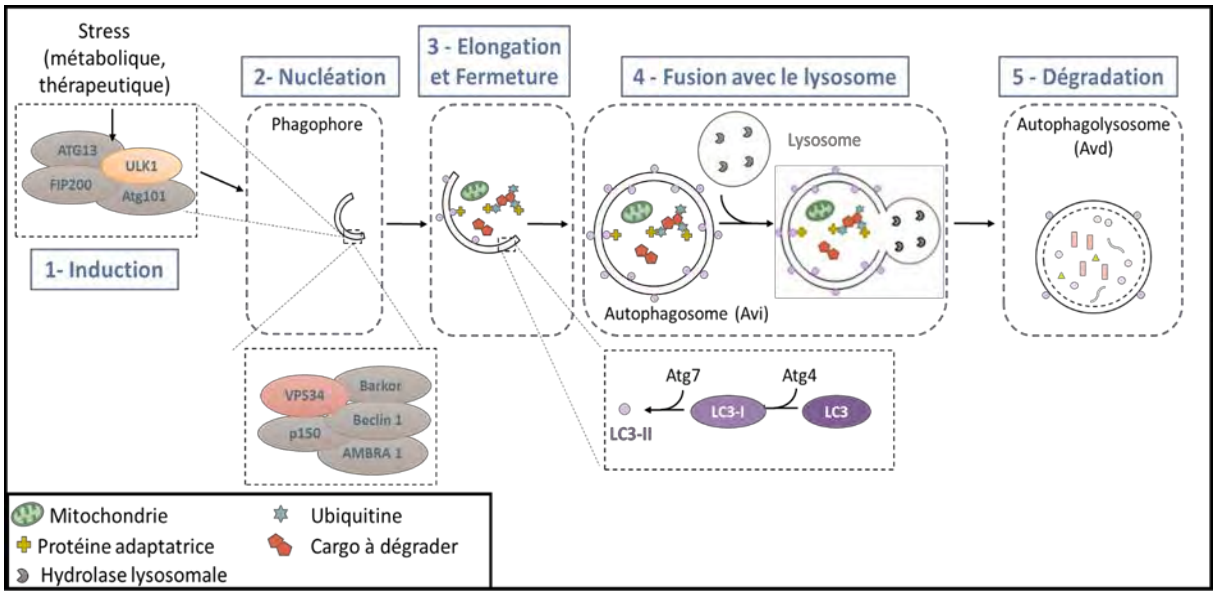


Figure 19 : La macroautophagie

Le processus de macroautophagie se déroule en cinq étapes principales : (1) **l'induction** après un stress métabolique ou thérapeutique est médiée par le complexe comprenant la protéine ULK1 (Unc51 like kinase 1). (2) L'étape de **nucléation,** durant laquelle la formation du phagophore (ou membrane d'isolation) est initiée, est principalement permise par le complexe comprenant la PI3Kinase de classe III, VPS34 (vacuolar protein sorting 34). (3) **L'élongation** du phagophore fait intervenir deux systèmes de conjugaison « ubiquitin like », ayant pour but la conversion de la protéine LC3-I en LC3-II, protéine nécessaire à la formation de l'autophagosome. (4) Une fois formé, l'autophagosome contenant un cargo cytosolique à dégrader va **fusionner avec le lysosome**, ce qui entraine (5) la **dégradation** de son contenu et le relargage des constituants primaires dans le cytoplasme pour recyclage.

1.3 La macro-autophagie

a. Description générale

La macro-autophagie, appelée plus communément « autophagie » est un processus qui permet la dégradation de constituants cytoplasmiques, en surplus, non-fonctionnels ou toxiques, par le lysosome. Dans la suite du manuscrit, nous ne nous intéresserons qu'à ce type d'autophagie. Ce processus est caractérisé par la formation d'une vésicule à double membrane : l'autophagosome, découvert pour la première fois par le professeur Christian de Duve en 1966[264]. Les éléments cellulaires dégradés par autophagie sont principalement les protéines à durée de vie longue, les agrégats protéiques, les organites cellulaires endommagés ou encore certains micro-organismes intracellulaires[266,284].

L'autophagie est un processus relativement rapide, qui se met en place quelques heures après un stimulus, et dynamique, ce qui amène la notion de « flux autophagique »[285]. L'autophagie se déroule en plusieurs étapes (Figure 19), qui seront détaillées dans la partie 2 de ce chapitre. Elle est initiée par la formation d'une double membrane appelée phagophore. Cette double membrane va ensuite s'allonger pour englober des portions de cytoplasme, et une fois fermée formera l'autophagosome. Celui-ci peut alors fusionner avec le lysosome pour former un autolysosome ou autophagolysosome. C'est dans l'autolysosome que l'hydrolyse du contenu cytoplasmique par les enzymes lysosomales a alors lieu. Les constituants cellulaires ainsi dégradés, sont relargués dans le cytoplasme grâce aux perméases lysosomales. Notons également qu'il existe un mécanisme appelé « Autophagic lysosomal reformation », permettant la formation de nouveaux lysosomes à partir d'autolysosomes pré-existants, ce qui permet à la cellule de toujours disposer de lysosomes « libres » pour le contrôle de l'homéostasie cellulaire[286,287].

b. Sélectivité du processus

L'autophagie a longtemps été décrite comme étant un processus non sélectif, car lors de sa formation, l'autophagosome englobe une portion cytoplasmique relativement aléatoire au sein de la cellule (appelée cargo) et l'amène au lysosome pour dégradation. Cependant, il est désormais clair que ce mécanisme joue également un rôle de contrôle qualité du cytoplasme, ce qui requiert une capacité à hydrolyser spécifiquement et sélectivement certains types de substrats. L'autophagie est dite sélective dès lors qu'elle peut dégrader spécifiquement certains cargos, par le biais de protéines adaptatrices, permettant de faire la liaison entre ces cargos cytoplasmiques et l'autophagosome.

L'exemple le plus connu est la protéine p62/SQSTM1 (sequestosome 1), première protéine adaptatrice humaine identifiée comme étant impliquée dans la dégradation d'agrégats protéiques par autophagie (aggréphagie)[288]. P62 peut d'une part se fixer aux protéines poly-ubiquitinylées, *via* sa partie C-

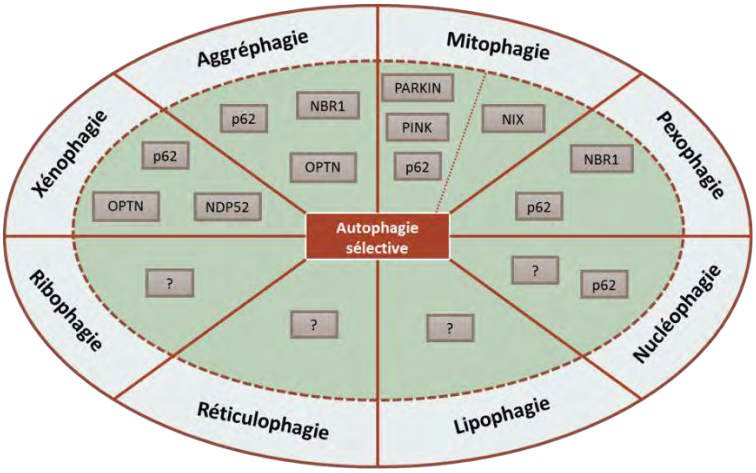


Figure 20 : Les différents types d'autophagie sélective

(d'après Aurore Trocoli, 2013, Okamoto K. et al., 2014, Svenning et al., 2013)[289–291]

L'autophagie est impliquée dans la dégradation d'**agrégats protéiques** (aggréphagie), de **mitochondries** (mitophagie), de **peroxisomes** (pexophagie), de **portions de noyau** (nucléophagie), de **gouttelettes lipidiques** (lipophagie), de **portions de réticulum endoplasmique** (réticulophagie), de **ribosomes** (ribophagie), et de **pathogènes** (xénophagie). Tous ces types d'autophagie sélectives sont médiées par des protéines adaptatrices particulières pouvant se fixer à la fois à la protéine LC3 et au cargo à dégrader. Les principales protéines adaptatrices connues à ce jour chez les mammifères pour les différents types d'autophagie sont ici représentées.

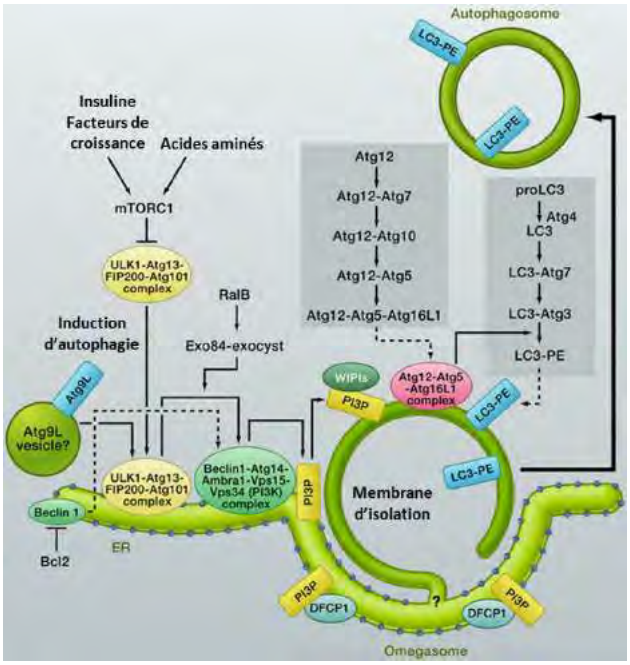


Figure 21 : La formation de l'omégasome et de l'autophagosome

(d'après Roberts et al., 2013)[292]

En absence de nutriments, le complexe d'initiation ULK1 (contenant les protéines ULK1-Atg13-FIP200-Atg101) est relocalisé au niveau du site de formation de l'autophagosome, appelé « **omégasome** ». Le complexe ULK1 permet l'activation du complexe de nucléation comprenant les protéines Beclin1-Atg14-AMBRA1-Vps15-Vps34, qui est nécessaire à la production de **phosphatidylinositol 3-phosphate** (PI3P). Ce PI3P est incorporé dans le phagophore et permet le recrutement d'autres protéines effectrices comme **DFCP1** (double FYVE domain-containing protein 1) ou des protéines de la famille **WIPI** (WD-repeat protein interacting with phosphoinositides). Celles-ci permettent le recrutement des **systèmes d'élongation** « ubiquitin like » et ainsi la formation de l'autophagosome. Il est à noter que des **vésicules lipidiques contenant Atg9L** participent également à la formation de l'autophagosome en faisant office de source lipidique.

terminale contenant un domaine UBA (ubquitin associated domain), et d'autre part, lier la protéine MAP1LC3 (Microtubule associated protein 1 light chain 3, appelée LC3 par la suite), présente à la surface des autophagosomes *via* son domaine LIR (LC3 interacting region) [293,294], permettant ainsi l'adressage du cargo à l'autophagosome. D'autres protéines adaptatrices portant un domaine LIR comme NBR1, NDP52, et OPTN ont depuis été mises en évidence, et permettent également l'élimination des protéines poly-ubiquitinylées par autophagie. On peut notamment citer l'exemple de l'oncogène Bcr-Abl, qui peut être poly-ubiquitinylé sous certaines conditions et adressé à l'autophagosome par une interaction directe avec la protéine adaptatrice p62 [295].

En plus des protéines poly-ubiquitinylées, l'autophagie sélective a été décrite comme impliquée dans la dégradation de nombreux autres cargos tels que les mitochondries (mitophagie), des portions de noyau (nucléophagie), les peroxisomes (pexophagie), les ribosomes (ribophagie), des portions de réticulum endoplasmique (réticulophagie), les lipides (lipophagie), ainsi que certains pathogènes (xénophagie)[290]. Il existe également d'autres types d'autophagie spécifique, identifiés récemment parmi lesquels on trouve la cilliophagie, mécanisme permettant à chaque cellule de réguler la longueur de son cil primaire[296], ou la lysophagie qui permet de dégrader des lysosomes endommagés[297]. Ces différents processus requièrent diverses protéines adaptatrices, permettant l'adressage des cargos spécifiques à l'autophagosome. Les différents types d'autophagie sélective ainsi que les protéines adaptatrices impliquées sont présentées en figure 20.

2 LA MACHINERIE DE L'AUTOPHAGIE

Le processus autophagique étant très conservé au sein des eucaryotes, de nombreuses études mécanistiques ont été effectuées chez la levure *Saccharomyces Cerevisiae*, un modèle couramment utilisé pour effectuer des analyses génétiques. C'est dans cet organisme que plus d'une trentaine de gènes impliqués dans la machinerie autophagique et ayant des orthologues chez les mammifères : les gènes *ATG* (*AuTophaGy related*) ont été découverts[298]. Ces protéines Atg sont recrutées au niveau du site de formation de l'autophagosome, et participent aux différentes étapes du processus. Plusieurs complexes fonctionnels ont été décrits, jouant chacun un rôle bien défini.

2.1 Origine de la membrane autophagosomale

Le processus autophagique démarre par la formation d'une double membrane appelée membrane d'isolation, ou phagophore. L'origine de cette membrane est aujourd'hui encore étudiée et débattue. A l'heure actuelle, il est admis que les phagophores peuvent être formés à partir de membranes préexistantes dans la cellule, au niveau d'une zone particulière appelée omégasome[292]. Les mécanismes permettant sa formation sont décrits en Figure 21. L'omégasome a été initialement

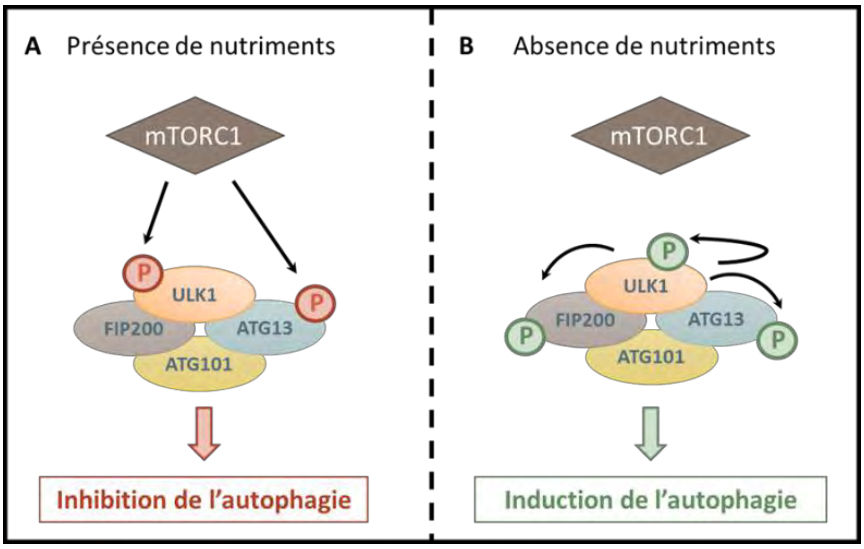


Figure 22 : Le complexe d'initiation ULK1
(A) En **présence de nutriments**, mTORC1, en phosphorylant ULK1 et Atg13, maintient le complexe d'initiation sous forme inactive. **L'autophagie est donc inhibée**. (B) En cas de **carence nutritionnelle**, mTORC1 se dissocie de ULK1, entrainant la déphosphorylation de ULK1 et de Atg13. ULK1 est alors activé, peut s'autophosphoryler, et phosphoryler Atg13 et FIP200 entrainant l'activation du complexe de nucléation et ainsi **l'induction de l'autophagie**.

identifié au niveau du réticulum endoplasmique, comme étant une zone riche en phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P), une molécule nécessaire à la formation et à l'élongation des vésicules autophagiques. Ce PI3P permet le recrutement de nombreuses protéines effectrices telles que DFCP1 (double FYVE domain-containing protein 1) ou les protéines de la famille WIPI (WD-repeat protein nteracting with phosphoinositides) au niveau de l'omégasome. Celles-ci permettent la transduction du signal du PI3P ainsi que des réarrangements membranaires nécessaires à la formation de la vésicule[299–301]. Il a également été démontré que les zones de contact entre le réticulum endoplasmique et les mitochondries étaient impliquées dans la formation de l'omégasome[302]. Il apparait désormais que d'autres sources membranaires fournissent également des lipides au phagophore. C'est notamment le cas des zones où se forment les vésicules sur le réticulum endoplasmique (les « ER-exit sites »)[303], de la zone intermédiaire entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de golgi (ER-golgi intermediate compartment, ERGIC)[304], de l'appareil de Golgi[305], de la membrane plasmique[306] et des endosomes en cours de recyclage[307]. De récentes études de microscopie électronique ont permis de visualiser ces zones de contact, et ont permis d'affirmer que le phagophore pouvait entrer en contact simultané avec plusieurs de ces organites[308,309].

2.2 Initiation : Le complexe Unc-51-Like (ULK1)

Le complexe ULK1 (Unc-51-like autophagy activating kinase 1) est le premier complexe intervenant dans la régulation de l'autophagie (Figure 22). Il est composé de ULK1, une serine/théronine kinase, orthologue de Atg1 chez la levure, ainsi que de Atg13, Atg101 et FIP200 (FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa). Dans certains cas, ULK1 peut être remplacé par ULK2, un homologue fonctionnellement redondant de cette kinase[310]. Au sein de ce complexe, ULK1, FIP200 et Atg101 sont liées directement à la protéine Atg13. Atg101 jouerait un rôle stabilisateur de Atg13, alors que FIP200 aurait un rôle de support permettant de recruter d'autres protéines de la machinerie au niveau de l'autophagosome en formation après activation du complexe[311].

Chez les mammifères, le complexe ULK1 est placé sous le contrôle de la voie mTOR (mammalian target of rapamycin). Cette régulation sera développée plus en détail dans la partie 4.1 de ce chapitre. Brièvement, comme décrit sur la Figure 22, le complexe mTORC1 maintient le complexe ULK1 sous forme phosphorylée dans des conditions nutritionnelles normales. En cas de carence, la phosphorylation de ULK1 est levée, et l'autophagie est induite. ULK1 peut en parallèle être phosphorylé directement par l'AMPK (Adenosine Monophosphate activated Protein Kinase) sur d'autres résidus[312,313]. Ces étapes de phosphorylations/déphosphorylations ont pour conséquence l'activation et la relocalisation du complexe ULK1 au niveau du site d'assemblage de l'autophagosome[312]. Celui-ci permet ainsi le recrutement de protéines nécessaires à la formation de

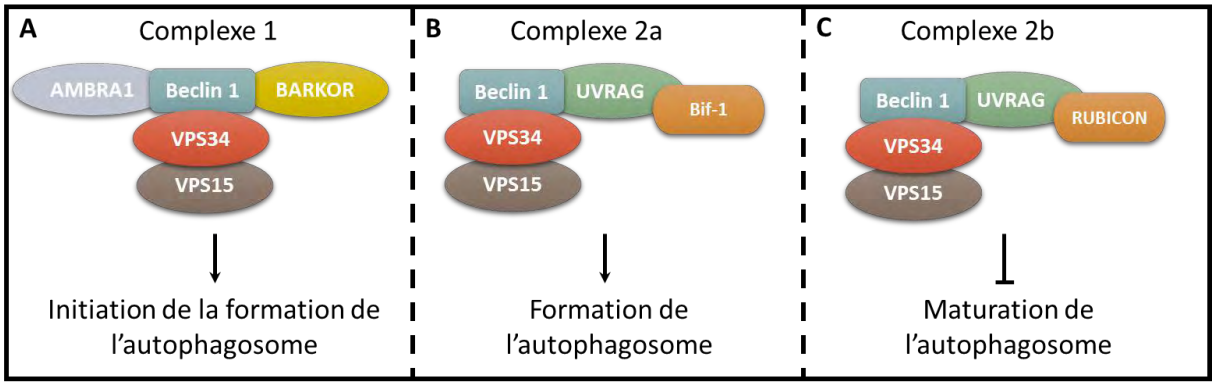


Figure 23 : Les complexes de nucléation (complexes PI3K de classe III)
(d'après Funderburk et al., 2010)[314]
La protéine VPS34, une PI3Kinase de classe III, porte l'activité catalytique de ce complexe. Cette activité peut être régulée par différents partenaires protéiques. (A) Le complexe 1 permet l'initiation de la formation de l'autophagosome, grâce à l'interaction avec les protéines **BARKOR et AMBRA1**. (B) Le complexe 2a induit l'autophagie *via* le recrutement de **UVRAG et de Bif-1**, permet la formation de l'autophagosome et promeut l'activité autophagique. (C) Le complexe 2b *via* l'interaction avec **UVRAG et RUBICON** bloque la maturation de l'autophagosome et joue un rôle d'inhibiteur de l'autophagie.

l'autophagosome telles que MAP1LC3, AMBRA1 (activating molecule in Beclin 1-regulated autophagy) ainsi que le complexe Atg12-Atg5-Atg16L de par l'activité kinase de ULK1[315]. L'activation du complexe ULK1 permet également le recrutement et la phosphorylation de la protéine Beclin-1, ce qui entraine l'activation du complexe PI3K de classe III (complexe permettant la nucléation), et donc la formation de l'autophagosome[316].

2.3 Nucléation : Le complexe PI3K de classe III

Il existe plusieurs complexes qui participent à la régulation de la nucléation du phagophore chez les mammifères (Figure 23). Trois protéines sont communes à ces différents complexes : PI3KC3 (Phosphatidylinositol 3 kinase de classe III, également appelée Vps34), Beclin 1 et PIK3R4 (phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 4, également appelée Vps15). L'activité kinase de Vps34 permet la production de PI3P, requis pour la formation de l'autophagosome[317] et les protéines Beclin 1 et Vps15 servent de régulateurs de cette activité. Ces trois protéines peuvent être retrouvées associées à différents partenaires, et chaque association joue un rôle différent dans la régulation de l'étape de nucléation de l'autophagie.

La protéine Atg14L (Atg14 like, aussi appelée BARKOR pour Beclin 1 associated autophagy related key regulator) peut se lier à Beclin 1 et ainsi former le premier complexe PI3K de classe III (Figure 23, **Complexe 1**), dont le rôle est de réguler positivement l'initiation de la formation de l'autophagosome[318]. BARKOR permet l'activation de la kinase Vps34, et ainsi la production de PI3P au niveau de l'omégasome[319].

La protéine UVRAG (UV radiation resistance associated), peut elle aussi se lier à Beclin 1. Elle entre en compétition avec BARKOR, puisque leur liaison sur Beclin 1 est mutuellement exclusive[320]. UVRAG peut elle-même se lier à deux protéines différentes, ce qui donne lieu à la formation de deux sous-complexes distincts :

- Son association à la protéine Bif-1 (Bax-interacting factor 1) (Figure 23, **complexe 2a**), permet quant à elle, l'activation de la formation de l'autophagosome[321].
- Son association avec la protéine Rubicon (RUN domain and cystein-rich domain containing Beclin 1-interacting protein) pour former un complexe (Figure 23, **complexe 2b**), va entrainer la régulation négative de l'autophagie, en inhibant la maturation de l'autophagosome[319].

L'interactome de Beclin 1 est très étudié, et de nombreuses autres protéines peuvent s'y lier de façon transitoire[322]. On peut citer la protéine AMBRA1 (activating molecule in Beclin 1-regulated autophagy), un régulateur positif du complexe permettant sa relocalisation au niveau de l'omégasome de par son interaction avec ULK1[322], ou la protéine anti-apoptotique Bcl-2, un régulateur négatif du processus qui

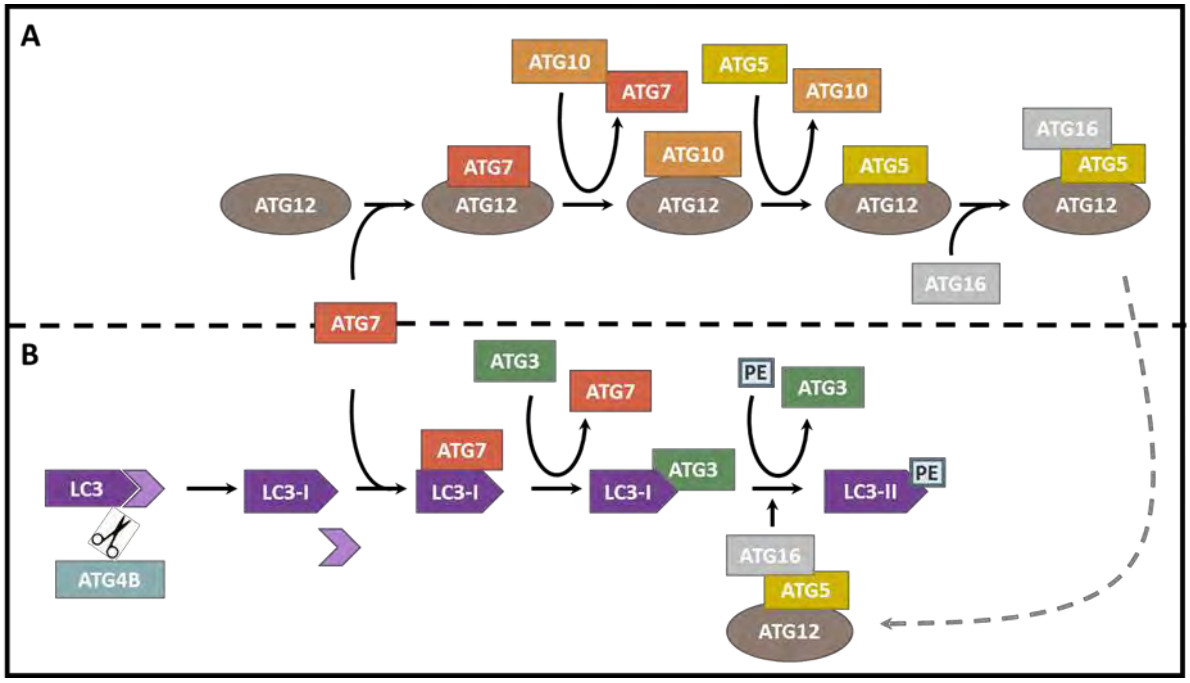


Figure 24 : Les systèmes de conjugaison Atg5-Atg12-Atg16 et LC3-PE
(A) **Le système de conjugaison Atg5-Atg12-Atg16**. L'enzyme de type E1 (Atg7) et l'enzyme de type E2 (Atg10) permettent la fixation covalente de la protéine Atg5 sur Atg12. La protéine Atg16 est alors incorporée sur le complexe Atg12-Atg5. (B) **Le système de conjugaison LC3-PE**. La protéine LC3 est clivée en LC3-I par Atg4B. L'enzyme de type E1(Atg7), et l'enzyme de type E2 (Atg3) permettent la fixation d'un groupement phosphatidyléthanolamine (PE) sur LC3-I, en partenariat avec le complexe Atg12-Atg5-Atg16, pour former LC3-II, qui est nécessaire à l'élongation de l'autophagosome.

se lie à Beclin 1 via son domaine BH3[323]. Tous ces partenaires additionnels permettent une modulation de l'activité autophagique plus fine : l'exemple Beclin 1- Bcl-2 sera détaillé dans le chapitre 4, partie 3.2.

2.4 Elongation : Les systèmes de conjugaison « ubiquitin like »

Une fois l'autophagie initiée, le phagophore s'allonge pour aboutir à la formation de l'autophagosome. Pour cela, deux systèmes de conjugaison « ubiquitin like » sont nécessaires (Figure 24).

a. Le système de conjugaison Atg12/Atg5/Atg16L

La fixation covalente de la protéine Atg12 à la protéine Atg5 nécessite deux enzymes : Atg7, une enzyme de type E1 (enzyme activatrice de l'ubiquitine), et Atg10, une enzyme de type E2 (enzyme de conjugaison de l'ubiquitine), par analogie à celles présentes dans la dégradation de protéines impliquant l'ubiquitine. Une fois formé, le complexe Atg12/Atg5 s'associe à la protéine Atg16L (Atg16 like)[324]. Le complexe Atg12-Atg5-Atg16L est alors adressé à la membrane de l'autophagosome, où il permet le recrutement de la protéine MAP1LC3 (microtubule associated protein 1 light chain 3, aussi appelée Atg8 ou LC3), ce qui facilite sa lipidation[325], comme détaillé ci-dessous.

b. Le système de conjugaison LC3-Phosphatidyléthanolamine

La modification de la protéine LC3 est nécessaire à la formation de l'autophagosome. Cette modification se traduit par la conjugaison d'un phospholipide, la phosphatidyléthanolamine (PE) à la protéine LC3. Après synthèse, la protéine pro-LC3, précurseur de LC3, est clivée au niveau C-terminal par Atg4B, pour donner la forme cytosolique LC3-I[326]. L'association de la PE à LC3-I est ensuite catalysée par l'action de Atg7 (enzyme de type E1) et Atg3 (enzyme de type E2) pour donner la forme LC3-II[327]. Contrairement au complexe Atg12-Atg5-Atg16, LC3-II reste associée à la membrane de l'autophagosome même après la fermeture de celui-ci : c'est pourquoi elle est utilisée comme marqueur caractéristique des autophagosomes[328,329].

2.5 Maturation, Fusion et dégradation

Une fois formés, les autophagosomes doivent être acheminés jusqu'aux lysosomes avec lesquels ils vont fusionner. Pour cela, ils se déplacent le long des microtubules, pour arriver jusqu'au centre organisateur des microtubules (MTOC, MicroTubule Organization Center), une zone riche en lysosomes. Ce déplacement se fait grâce à une protéine motrice, la dynéine[330].

Les autophagosomes peuvent alors soit fusionner avec des endosomes, pour former des amphisomes, soit fusionner directement avec le lysosome pour former des autophagolysosomes (ou

autolysosomes). Ces fusions font intervenir de nombreuses protéines comprenant en particulier les protéines de la famille SNARE (Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachement protein REceptor), Rab, ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required forTransport), et LAMP (Lysosome-associated membrane protein)[331–334]. Les hydrolases lysosomales permettent ensuite la dégradation du matériel séquestré ainsi que de la membrane interne des autophagolysosomes, ce qui permet le relargage d'acides aminés dans le cytoplasme. La protéine LC3-II située sur la membrane interne de l'autophagosome sera elle aussi dégradée, alors que la fraction se situant sur la membrane externe sera recyclée en LC3-I *via* un clivage de la PE par Atg4[329,335]. LC3-I pourra ainsi à nouveau servir à la formation d'un nouvel autophagosome. Durant ce processus, le pool de lysosomes fonctionnels doit constamment se renouveler, afin qu'une réserve de lysosomes « libres » soit toujours disponible. Ce renouvellement est médié par un processus appelé « autophagic lysosomal reformation ». Ce mécanisme implique la formation de structures tubulaires portant la protéine LAMP1, émanant des lysosomes et au bout desquelles on peut observer un bourgeonnement et la formation de nouvelles vésicules. Ces vésicules passent ensuite par des étapes de maturation et permettent la formation de nouveaux lysosomes fonctionnels. Ce processus est placé sous le contrôle de la voie mTOR.[287,336].

2.6 Autophagie non canonique

Le processus canonique de formation de l'autophagosome et d'induction de l'autophagie fait intervenir les trois complexes majeurs présentés ci-dessus : le complexe ULK1, le complexe Beclin-Vps34-BARKOR ainsi que les systèmes de conjugaison Atg12-Atg5 et LC3-PE. Il est maintenant connu que des processus non-canoniques, indépendants de certains de ces complexes pouvaient être mis en place sous certaines circonstances, et entrainer la dégradation de substrats par autophagie[337]. L'existence de processus autophagiques indépendants du complexe ULK1, ou de la protéine Beclin 1 ont notamment été reportés[311,338]. Ce type d'autophagie non canonique reste cependant peu décrit.

3 TECHNIQUES DE MESURE DE L'AUTOPHAGIE

De nombreux outils de mesure de l'autophagie ont été développés, mais une certaine prudence est de mise dans le choix des techniques à utiliser, à cause de la complexité du processus et des divers mécanismes mis en jeu. Il est notamment conseillé d'adapter les méthodes en fonction des études à effectuer et du modèle utilisé. La combinaison de plusieurs techniques de mesures (morphologiques, génétiques, chimiques) est indispensable pour arriver à une conclusion finale quant au rôle ou à la régulation de l'autophagie dans un système. Actuellement, on peut faire la différence entre les techniques permettant la visualisation de marqueurs autophagiques à un temps t, et celles permettant

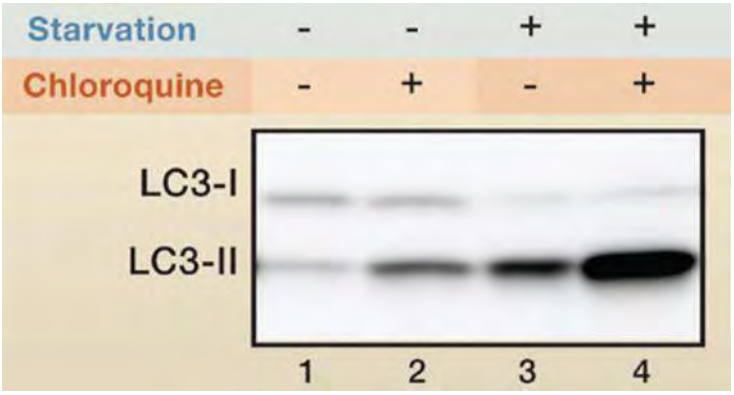


Figure 25 : La mesure du flux autophagique par western blotting contre la protéine LC3 (LC3 turnover assay) *(adapté de Mizushima et al., 2010)*[285]
La conversion de la protéine LC3-I en LC3-II en présence d'inhibiteurs d'autophagie (traitement à la chloroquine) est utilisée pour mesurer le flux autophagique. La différence du niveau de LC3-II en présence (puits 2 et 4) ou en absence (puits 1 et 3) de chloroquine est plus importante en condition de carence (puits 3 et 4) qu'en conditions normales (puits 1 et 2) ce qui indique que le flux autophagique est activé en condition de carence.

la mesure et la quantification du flux autophagique. Toutes les techniques citées ci-dessous sont tirées des « guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy »[329].

3.1 La microscopie électronique

La microscopie électronique est la première technique ayant été employée pour la visualisation de l'autophagie[339]. Elle permet de voir, et de quantifier les autophagosomes (vésicules autophagiques précoces appelées ici Avi) ainsi que les autolysosomes (vésicules autophagiques de dégradation, appelées ici Avd). Son utilisation demande un peu d'expérience car les vésicules à double membrane sont difficiles à localiser et à distinguer des autres organites cellulaires. Cette technique peut être couplée à une détection de la protéine MAP1LC3 par un marquage immunogold (reconnaissance d'un anticorps primaire spécifique à MAP1LC3 par un anticorps secondaire couplé à de l'or colloïdal, facilement détectable en microscopie électronique) pour identifier les vésicules avec plus de fiabilité[340]. Pour mesurer le flux autophagique, certaines équipes utilisent le calcul de ratios entre Avi et Avd[341].

3.2 La mesure du taux de dégradation des protéines à durée de vie longue

L'autophagie est un processus responsable de la dégradation de protéines à durée de vie longue, c'est pourquoi la mesure de leur taux de dégradation est une des techniques classiques de mesure du flux autophagique[342]. Elle est basée sur l'incorporation d'acides aminés radioactifs (leucine C-14 ou H-3, valine C-14 ou méthionine S-35) dans les protéines en cours de synthèse. Ce marquage doit être effectué pendant une durée suffisante pour que les protéines à durée de vie longues soient marquées. L'excédent de radioactivité est ensuite éliminé par plusieurs lavages successifs et la décroissance du signal radioactif est alors mesurée[329]. Il faut cependant noter qu'une proportion non négligeable de la dégradation protéique observée par cette technique ne sera pas spécifique de l'autophagie. Il est donc nécessaire de valider ces mesures dans des conditions utilisant un inhibiteur de l'autophagie (3MA, Chloroquine, siRNA ciblant les protéines Atg), afin de soustraire les valeurs obtenues dans ces conditions à la totalité du niveau de dégradation observé[329]. Bien que très informative, l'utilisation de cette technique diminue dans les laboratoires en raison des contraintes liées à la radioactivité.

3.3 Le Western Blotting

La deuxième technique la plus utilisée est la visualisation de marqueurs de l'autophagie par western blotting, comme par exemple l'accumulation de la protéine LC3-II, mais aussi de protéines clefs de la machinerie autophagique comme Beclin 1. Ces marqueurs ne nous donnent cependant pas

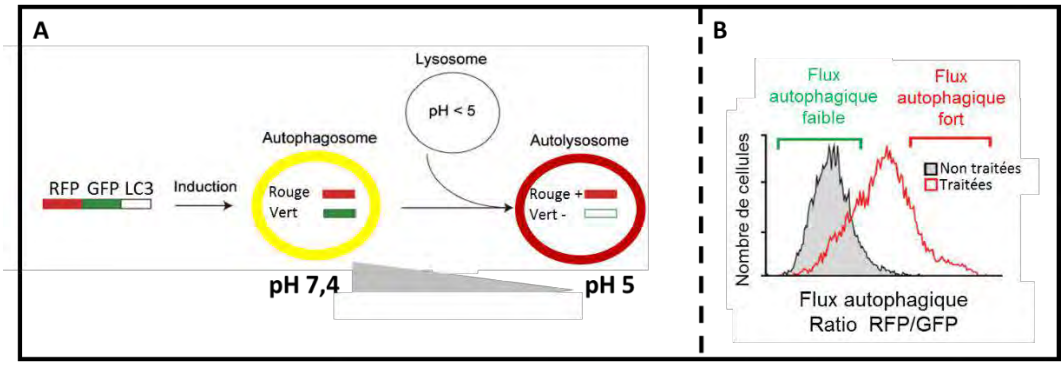


Figure 26 : Sonde tandem RFP-GFP-LC3 utilisée en cytométrie en flux
(adapté de Gump et al., 2014)[343]
Utilisation d'un vecteur permettant l'expression de la protéine de fusion RFP-GFP-LC3 pour la mesure du flux autophagique. (A) En conditions normales (présence de nutriments), la protéine de fusion LC3 est cytoplasmique, et émet de la fluorescence rouge (RFP) et de la fluorescence verte (GFP). En cas de stress induisant l'autophagie (carence nutritionnelle), LC3 est lipidée et incorporée dans la membrane de l'autophagosome. Celui-ci va alors fusionner avec un lysosome, ce qui entraine l'acidification de son contenu. Cette acidification est à l'origine de la disparition de la fluorescence verte émise par la protéine de fusion. (B) Le ratio RFP/GFP est mesuré par cytométrie en flux pour chaque cellule. Les résultats sont présentés sous formes de pics de fluorescence : l'induction du flux autophagique entraine une diminution de la fluorescence verte, donc une augmentation du ratio de fluorescence RFP/GFP ce qui est visible par un décalage du pic de fluorescence vers la droite.

d'information concernant le flux autophagique, qui est un processus dynamique. Pour mesurer le flux autophagique, la technique la plus répandue est la mesure de la conversion de LC3-I en LC3-II par western blotting en présence et en absence d'inhibiteurs de la fusion de l'autophagosome avec le lysosome, appelée le « LC3 turnover assay »[285], présenté en Figure 25. Les différents inhibiteurs de l'autophagie seront présentés dans le chapitre 4, partie 4.1. Il est également possible de mesurer la dégradation de substrats de l'autophagie, comme par exemple p62, ou NBR1, ce qui permet également l'évaluation du flux autophagique[344]. Une autre technique, moins utilisée, est basée sur la visualisation de la protéine de fusion GFP-LC3 par western blotting. Lors de l'induction du flux autophagique, la protéine LC3 va être dégradée plus vite que la GFP, on pourra donc voir apparaitre un signal à la taille de la GFP (27kDa) par western blotting lors de l'induction du flux autophagique[345].

3.4 Les sondes fluorescentes

La troisième famille de techniques utilisée pour mesurer l'autophagie fait intervenir des sondes fluorescentes. Elle implique l'apport exogène de sondes GFP-LC3, ou RFP-GFP-LC3 (par transfection ou expression lentivirale), et est basée sur le principe de l'extinction de la fluorescence verte de la GFP à pH acide, qui se produit lors de la fusion entre l'autophagosome et le lysosome (témoin de l'induction du flux autophagique). Ces sondes peuvent être utilisées pour des analyses de cytométrie en flux, car elles permettent le calcul d'un ratio de fluorescence RFP/GFP[343]. Le principe de l'utilisation de ces sondes par cytométrie en flux est présenté en Figure 26.

L'utilisation de ces sondes est également fréquente en microscopie de fluorescence. Les sondes GFP-LC3 sont utilisées pour visualiser la relocalisation de la protéine LC3 à la membrane de l'autophagosome lors de l'induction d'autophagie : ceci se traduit la formation de « punctas », que l'on peut quantifier[285]. Les sondes RFP-GFP-LC3 sont également utilisées pour visualiser l'induction du flux autophagique : le marquage passe du jaune (RFP + GFP), au rouge (perte de la GFP), dans des conditions d'induction du flux autophagique.

1.1 Les colorants acides

L'utilisation de colorants permettant la visualisation des compartiments acides de la cellule, tels que la monodansylcadavérine[346], l'acridine orange[347] ou le LysoTracker red[348] est aussi proposée dans les techniques d'analyse de l'autophagie. Ces colorants sont utiles pour avoir une information sur la quantité de vésicules acides au sein de la cellule, mais ne permettent pas de faire la différence entre les autophagosomes, les autophagolysosomes, et les lysosomes. Cette méthode doit être utilisée en complément d'autres techniques pour pouvoir donner des résultats interprétables.

Facteur de transcription	Gène de l'autophagie régulé	Effet sur l'autophagie
ATF4	ATG5, protéines à « BH3-seulement », LC3 et ULK1	Augmentation
ATF5	mTOR	Suppression
β-caténine	P62	Suppression
C/EBPβ	BNIP, LC3 et ULK1	Augmentation
CHOP	ATG5 and LC3	Augmentation
E2F1	ATG5, BNIP3, LC3 et ULK1	Augmentation
FOXO1	ATG5, ATG12, ATG14, BECN1, BNIP3, LC3 and VPS34	Augmentation
FOXO3	ATG4, ATG12, BECN1, BNIP3, LC3, ULK1, ULK2 et VPS34	Augmentation ou Suppression
GATA1	LC3	Augmentation
HIF1	BNIP3	Augmentation
JUN	BECN1 et LC3	Augmentation
NF-κB	BCL2, BECN1, BNIP3 et p62	Augmentation ou Suppression
P53	ATG2, ATG4, ATG7, ATG10, BCL2, BH3-only, ULK1 et UVRAG	Dans le cytoplasme : augmentation Dans le noyau : suppression
P63	ATG3, ATG4, ATG5, ATG7, ATG9, ATG10, BECN1, LC3 et ULK1	Augmentation
P73	ATG5, ATG7 et UVRAG	Augmentation
SOX2	ATG10	Augmentation
SREBP2	LC3, ATG4B et ATG4D	Augmentation
STAT1	ATG12 et BECN1	Suppression
STAT3	ATG3, BCL2 et BNIP3	Suppression
TFEB	ATG4, ATG9, BCL2, LC3, p62, UVRAG et WIPI	Augmentation
ZKSCAN3	LC3, ULK1 et WIPI	Suppression

Tableau 8 : Tableau représentant les facteurs de transcription principaux régulant les gènes de l'autophagie *(adapté de Füllgrabe et al., 2014)*[349]

L'autophagie est un processus finement régulé, notamment au niveau transcriptionnel. Les principaux facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'autophagie ainsi que leurs cibles et leurs effets sur le flux autophagique sont présentés dans ce tableau.

1.2 Analyse du flux autophagique in vivo

L'autophagie étant de plus en plus décrite comme impliquée dans différentes pathologies, la mesure du flux autophagique chez les patients est envisagée en tant que biomarqueur permettant par exemple de prédire la gravité d'accidents vasculaires cérébraux[350], ou de prévoir l'efficacité du traitement par l'imatinib de cellules de leucémies myéloïdes chroniques[351]. La technique la plus pratique permettant cette mesure sur tissus de patients est l'immunohistochimie (IHC). Le marquage LC3 est déjà utilisé en IHC, notamment dans différents cancers, mais l'interprétation de la visualisation des punctas de LC3 seuls reste assez délicate[352]. Il est actuellement question de combiner le marquage LC3 avec d'autres marquages comme par exemple Beclin 1 ou p62 pour renforcer le diagnostic, comme cela a été fait dans les NSCLC[353]. La combinaison de ces marquages permettrait d'avoir un aperçu de l'état d'activation ou non de l'autophagie dans des cohortes de patients.

Récemment, grâce à une étude du sécrétome tumoral dans le sérum de patients atteints de mélanomes, il a été démontré que les cellules tumorales ne sécrètent pas la même quantité de certaines cytokines ou chimiokines en fonction de leur statut autophagique. Ces protéines pourraient donc représenter de bons biomarqueurs pour la mesure du flux autophagique chez les patients[354].

4 REGULATION DE L'AUTOPHAGIE

L'autophagie est un processus essentiel dans la réponse cellulaire au stress. Elle peut être induite par divers stimuli, tels que la carence en nutriments ou en facteur de croissance, l'hypoxie, le stress oxydatif, l'accumulation d'agrégats protéiques, ou encore par des agents cytotoxiques[355–357]. C'est un processus complexe, multi-étapes, faisant intervenir de nombreux partenaires moléculaires, et dont le contrôle est assuré à différents niveaux.

- L'autophagie peut être régulée au niveau transcriptionnel, par le biais de facteurs de transcription tels que NFκB, FOXO3, STAT3 ou encore TFEB[349], qui régulent l'expression de gènes de la machinerie autophagique. Les principaux facteurs de transcription régulant l'autophagie sont présentés dans le Tableau 8.
- L'autophagie peut également être régulée au niveau post-transcriptionnel, *via* des mécanismes contrôlant la dégradation et de la stabilité des ARN messagers produits, ou la régulation de la traduction de ces messagers. Les principaux acteurs de ces mécanismes sont les microARNs[358] et les protéines de liaison à l'ARN[359,360].

Enfin, on peut également mentionner la régulation post-traductionnelle, qui regroupe toutes les modifications chimiques pouvant affecter une protéine, comme par exemple la phosphorylation ou l'ubiquitinylation.

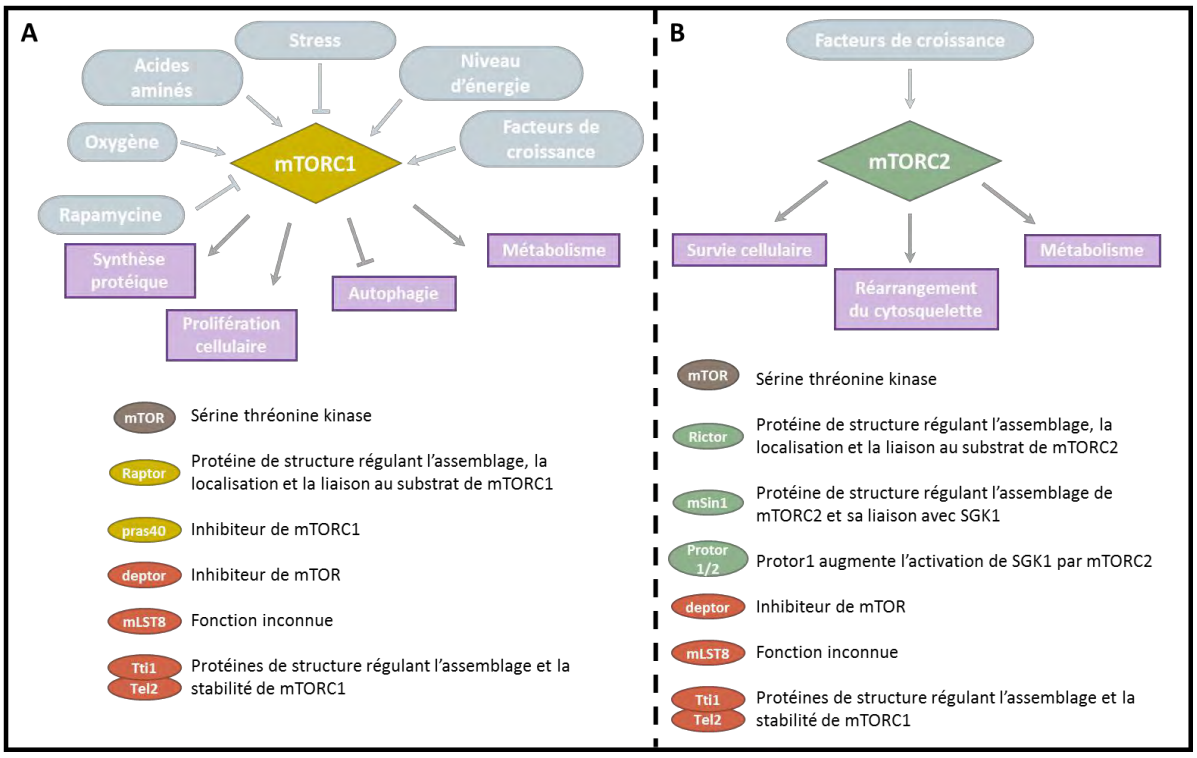


Figure 27 : Les deux complexes mTORC1 et mTORC2 intervenant dans la voie de signalisation mTOR *(adapté de Laplante et al., 2012)*[361]

La kinase mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) peut faire partie de deux complexes de signalisation : mTORC1 et mTORC2, qui impliquent différents partenaires protéiques. (A) mTORC1 est contrôlé par différents stress incluant le taux d'oxygène, la concentration en acides aminés, le niveau d'énergie ou les facteurs de croissance. C'est également le seul complexe sensible à la rapamycine. Il permet notamment de réguler la synthèse protéique, la prolifération cellulaire, le métabolisme et l'autophagie. (B) mTORC2 répond principalement à la signalisation médiée par les facteurs de croissance et permet la modulation du métabolisme, mais aussi de la survie cellulaire ainsi que le réarrangement du cytosquelette.

-

Il est important de préciser ici que l'autophagie peut être régulée par l'intégration de différents signaux au niveau du complexe mTOR. Cette protéine agit en effet comme véritable censeur de l'homéostasie cellulaire. Les régulations transcriptionnelles, post-transcriptionnelles et post-traductionnelles de l'autophagie, citées ci-dessus, peuvent donc s'opérer en aval de la voie mTOR. C'est pourquoi nous nous intéresserons particulièrement à cette voie de signalisation dans la suite de ce manuscript. Nous décrirons également plus en détail la régulation post-transcriptionnelle de l'autophagie par les microARNs, qui a fait l'objet de la deuxième partie de mes travaux de thèse.

4.1 La voie mTOR (mammalian Target Of Rapamycin)

La voie mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) joue un rôle central dans l'intégration de signaux cellulaires : c'est un régulateur majeur du métabolisme mais aussi de la croissance, de la prolifération et de la survie des cellules. C'est également la voie majoritaire de régulation de l'autophagie : son activation conduit à l'inhibition de l'autophagie[362,363]. mTOR est un « nœud moléculaire » clef, intégrant de nombreux signaux et permettant une réponse cellulaire appropriée. Dans ce paragraphe nous allons dans un premier temps développer les différentes voies conduisant à l'activation de mTOR, puis nous verrons tous les mécanismes cellulaires induits en aval et contribuant à la régulation de l'autophagie.

a. Les complexes mTORC1 et mTORC2

La protéine centrale de cette voie est mTOR, une sérine thréonine kinase appartenant à la famille des PI3K (Phosphoinositide 3 Kinase). Chez les mammifères, elle intervient dans deux complexes cellulaires distincts : mTORC1 et mTORC2[361]. Ces deux complexes diffèrent de par leur sensibilité à la rapamycine, qui n'a d'effet que sur mTORC1[364], ainsi que de par leurs activateurs et leurs cibles. Ces complexes sont présentés en Figure 27. Le complexe mTORC1 est composé de six protéines, alors que mTORC2 est composé de sept protéines. Les deux complexes ont en commun mTOR, qui porte l'activité catalytique de ces complexes, mLST8 (mammalian lethal with sec-13 protein 8) dont la fonction est encore inconnue, Deptor (DEP domain containing mTOR interacting protein) un régulateur négatif de mTOR, ainsi que le complexe Tti1/Tel2 servant de support et de stabilisateur à la formation des deux complexes. Les protéines Raptor (regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin), et pRAS40 (proline-rich Akt substrate 40kDa) font partie de mTORC1, alors que rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR), mSin1 (mammalian stress-activated map-kinase interacting protein 1), et protor1/2 (protein observed with rictor 1 and 2) ne font partie que de mTORC2[361,365]. Pour la suite, nous nous focaliserons uniquement sur le complexe mTORC1, car c'est par celui-ci que s'effectue la régulation de l'autophagie.

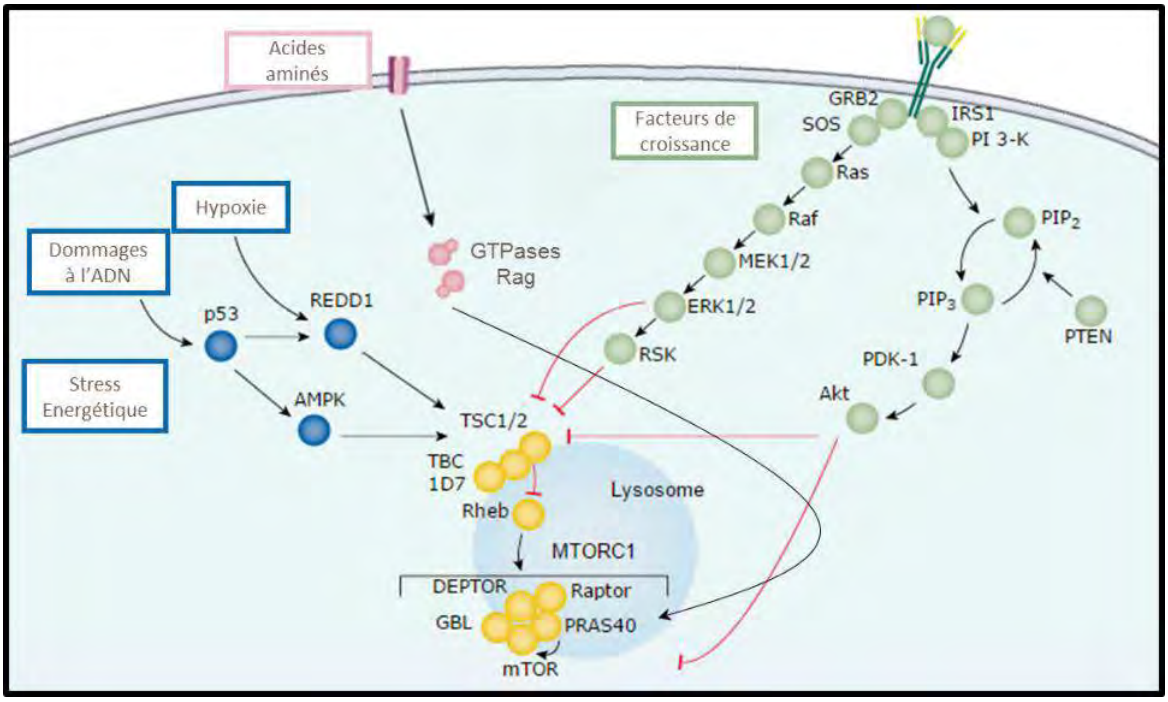


Figure 28 : Signaux principaux modulant la voie mTORC1

(adapté de RnDSystems.com)

La voie mTORC1 permet l'intégration de signaux provenant de plusieurs voies de signalisation différentes. (1) Les facteurs de croissance permettent l'activation des voies PI3Kinase-Akt et Ras-Raf-MEK-ERK, entrainant l'activation de mTORC1 *via* l'inhibition du complexe TSC1/2, et le maintien de Rheb sous forme GTP-Rheb. (2) Les dommages à l'ADN, l'hypoxie et le stress énergétique entrainent l'activation de l'AMPK qui permettra l'activation de TSC1/2 et ainsi l'activation de mTORC1. Une carence en oxygène peut également activer mTORC1 *via* la protéine REDD1. (3) La présence d'acides aminés entraine la translocation de mTORC1 au lysosome *via* les GTPases Rag. Cette relocalisation de mTORC1 au niveau du complexe Ragulator permet son activation. En cas de carences en acides aminés, la translocation de mTORC1 au niveau du lysosome ne se fait plus, et mTORC1 est alors inactivé.

b. Signalisation cellulaire en amont de mTORC1

Le complexe mTORC1 permet l'intégration de signaux cellulaires provenant de quatre voies différentes : les voies énergétiques, la teneur en facteurs de croissance, en acides aminés, et en oxygène[366–369]. En réponse à ces signaux, mTORC1 permet la régulation de processus cellulaires anaboliques (synthèse protéique, lipidique) et cataboliques (autophagie) en fonction des besoins cellulaires. Les signaux permettant la modulation de l'activité de mTORC1, et donc de l'autophagie sont présentés en figure 28.

Le complexe régulateur majeur de mTORC1 est le complexe TSC1/2 (tuberous sclerosis complex 1/2). Celui-ci fonctionne comme une protéine activatrice de GTPase (GTPase-activating-protein, GAP) pour Rheb (Ras homolog enriched in brain)[370]. La forme GTP-Rheb peut se lier directement à mTORC1, ce qui stimule fortement son activité kinase[371,372]. Lorsque le complexe TSC1/2 est activé (non-phosphorylé), il stimule la conversion de GTP-Rheb (forme active) en GDP-Rheb (forme inactive), inhibant ainsi l'activité de mTORC1[373,374].

- *Intégration des signaux relatifs à la teneur en facteurs de croissance (Figure 28)*

Les facteurs de croissance, comme par exemple l'IGF1 (Insulin growth factor 1), entrainent l'activation des voies PI3K-Akt et Ras-Raf-MEK-ERK, et vont conduire à la phosphorylation du complexe TSC1/2. Cette phosphorylation inhibe l'activité de ce complexe, qui ne peut alors plus inhiber l'activité de mTORC1 *via* Rheb[375,376]. Akt peut également provoquer la phosphorylation et la dissociation de PRAS40, un inhibiteur de mTORC1[377]. La voie mTOR sera donc activée en réponse à la signalisation induite par les facteurs de croissance, ce qui entrainera l'inhibition de l'autophagie.

- *Intégration des signaux provenant de stress énergétiques (Figure 28)*

Le niveau énergétique d'une cellule se mesure grâce au ratio AMP/ATP (Adénosine monophosphate/ adénosine triphosphate). L'AMPK (adénosine monophosphate kinase) est le capteur cellulaire principal permettant la transmission des signaux provenant de stress énergétiques[378]. Cette enzyme est activée en cas de déplétion énergétique et permet la phosphorylation soit du complexe TSC1/2, soit de mTORC1 lui-même, et inhibe ainsi son activité[373,379], ce qui conduit à l'activation de l'autophagie.

- *Intégration de signaux provenant de stress oxydatifs (Figure 28)*

Tout comme le stress énergétique, le signal provenant d'un niveau d'oxygène bas dans la cellule est également transmis par l'AMPK. En cas d'hypoxie, l'AMPK va entrainer l'inhibition de mTORC1 par phosphorylation de TSC1/2 ou de mTORC1 lui-même. Une carence en oxygène va également pouvoir entrainer l'expression de REDD1 (transcriptionnal regulation of DNA damage 1), qui permet elle aussi

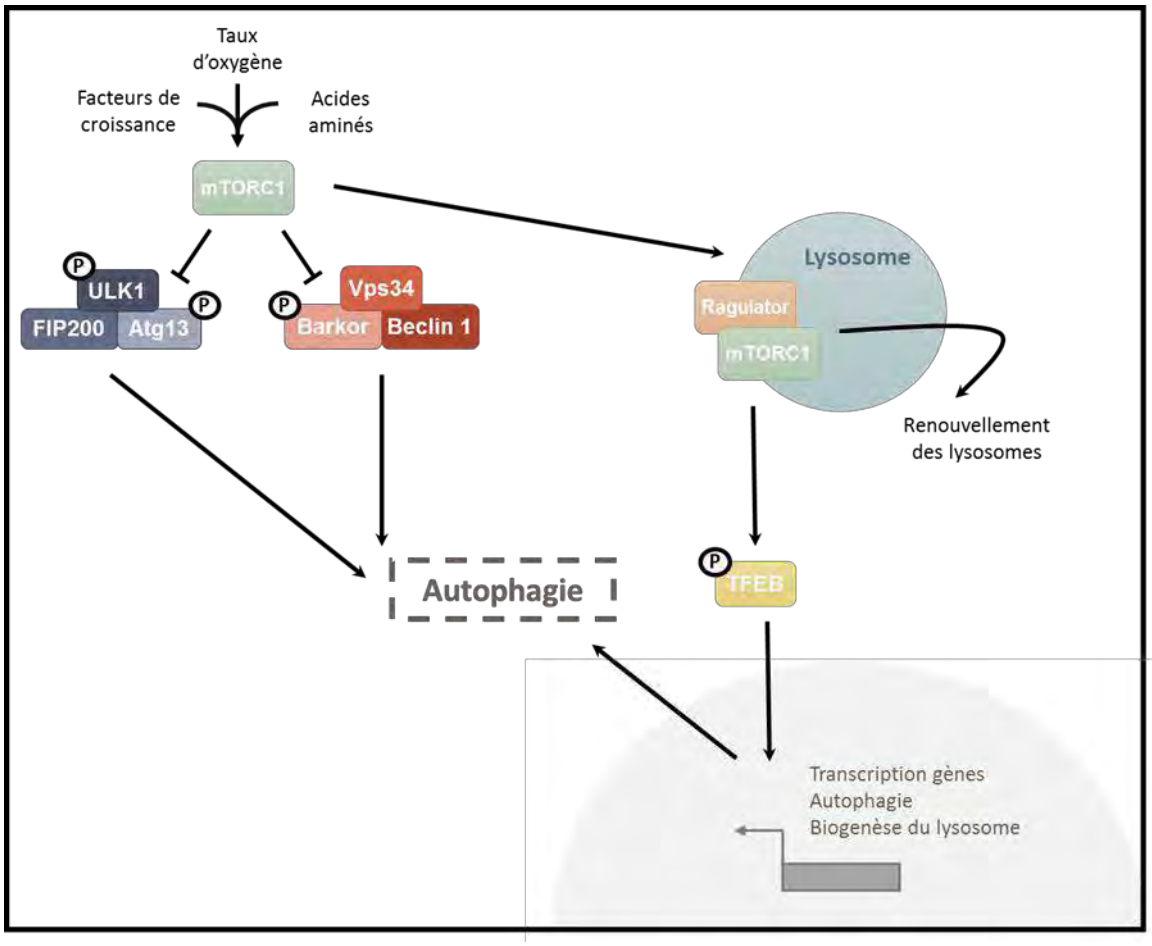


Figure 29 : mTORC1 : un régulateur clef de la réponse autophagique

Le complexe mTORC1 permet une régulation de l'autophagie à plusieurs niveaux. En condition basale, il permet le maintien des complexes d'initiation (ULK1) et de nucléation (PIK3C3) dans un état inactif par la phosphorylation de ULK1, Atg13 et Barkor. En cas de stress nutritionnel, la phosphorylation de ces complexes est levée et le processus autophagique est initié. Dans les situations de carences, mTORC1 est relocalisé au niveau du lysosome, où il pourra être activé par le complexe Ragulator. Cette activation va entrainer la phosphorylation et la translocation dans le noyau de TFEB, un facteur de transcription responsable de l'expression de gènes codants pour des protéines impliquées à la fois dans l'autophagie et dans la biogenèse du lysosome.

l'activation de TSC1/2[380]. L'inhibition de mTORC1 induite par le stress oxydatif permettra donc l'induction du flux autophagique.

- *Intégration de signaux provenant des acides aminés (Figure 28)*

La déprivation en acides aminés est un autre signal d'alarme qui permet la modulation de l'activité de mTORC1, mais contrairement aux mécanismes précédents, celui-ci est indépendant du complexe TSC1/2[381,382]. Certaines études ont montré que la signalisation induite par les acides aminés permet aux GTPases Rag (Rag A, B, C et D) de se lier à la protéine Raptor du complexe mTORC1, et d'entrainer sa translocation au lysosome, au niveau d'un complexe multi-protéique nécessaire à son activation, appelé Ragulator[383]. L'activation de mTORC1 après sa relocalisation serait médiée par sa rencontre avec la protéine Rheb, localisée dans la membrane du lysosome[384]. En condition de carence en acides aminés, la formation du complexe Ragulator ne se fait pas, et mTORC1 n'est alors pas activé, ce qui induit le flux autophagique.

On peut également noter que le complexe TSC1/2 peut être régulé par d'autres types de signaux tels que le stress induit par les dommages à l'ADN (via la transcription de gènes p53 dépendants), l'activation de la voie Wnt, ou encore la signalisation induite par des cytokines pro-inflammatoires[361,365]. Ces stimuli sont donc également des potentiels régulateurs de l'autophagie de par leur capacité à moduler l'activité de mTORC1.

c. Signalisation cellulaire en aval de mTORC1

- *Régulation de l'autophagie*

Toutes les conditions conduisant à l'inhibition de mTORC1 telles que la déprivation en facteurs de croissance ou en acides aminés, ou encore un niveau bas d'énergie ou d'oxygène, comme présenté dans le paragraphe précédent, entrainent par voie de conséquence l'activation de l'autophagie. Les acteurs de la régulation de l'autophagie situés en aval de mTORC1 sont présentés sur la figure 29 et décrits ci-dessous.

Comme mentionné dans la partie 2.2 de ce chapitre, mTORC1 peut agir sur l'autophagie en inhibant le complexe d'initiation ULK1. En conditions nutritionnelles normales, lorsque le complexe mTORC1 est activé et que l'AMPK est inactive, mTORC1 se lie à ULK1 *via* la protéine Raptor[385]. Cette liaison va entrainer la phosphorylation d'Atg13 et de ULK1 sur le résidu sérine 757 (Ser757) et ainsi, permettre le maintien du complexe ULK1 sous forme inactive[386]. Lors d'une carence nutritionnelle, l'AMPK est activée, et entraine l'inactivation de mTORC1. Celui-ci se détache alors du complexe ULK1, provoquant ainsi la déphosphorylation de Atg13 et de ULK1 (Ser757). Ces déphosphorylations permettent l'activation du complexe ULK1, qui peut s'autophosphoryler (Ser467), et phosphoryler Atg13 et FIP200[312,387]. Ainsi activé, ULK1 peut être relocalisé au niveau de l'omégasome et entrainer l'initiation

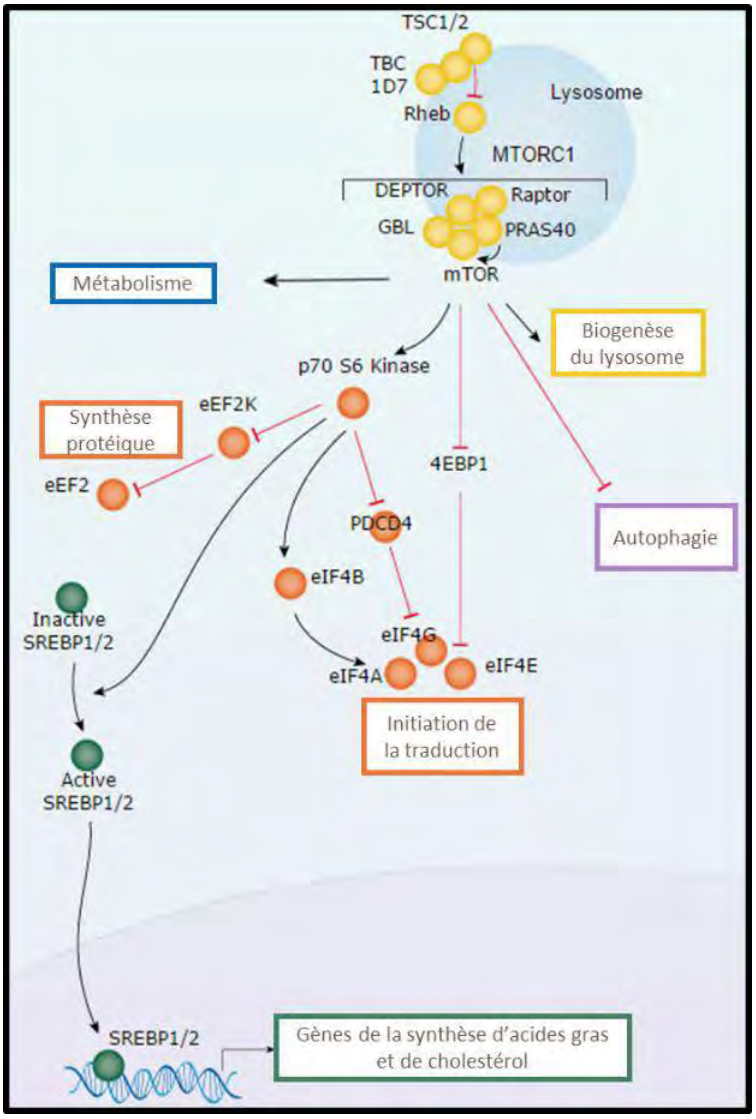


Figure 30 : Effets principaux de l'activation de mTORC1 *(adapté de RnDSystems.com)*
L'activation de mTORC1 permet l'induction de plusieurs mécanismes, (1) mTORC1 permet l'inhibition de l'autophagie. Les mécanismes conduisant à cette inhibition sont développés en figure 29. (2) mTORC1 permet l'activation de la synthèse protéique de par la phosphorylation de la p70S6K1 (p70 ribosomal S6 Kinase1), et de la protéine 4EBP1 (Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1). (3) L'activation de mTORC1 induit également la synthèse d'acides gras et du cholestérol, par l'activation du facteur de transcription SREBP. (4) mTORC1 conduit aussi à l'activation du métabolisme cellulaire. (5) Enfin, l'activation de la voie mTORC1 stimule la biogenèse des lysosomes.

de l'autophagie (Figure 29). mTORC1 peut également agir sur le complexe de nucléation de l'autophagie. Lorsqu'il est activé, il phosphoryle la protéine BARKOR, ce qui induit l'inhibition de la kinase Vps34, et empêche la nucléation du phagophore[388] (Figure 29). Le complexe mTORC1 peut également réguler l'autophagie au niveau transcriptionnel, en particulier *via* le facteur de transcription EB (TFEB). mTORC1 phosphoryle TFEB sur le résidu sérine 211, ce qui entraine la rétention du facteur de transcription dans le cytoplasme[389]. Quand mTOR est inactivé, TFEB est déphosphorylé et relocalisé dans le noyau, où il contrôle l'expression de gènes impliqués à la fois dans l'autophagie et dans la biogenèse du lysosome[390,391] (Figure 29). Certaines études montrent que mTORC est réactivé après une longue période de déprivation en acides aminés, probablement à cause de la dégradation du contenu de l'autophagosome, et donc le relargage d'acides aminés dans le cytoplasme. Cette réactivation de mTORC1 est une étape nécessaire à la reformation des lysosomes, comme mentionné dans la partie 2.5 de ce chapitre[287,392].

- *Régulation de la traduction*

D'autres mécanismes cellulaires sont connus pour être placés sous le contrôle de mTORC1, ils sont listés en Figure 30. La synthèse protéique en fait partie. Lorsqu'il est activé, mTORC1 permet la phosphorylation de 4E-BP1 (Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1), qui va se dissocier du facteur de transcription EIF4E (Eukaryotic translation initiation factor 4E), et induire la traduction cap-dépendante[393]. L'activation de mTORC1 permet également la phosphorylation de p70S6K1 (p70 ribosomal S6 Kinase1), ce qui conduit à une augmentation de la biogenèse des ribosomes, mais aussi de l'initiation de la traduction et de l'élongation protéique *via* divers effecteurs[376].

- *Autres voies régulées par mTORC1*

En plus de la synthèse protéique, mTORC1 permet l'augmentation de la biosynthèse des lipides, notamment en contrôlant SREBP1 (sterol regulatory element binding protein 1), ou PPARγ (peroxysome proliferator activated receptor γ), deux facteurs de transcription impliqués dans la biogenèse des lipides et du cholestérol[394].

Lorsqu'elle est activée, la voie mTOR entraine une forte consommation d'énergie afin de promouvoir la croissance cellulaire. Dans ce sens, il a été montré que l'activation de mTORC1 régule positivement le métabolisme cellulaire et la production d'ATP. En effet, mTOR induit la glycolyse de par l'activation de HIF1α (Hypoxia inducible factor 1 alpha), un facteur de transcription permettant la régulation de nombreux gènes de la glycolyse. Il a également été montré que mTORC1 pouvait jouer un rôle dans la biogenèse des mitochondries et leur métabolisme[395,396].

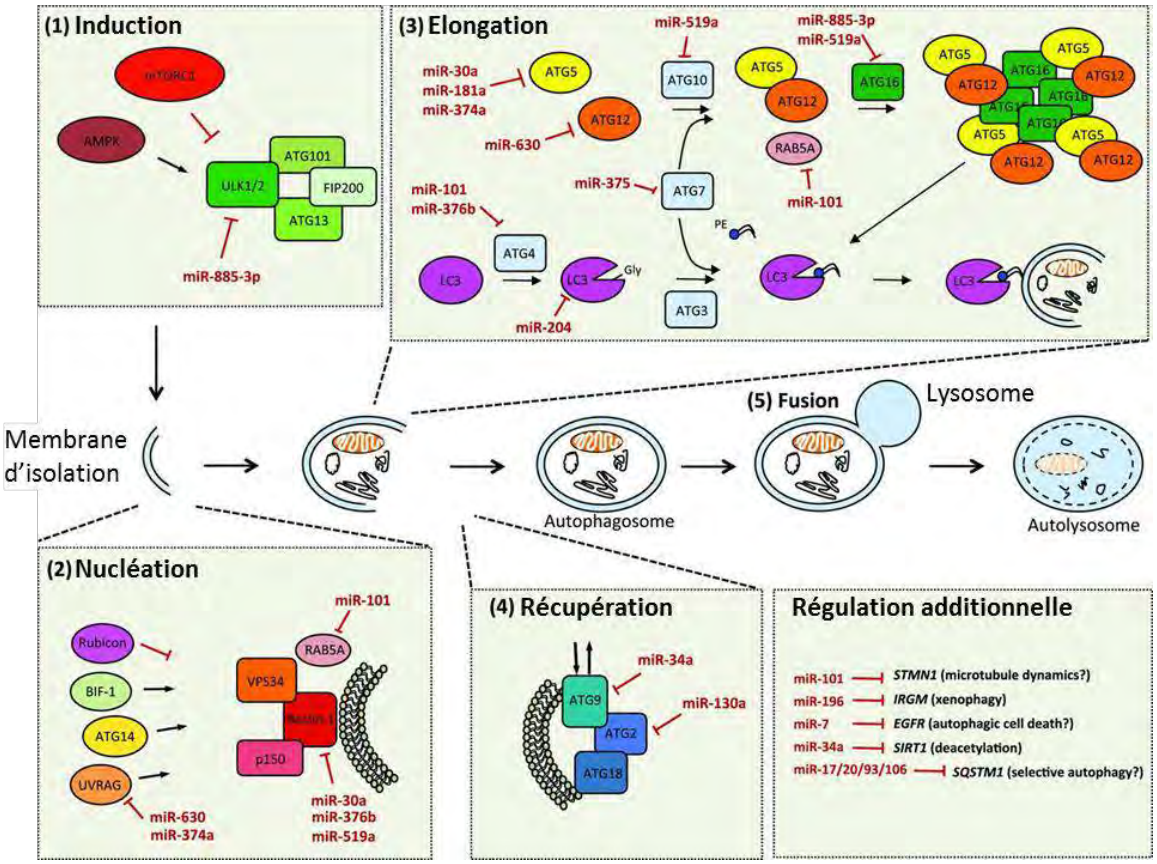


Figure 31 : Régulation de l'autophagie par les microARNs

(d'après Frankel et al., 2012)[358]

Les microARNs régulent la machinerie autophagique, en contrôlant l'expression de gènes impliqués dans toutes les étapes du processus. (1) A l'étape de nucléation, le miR-885-3p régule les protéines ULK1 et 2. (2) Lors de la nucléation, le complexe Beclin 1 est directement régulé par miR-30a, miR-376b et miR519a. D'autres protéines régulatrices de ce complexe sont elles aussi régulées *via* des microARNs, telles que la protéine RAB5A par miR-101, ou la protéine UVRAG par miR-630 et miR-374a. (3) Toutes les protéines impliquées dans l'élongation du phagophores sont elles aussi soumises à un contrôle post-transcriptionnel. Les microARNs impliqués dans ce processus sont entre autres miR-30a, miR-204, miR-181a, miR-374a, miR-376b, miR-375, miR-630, miR-101, miR-885-3p et miR-519a. (4) Les protéines Atg9 et Atg2, impliquées dans le transfert de lipides à l'omégasome peuvent être régulées par miR-34a et miR-130a. (5) Des étapes de régulation additionnelles de l'autophagie, non impliquées dans la machinerie canonique, peuvent aussi être soumises au contrôle de microARNs. C'est notamment le cas de la protéine p62 (sequestosome 1 ou SQSTM1), une protéine adaptatrice nécessaire à la dégradation de substrats ubiquitinylés.

En conclusion de cette partie, il apparaît clairement que le complexe mTORC1 agit donc comme un régulateur négatif majeur, direct ou indirect de l'autophagie. En effet, toutes les voies de signalisation en amont et en aval de ce complexe peuvent intervenir dans la régulation du flux autophagique. Comme démontré ci-dessus, l'inhibition de la voie mTOR permet l'induction directe de l'autophagie, alors que l'activation de mTOR permet la synthèse de protéines ou de lipides, ainsi que la régulation de la formation des lysosomes, qui participent indirectement à la régulation du flux autophagique.

4.2 Régulation de l'autophagie par les microARNs

L'autophagie est une réponse cellulaire impliquant de très nombreux partenaires protéiques, tant au niveau de sa machinerie que de sa régulation. Tous les acteurs protéiques de ce processus sont des candidats potentiels à une régulation post-transcriptionnelle par les microARNs (Figure 31). Le mécanisme d'action de ces microARNs est présenté dans le chapitre 1, partie 5.1.

a. Exemples de microARNs impliqués dans la régulation de l'autophagie

- *Le miR-30a :*

Le premier microARN ayant été décrit comme ciblant une protéine de l'autophagie a été publié en 2009 : il s'agit du miR-30a qui module l'expression de la protéine Beclin 1[397]. La sur-expression de ce miR induit la sous-expression de Beclin 1, et ainsi le blocage du flux autophagique activé par la rapamycine dans des lignées issues de divers cancers. Des études plus récentes ont ensuite étudié l'intérêt fonctionnel de ce miR-30a : l'équipe de Zou et al. a démontré qu'en supprimant le flux autophagique dans des lignées cellulaires cancéreuses, miR-30a permettait de les sensibiliser à la cisplatine, un agent alkylant antinéoplasique[398]. Une autre étude parue en 2012 s'est intéressée au rôle de miR-30a dans les leucémies myéloïdes chroniques traitées à l'Imatinib, un inhibiteur spécifique de la tyrosine kinase Bcr-Abl. Le traitement à l'Imatinib induit la diminution de l'expression de miR-30a et donc l'induction du flux autophagique. Le blocage du flux par réexpression du miR permet une potentialisation de l'effet cytotoxique de l'imatinib[399]. MiR-30a permet également la sensibilisation des cellules au Sorafenib (un inhibiteur multi-kinase) dans le carcinome rénal[400], et d'autres études démontrent son rôle dans les cardiomyocytes[401], dans l'ischémie cérébrale[402], ou encore dans l'infection des cellules par le bacille de Koch[403], *via* son action sur Beclin 1 et l'autophagie.

- *Le miR-101 :*

Depuis cette découverte, de nombreux microARNs régulant l'autophagie ont été mis en lumière[404–407]. Nous pouvons notamment mentionner le miR-101, qui inhibe le flux autophagique induit par l'étoposide ou la rapamycine dans le cancer du sein, *via* l'inhibition de STMN1, RAB5A et ATG4D[408]. Il permet également d'augmenter l'apoptose induite par la cisplatine dans les carcinomes hépatiques[409].

MiR-101 peut également agir sur le flux autophagique par la modulation de la voie mTOR[410,411]. Il est intéressant de noter que mTOR fait partie des voies de signalisation induites en aval de l'oncogène NPM-ALK, et que l'expression de miR-101 est faible dans les LAGC ALK+. La restauration de l'expression de ce microARN dans ces lymphomes entraine l'inhibition de la prolifération cellulaire[156,167], et induit une inhibition de la croissance tumorale dans des modèles murins de xénogreffes. Les conséquences de son expression sur le flux autophagique dans ce modèle cellulaire n'ont cependant pas encore été étudiées à ce jour.

- *Le miR-34a :*

Le miR-34a, quant à lui, a pour cible directe ATG9A et ATG4B[412,413], et permet ainsi une inhibition de l'autophagie. Il est intéressant de noter que ce miR est le premier à avoir été utilisé à des fins thérapeutiques chez des patients atteints de divers cancers, notamment pulmonaires ou hématologiques pour son effet inhibiteur de la protéine Bcl-2. En effet, une compagnie américaine, miRNA Therapeutics (http://www.mirnarx.com/), a annoncé en 2013 le début de tests cliniques pour évaluer l'efficacité de leur produit, le MRX34. Il s'agit d'une préparation liposomale composée de lipides ionisés contenant le miR-34a et pouvant être injectés directement par voie intraveineuse chez le patient[414]. A ce jour, les essais cliniques ont permis d'étudier la réponse de plus d'une centaine de patients, et de déterminer la dose maximale tolérée. Une mise à jour des résultats de l'essai clinique en cours (NCT01829971, https://clinicaltrials.gov) est attendue pour mi-2016. Les effets de ce miRNA sur l'autophagie chez les patients ne sont toutefois pas connus à ce jour.

- *Le miR-7*

Tous les exemples précédents décrivent des microARNs permettant la répression du flux autophagique. Le cas du miR-7 est à l'opposé de ces exemples. En effet, l'expression de ce microARN permet l'induction du flux autophagique dans des modèles de cancer du poumon et de l'œsophage[415]. MiR-7 cible directement l'EGFR (Epidemial Growth Factor Receptor), et supprime son expression[416]. L'EGFR est un régulateur négatif connu de l'autophagie : il peut se lier directement à Beclin 1, altérant ainsi son interactome, ce qui inhibe l'induction du flux autophagique[417]. L'EGFR est un récepteur aux facteurs de croissance, il est donc situé en amont des voies de signalisation Ras-Raf-MAPK et PI3K-Akt, qui toutes deux contrôlent l'activation de mTOR[418]. La surexpression de miR-7 conduit donc à l'induction du flux autophagique.

b. Base de données ARN (Autophagy Regulation Network)

Actuellement, il y a 1881 séquences de microARNs humains, référencées sur miRBase[419] (http://mirbase.org/). On sait également qu'il existe plus d'une trentaine de gènes impliqués dans la machinerie canonique de l'autophagie, sans compter les étapes permettant sa régulation. Chacune de

ces protéines peut potentiellement être régulée par un ou plusieurs des microARNs, ce qui représente un nombre de possibilités considérables qui ne pourront pas toutes être détaillées dans ce manuscript. Le volume de données générées est tel, qu'il est nécessaire de développer des outils bio-informatiques permettant l'archivage et le tri des nouvelles informations recueillies. C'est dans cet esprit qu'une base de données spécialisée a été développée l'an dernier : Autophagy Regulatory Network (ARN ; http://autophagy-regulation.org)[420]. Cet outil porte sur 38 protéines clefs de la machinerie autophagique, et permet de les relier avec leurs régulateurs protéiques, transcriptionnels et post-transcriptionnels. Il permet également d'établir des interconnexions entre différentes voies de signalisation et la voie de l'autophagie. Actuellement, cette base de données recense 1572 régulateurs de l'autophagie, tous types de régulations confondues, dont 386 microARNs.

CHAPITRE 4 : ROLE DE L'AUTOPHAGIE DANS LE CANCER

1 ROLE DE L'AUTOPHAGIE DANS LA TUMORIGENESE

L'autophagie est un processus présent à un niveau basal dans toutes les cellules, et assure le contrôle qualité du cytoplasme[421]. Comme décrit précédemment, ce mécanisme peut être fortement activé en réponse à de nombreux stress cellulaires tels que la carence en nutriments ou encore l'hypoxie, afin de protéger la cellule et de permettre sa survie[356]. Ainsi, l'autophagie constitue une barrière de protection contre ces divers stress, et la transformation de cellules saines en cellules malignes en fait partie. Le rôle de l'autophagie dans la tumorigenèse est à double tranchant : l'autophagie peut agir en tant que suppresseur ou promoteur de tumeur[422]. Dans ce chapitre, nous allons détailler les mécanismes permettant l'existence de ces deux fonctions opposées de l'autophagie, puis nous discuterons de l'importance du stade tumoral ainsi que du contexte génétique de la tumeur dans le rôle du processus autophagique.

1.1 Fonctions anti-tumorales de l'autophagie

Dans la littérature, plusieurs études relient l'autophagie à la carcinogenèse : chez l'homme, on retrouve des délétions monoalléliques des protéines Beclin 1, UVRAG ou Bif-1 (protéines partenaires au sein du complexe PI3K de classe III), dans certains cancers du sein, de l'ovaire, et de la prostate[321,423,424] et l'incidence de l'apparition de tumeurs spontanées est augmentée dans les souris transgéniques Beclin $1^{-/+}$ [425]. D'autres études dans des modèles murins ont permis d'assigner des fonctions suppresseur de tumeurs à diverses protéines de l'autophagie : c'est notamment le cas pour Atg5 et Atg7, dont la délétion entraîne la formation de carcinomes hépatiques[426], ou Atg4c dont la délétion augmente la susceptibilité de souris traitées par des agents chimiques à développer des fibrosarcomes[427]. Le rôle de l'invalidation des gènes codant pour Atg7 ou Ulk1 dans le développement de syndromes myélodysplasiques a également été montré[428]. De plus, une étude récente a mis en évidence que la mutation d'un facteur d'épissage (U2AF1, U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 1) entraine un clivage distal de la protéine Atg7, ce qui conduit à l'inhibition de l'autophagie associée à la promotion de la croissance tumorale dans les syndromes myélodysplasiques ainsi que les leucémies aigües myéloïdes[429].

Il est également intéressant de constater que la majorité des voies de signalisation permettant le contrôle de l'autophagie sont également impliquées dans le contrôle du cancer : la surexpression de nombreux oncogènes entraîne une diminution de l'autophagie lors du processus de transformation oncogénique. C'est le cas par exemple de la voie PI3K/AKT, qui suite à son activation constitutive,

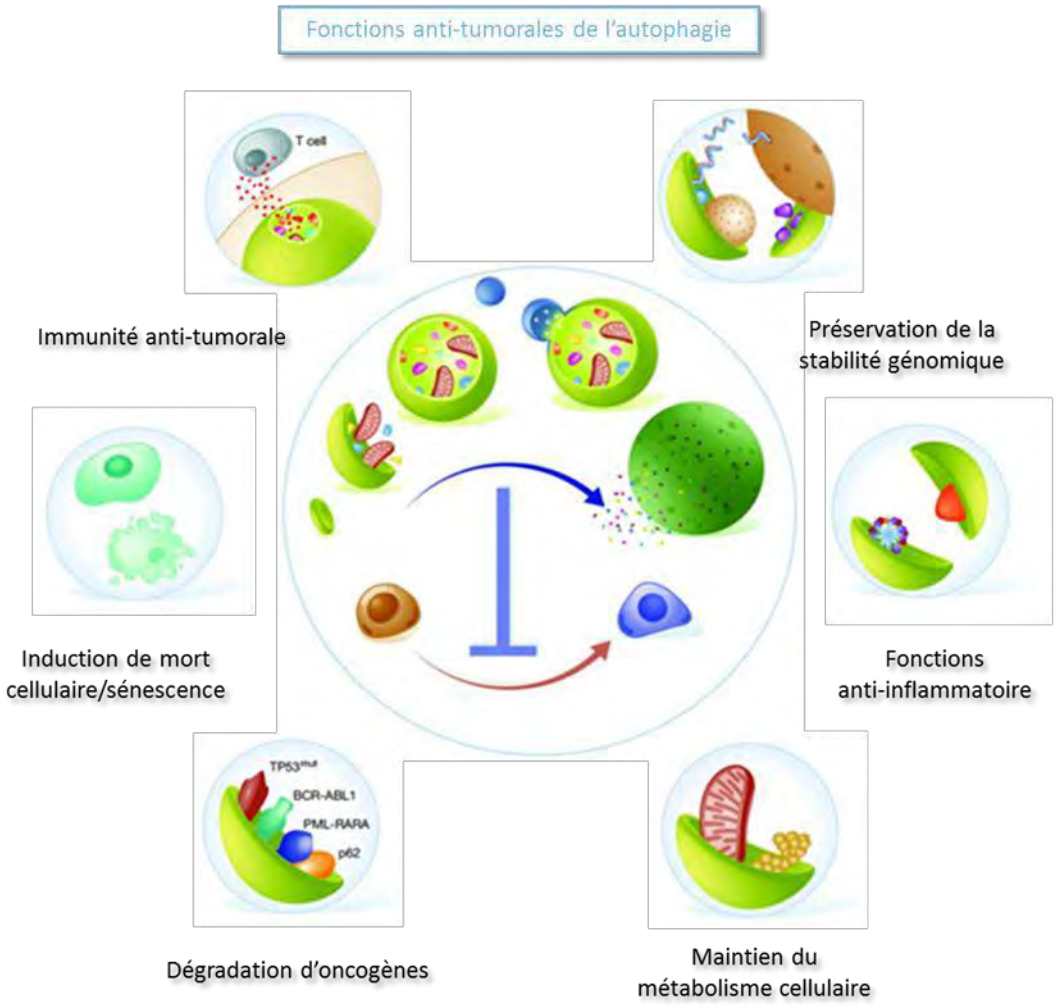


Figure 32 : Fonctions anti-tumorales de l'autophagie
(adapté de Kroemer et al., 2015)[430]
L'autophagie peut exercer des fonctions anti-tumorales par plusieurs mécanismes : l'activation de l'immunité anti-tumorale, la préservation de la stabilité génomique, l'inhibition de processus inflammatoires, le maintien du métabolisme cellulaire, la dégradation de protéines oncogéniques et l'induction de la mort cellulaire ou de la sénescence.

conduit à l'activation de mTORC1, et donc à l'inhibition de l'autophagie[431]. L'oncogène Bcl-2 est également fréquemment surexprimé dans de nombreux cancers et entraine la diminution du flux autophagique en se liant à la protéine Beclin 1[432]. Ces observations semblent indiquer un rôle suppresseur de tumeur de l'autophagie. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer ce rôle oncosuppresseur de l'autophagie, ils sont présentés en Figure 32, et détaillés ci-dessous.

a. Prévention de la transformation de cellules normales

- *Gestion de la réponse à l'instabilité génomique*

L'instabilité génomique est un phénomène fortement corrélé avec l'apparition de cancers : en effet, elle constitue un territoire favorable à la transformation oncogénique des cellules[433]. Certaines études ont démontré que l'autophagie permettait de limiter les dommages à l'ADN, l'instabilité chromosomique et l'aneuploïdie[434]. On peut également constater qu'un déficit en autophagie est associé à l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO)[435]. Ces ERO sont des dérivés hautement génotoxiques qui peuvent altérer de nombreuses macromolécules cellulaires (acides nucléiques, protéines, lipides) et qui sont fréquemment produits lors de dysfonctions mitochondriales[436]. L'autophagie, par la prise en charge de mitochondries endommagées (mitophagie), permet de prévenir l'accumulation de ces mitochondries déficientes et ainsi de réduire le stress oxydatif. L'ensemble de ces mécanismes indique que l'autophagie permet de protéger les cellules contre l'instabilité génomique, et permet ainsi d'éviter l'apparition d'évènements oncogéniques.

- *Diminution de la réponse inflammatoire*

De nombreuses études ont permis de mettre en évidence le rôle du microenvironnement inflammatoire dans la croissance tumorale[437]. Le processus autophagique permet de limiter cette réponse inflammatoire, ce qui empêche le développement tumoral[438]. Il a notamment été démontré que l'inhibition de l'autophagie dans des cellules incompétentes pour l'apoptose induit la mort cellulaire par nécrose, et augmente le taux d'inflammation ainsi que la croissance tumorale[439]. La nécrose est une forme de mort cellulaire connue pour stimuler une forte réponse inflammatoire[440]. Ces résultats suggèrent que l'autophagie contribue à la suppression de la tumeur en limitant la mort cellulaire par nécrose et le développement du microenvironnement inflammatoire.

L'autophagie peut également diminuer l'inflammation en agissant à d'autres niveaux. Elle permet notamment de dégrader les protéines composant l'inflammasome, une plateforme supramoléculaire responsable de la sécrétion de cytokines inflammatoires ainsi que les mitochondries endommagées, responsables de l'émission de signaux pro-inflammatoires[441,442]. Une étude a notamment montré que le blocage du récepteur à l'interleukine 1 dans des cellules déficientes en production de EROs permettait une diminution de l'activité de l'inflammasome, associé à une restauration du processus

autophagique[443]. D'autres études ont montré que l'accumulation de la protéine p62, induite par une déficience en autophagie, active des facteurs de transcription impliqués dans la réponse au stress, tels que NFκB, ou NRF2, et favorise l'inflammation[444].

- *Dégradation de pathogènes carcinogènes*

Comme décrit en introduction, l'autophagie permet l'élimination de pathogènes intracellulaires (xénophagie, chapitre 3 partie 1.3). Or, certains de ces pathogènes sont connus pour leur propriétés oncogéniques. Une étude a notamment montré le rôle de la xénophagie dans l'élimination de pathogènes tels que le virus d'Epstein Barr (EBV), ou la bactérie *Helicobacter Pylori*, deux pathogènes responsables de cancers gastriques[445].

b. Maintien de l'homéostasie métabolique

En conditions normales, l'essentiel de l'énergie utilisée par une cellule saine provient de l'oxydation du pyruvate dans les mitochondries (processus aérobie). Lors de la transformation maligne, on assiste à un changement métabolique, et la principale source d'énergie utilisée provient de la glycolyse suivie de la fermentation de l'acide lactique (processus anaérobie) : c'est ce qu'on appelle l'effet Warburg[446]. Dans ce cas, la consommation de glucose est nettement augmentée, et la respiration mitochondriale n'est pas assez efficace pour produire toute l'énergie nécessaire à la cellule tumorale. De plus, certains acides aminés comme la sérine et la glutamine deviennent indispensables à la cellule, pour faire face à son activité métabolique augmentée[447,448]. Le rôle de l'autophagie dans ce cas est de rétablir un métabolisme « traditionnel », en permettant la dégradation des mitochondries non fonctionnelles, et en augmentant la quantité de nutriments disponibles pour la cellule grâce, en particulier, au recyclage d'acides aminés[449]. Elle tend donc là aussi à jouer un rôle de suppresseur de tumeur en permettant la normalisation du métabolisme tumoral.

c. Participation à des mécanismes oncosuppresseurs

- *Mort cellulaire par autophagie*

Bien que l'autophagie soit globalement perçue comme un mécanisme permettant la survie cellulaire, elle peut, dans certains contextes, avoir une action cytotoxique[450]. Elle est considérée comme un type de mort cellulaire programmée (type II), au même titre que l'apoptose (type I), la nécrose (type III) et la catastrophe mitochondriale (type IV). L'équipe du Dr. Patrice Codogno a proposé trois critères qui permettent de définir une mort cellulaire par autophagie[451] : (1) la mort cellulaire observée est indépendante de l'apoptose, (2) la mort cellulaire est accompagnée d'une augmentation du flux autophagique, (3) l'inhibition pharmacologique ou génétique de l'autophagie prévient la mort cellulaire. Ces trois critères, et en particulier le dernier sont essentiels pour distinguer la mort cellulaire par autophagie de la mort cellulaire accompagnée d'autophagie[452]. Des exemples de mort cellulaire

par autophagie ont été essentiellement observés en réponse aux traitements par des agents anti-cancéreux, et seront décrits dans la partie 2.2 de ce chapitre. Malgré le nombre croissant d'études décrivant ce type d'autophagie, qualifiée aussi d'autophagie « cytotoxique »[453], la mort cellulaire par autophagie reste encore très discutée, et son existence est fréquemment remise en question[452,454].

- *Contrôle de la prolifération cellulaire : impact sur la sénescence induite par des oncogènes*

Le groupe du Dr Levine a été un des premiers à démontrer le rôle négatif de l'autophagie sur la prolifération cellulaire[425]. Depuis, plusieurs études ont confirmé cette observation en décrivant notamment la dégradation par autophagie de protéines impliquées dans la division cellulaire comme RHOA (ras homolog family member A)[455] ou la laminine B1[456].

Cette observation est intéressante, car l'arrêt de la prolifération cellulaire permet, de la même façon que l'exécution d'un processus de mort cellulaire programmé, de contrecarrer le développement tumoral au cours d'un processus de transformation oncogénique. L'arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 peut se faire de manière permanente, ce qui est caractéristique du processus de sénescence. Celle-ci peut être induite par différents oncogènes (OIS, oncogene induced senescence), dont l'oncogène RAS[457], et plusieurs études ont montré que l'autophagie était nécessaire à son induction[458,459]. Il a notamment été montré que l'inhibition pharmacologique ou génétique des protéines Atg5, Atg7 ou Beclin 1, empêche la mise en place de la sénescence[458–460]. Cependant, des études plus récentes suggèrent que l'autophagie peut également jouer un rôle opposé dans ce processus[461,462], c'est pourquoi des investigations supplémentaires sont encore nécessaires pour comprendre cette controverse.

Il faut également noter que l'arrêt de la prolifération cellulaire au cours de la transformation oncogénique peut dans certains cas être réversible. Dans ces conditions, on dit que les cellules entrent en dormance, et servent de « réservoir » à la pathologie. Ce processus, sera détaillé dans le paragraphe 1.2.b de ce chapitre.

- *Dégradation de protéines oncogéniques*

La protéine p62, une protéine adaptatrice impliquée dans l'autophagie sélective est souvent accumulée dans les cellules lors d'un défaut d'autophagie, car elle est dégradée par ce processus. Plusieurs études démontrent une association entre l'accumulation de cette protéine et la transformation ou la progression tumorale[463–465], en particulier dans les cellules exprimant l'oncogène RAS[435]. Certaines études suggèrent que l'accumulation de p62 dans les cellules déficientes en autophagie entraine l'activation de mTOR ainsi que de certains facteurs de transcription comme NFκB ou NRF2, responsables de l'induction de processus favorisant le développement tumoral[466]. Ces

observations indiquent que l'autophagie permet de limiter le processus d'oncogenèse en empêchant l'accumulation de la protéine adaptatrice p62.

On peut également noter que dans certains cas, l'autophagie permet la dégradation d'oncogènes comme par exemple BCR-ABL dans la leucémie myéloïde chronique[295] ou PML/RARα dans la leucémie aigüe promyélocytaire[467]. L'autophagie peut dans ces cas entrainer indirectement la mort cellulaire, car la plupart des cellules cancéreuses sont soumises au phénomène d'addiction oncogénique[468]. Enfin, d'autres études ont permis de montrer qu'une déficience en autophagie pouvait entrainer l'accumulation de formes mutées de p53, inhibant l'action anti-tumorale de la protéine p53 sauvage[469,470].

d. Activation de l'immunité anti-tumorale

Malgré un environnement inhospitalier (hypoxique), de nombreuses cellules immunitaires sont capables d'envahir et d'éliminer les tumeurs en formation. L'autophagie pourrait donc servir à l'adaptation des cellules immunitaires aux conditions métaboliques particulières présentes au niveau du microenvironnement tumoral[471]. Plusieurs études ont montré que l'autophagie permet non seulement de fournir les nutriments nécessaires aux cellules présentatrices d'antigènes (macrophages, cellules dendritiques…), mais également de promouvoir la présentation antigénique par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II[472–474]. La présentation d'antigènes tumoraux *via* le CMH de classe I permet l'activation des lymphocytes T cytotoxiques (CD8+), et celle via le CMH de classe II permet l'activation des lymphocytes T helpers (CD4+), ce qui favorise ainsi l'élimination de la tumeur en formation. D'autres études ont démontré l'importance de l'autophagie pour la survie des cellules T matures, ayant migré en périphérie : l'activation de l'autophagie permet la survie des lymphocytes T périphériques en dégradant des protéines apoptotiques ou en régulant l'homéostasie de leurs organites cellulaires[475,476]. L'autophagie permet également aux cellules tumorales de réguler leur taux intracellulaire d'ATP, et de le maintenir à un niveau suffisant. Lors de la mort des cellules tumorales, le relargage de cet ATP permet non seulement de recruter directement des cellules présentatrices d'antigènes au niveau de la tumeur, en agissant comme un signal « find-me », mais également de sécréter des chimiokines immunostimulatrices[472,477]. Toutes ces informations montrent que l'autophagie facilite la mise en place de processus d'immunosurveillance empêchant la prolifération de cellules tumorales.

1.2 Fonctions pro-tumorales de l'autophagie

De nombreuses études montrent que l'autophagie peut également revêtir un caractère pro-tumoral. Il a notamment été montré *in vivo* que les délétions d'ATG5 et d'ATG7 préviennent la croissance tumorale induite par l'oncogène RAS[478]. De la même manière la délétion monoallélique de Beclin 1

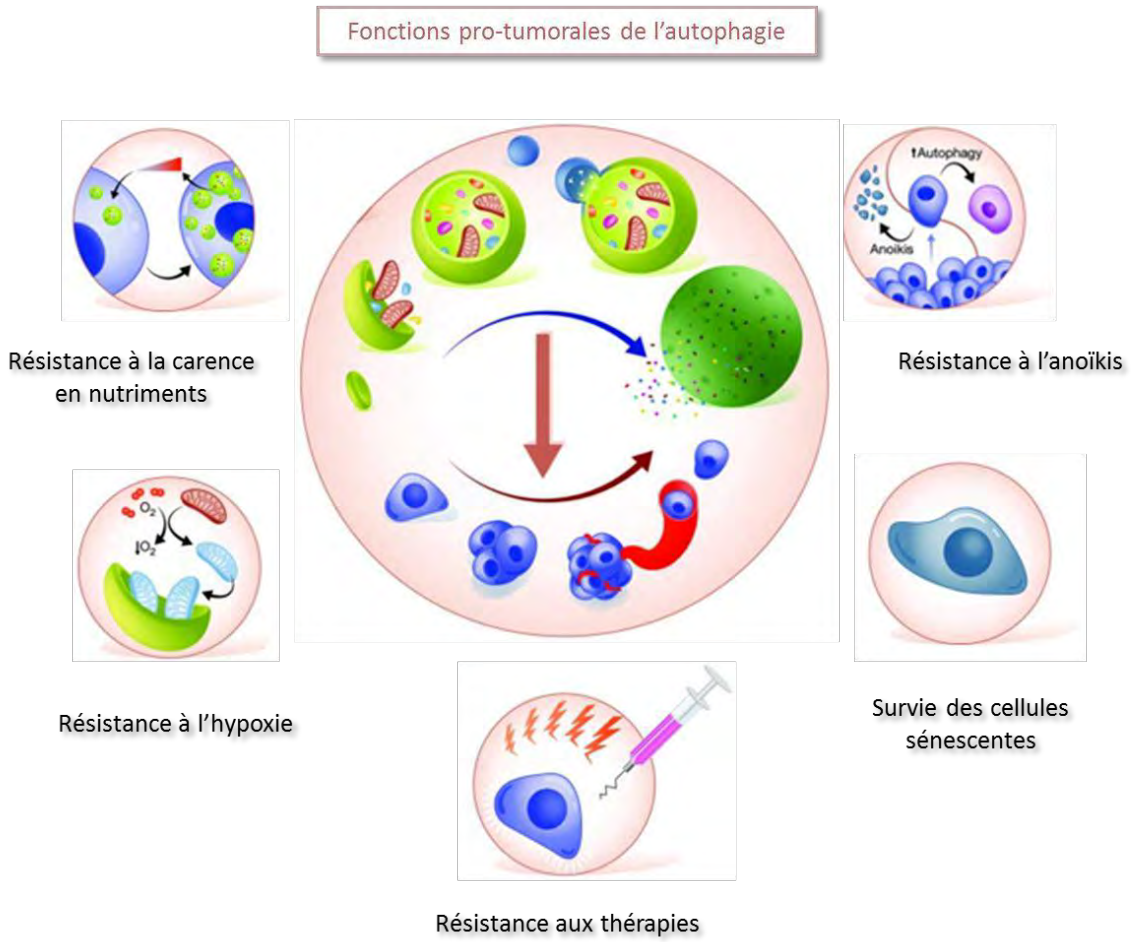


Figure 33 : Fonctions pro-tumorales de l'autophagie
(adapté de Kroemer et al., 2015)[430]
L'autophagie peut promouvoir la tumorigenèse par plusieurs mécanismes incluant : la résistance à la carence en nutriments, la résistance à l'anoïkis, la survie des cellules sénescentes, la résistance aux thérapies anti-cancéreuses et la résistance à l'hypoxie.

inhibe totalement la formation de tumeurs dans des souris $TSC^{+/-}$, c'est-à-dire des souris dans lesquelles la voie mTOR est constitutivement inactivée, et qui présentent donc un fort taux d'autophagie[479]. Cette fonction pro-tumorale peut être médiée par différents mécanismes, qui sont présentés en Figure 33 et détaillés ci-dessous.

a. Résistance aux stress (stress métabolique, hypoxie et carence en nutriments)

L'autophagie participe à l'oncogenèse, notamment par la capacité de résistance au stress qu'elle confère aux cellules tumorales. L'environnement des tumeurs est souvent hypoxique et carencé en nutriments, ce qui entraine un changement métabolique au sein des cellules cancéreuses. Dans ces conditions, l'autophagie permet aux cellules tumorales de résister à ces stress hypoxiques et nutritionnels, en fournissant une quantité accrue d'énergie aux cellules en demande. Une étude a notamment montré que l'autophagie était fortement activée dans le centre hypoxique des tumeurs, avant que l'angiogenèse ne soit mise en place et qu'elle puisse prendre le relai dans l'approvisionnement des cellules, et ainsi favoriser la croissance tumorale[439,480]. L'autophagie est également essentielle au shift métabolique observé dans les cellules tumorales (effet Warburg, voir partie 1.1.b)[481,482], et certaines tumeurs présentent une « addiction à l'autophagie », car elle permet le maintien d'un métabolisme soutenu[483]. D'autres études montrent que l'autophagie peut être activée en parallèle dans les fibroblastes associés à la tumeur (CAFs, cancer associated fibroblasts), ce qui permet la production d'énergie indispensable à la croissance des cellules tumorales adjacentes : c'est ce qu'on appelle l'effet Warburg inverse[484]. En cas de stress oxydatif, dans un environnement hypoxique, l'autophagie permet également la prise en charge des EROs, empêchant ainsi divers dommages cellulaires[485]. La capacité de l'autophagie à protéger les cellules de divers stress peut ainsi se mettre au service de la croissance tumorale, une fois le processus de transformation amorcé.

b. Rôle dans la survie de cellules dormantes

Comme décrit dans la partie 1.1.c de ce chapitre, l'autophagie joue un rôle dans l'inhibition de la prolifération cellulaire. Ce processus peut être définitif (sénescence voir partie 1.1.c), mais également temporaire. On parle alors d'entrée en « dormance » des cellules tumorales. L'autophagie a été proposée comme un mécanisme permettant aux cellules d'entrer dans cet état de quiescence. Une étude publiée par le groupe du Dr Amaravadi a mis en évidence que l'induction de l'autophagie dans des modèles murins de cancers du sein et de l'ovaire augmentait l'entrée en dormance des cellules tumorales[486]. Il a également été montré que l'autophagie était impliquée dans la survie de cellules souches cancéreuses (CSCs, Cancer Stem Cells), qui possèdent des capacités d'auto-renouvèlement, et sont responsables de la résurgence de la maladie. Ceci a été montré dans un modèle murin d'adénocarcinome pancréatique exprimant le mutant KRASG12D, dans lequel l'inhibition de

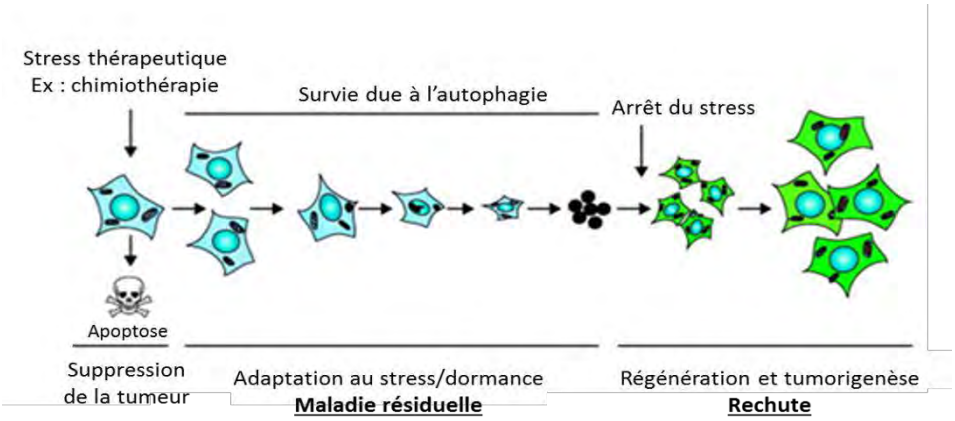


Figure 34 : Rôle de l'autophagie dans l'entrée en dormance des cellules tumorales
(adapté de Mathew et al., 2011)[458]
En présence d'un stress (notamment thérapeutique), les cellules tumorales meurent par apoptose. Cependant, l'autophagie peut permettre l'entrée en dormance d'une fraction de ces cellules (arrêt de la prolifération, survie). Lors de l'arrêt du stress, la prolifération tumorale peut reprendre, ce qui peut être responsable des rechutes observées après une thérapie anti-cancéreuse.

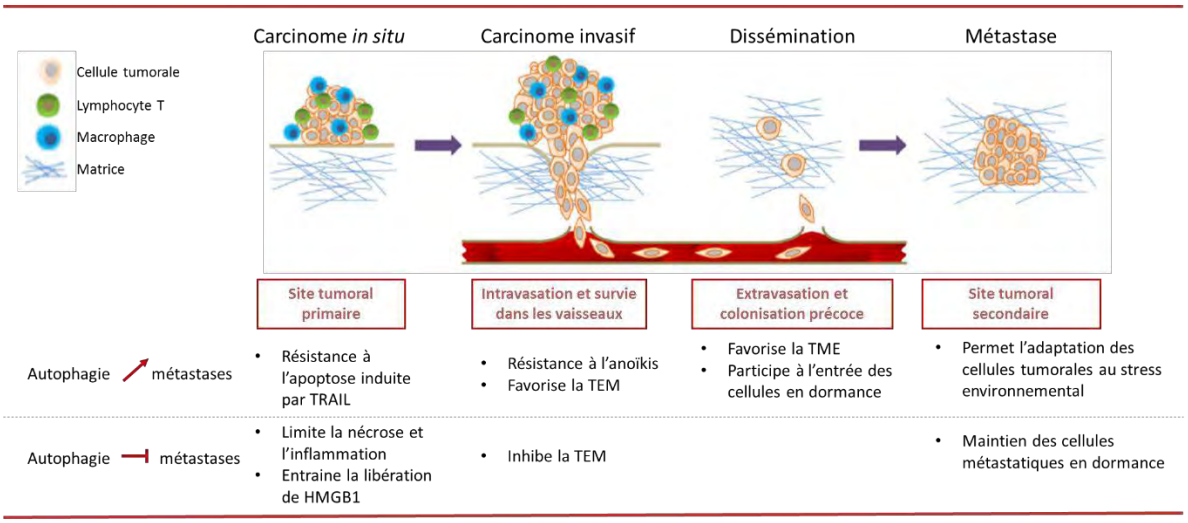


Figure 35 : Rôle de l'autophagie dans la formation de métastases
(Adapté de Kenific et al., 2010)[487]
L'autophagie joue un rôle double dans la formation de métastases en fonction du stade de colonisation métastatique. Elle permet d'induire la formation de métastases en provoquant une résistance à des mécanismes de mort cellulaire (apoptose, anoïkis), en favorisant la Transition Epithélio-Mésenchymateuse (TEM) et la transition Mésenchymato-Epithéliale (TME). Elle participe également à l'entrée en dormance des cellules métastatiques et permet leur adaptation à un nouvel environnement. De façon opposée, l'autophagie inhibe la formation de métastases en limitant la nécrose et l'inflammation au niveau de la tumeur, mais aussi en entraînant la libération de HMGB1 (high–mobility group box 1), en inhibant la TEM et en permettant le maintien des cellules métastatiques dans un état de dormance.

l'oncogène entraine la mise en dormance des cellules tumorales par un processus impliquant l'autophagie[488]. Il faut également noter que l'inhibition de l'autophagie empêche le maintien d'un phénotype de CSCs dans de nombreux types de cancers[489–491].

Ce phénomène d'entrée en dormance des cellules cancéreuses est également observé en réponse à un stress cellulaire (notamment un stress thérapeutique) : il permet la survie d'un pool de cellules tumorales qui entrent en dormance, et dont la prolifération peut reprendre après arrêt du traitement (Figure 34). Ce mécanisme de dormance est donc associé à la résurgence de la maladie dans ce cas[458,492,493].

c. Rôle duel de l'autophagie dans la formation de métastases

L'apparition de métastases se déroule en plusieurs étapes : (1) extension locale de la tumeur primaire, (2) migration et intravasation de cellules tumorales dans les vaisseaux *via* un mécanisme de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), (3) extravasation des cellules tumorales au niveau d'un site secondaire et (4) colonisation de ce site secondaire via la transition mésenchymato-épithéliale (TME)[494]. Le rôle de l'autophagie dans le processus de dissémination métastatique est complexe et peut varier à chaque étape (Figure 35).

(1) Au niveau du site primaire tumoral, l'autophagie permet la dégradation de l'inflammasome et des mitochondries endommagées, ce qui limite l'inflammation et ainsi la formation de métastases[472]. Il a également été montré que l'autophagie permet la sécrétion de HMGB1 (High-mobility group box protein 1), une protéine responsable de l'activation de l'immunité anti-tumorale[495]. En revanche, à ce niveau, l'autophagie peut conférer une résistance à l'apoptose induite par TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand)[496], ce qui est positivement corrélé à une augmentation des métastases dans le cancer du sein[497].

(2) Afin de passer dans la circulation, les cellules tumorales doivent se détacher de la tumeur primaire (phénomène de TEM). Dans ce cas, l'autophagie permet aux cellules tumorales de résister à l'anoikis, une forme de mort cellulaire déclenchée lorsqu'une cellule est détachée de la matrice extracellulaire qui l'entoure[498]. Le rôle de l'autophagie dans la TEM est ambivalent, et des études proposant un rôle pro-[499,500] ou anti- TEM pour l'autophagie ont été publiées. L'autophagie permet en particulier de dégrader de nombreux facteurs de transcription impliqués dans la TEM tels que SNAIL ou SLUG[501,502], limitant ainsi la dissémination métastatique.

(3) L'autophagie, de par son rôle dans l'induction de l'entrée de cellules cancéreuses en dormance (Partie 1.2b), permettrait de faciliter la survie de cellules colonisant un site secondaire[487]. Une

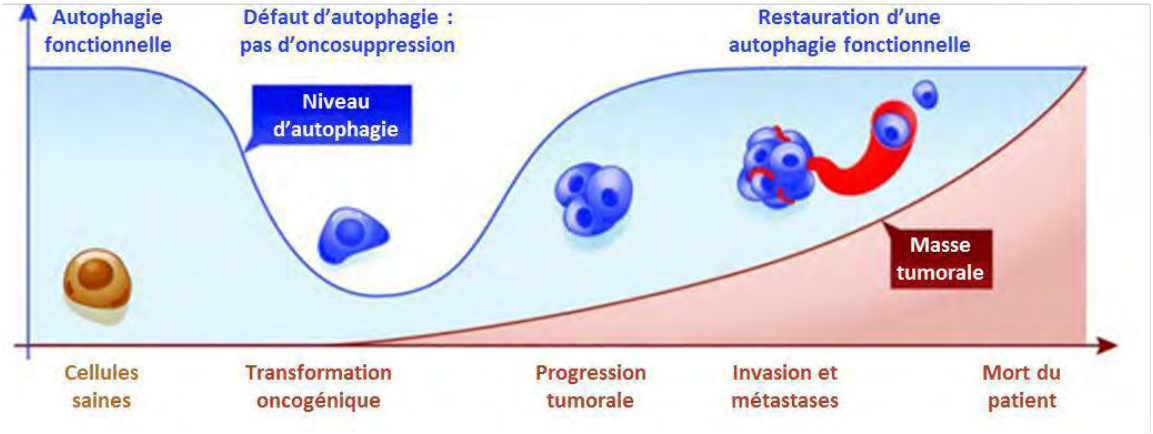


Figure 36 : Evolution de l'autophagie au cours du développement tumoral
(d'après Kroemer et al., 2015)[430]
Les cellules saines sont protégées du processus de transformation tumorale par un niveau d'autophagie fonctionnel. Un défaut d'autophagie à un temps donné, responsable d'un défaut d'oncosuppression, pourrait expliquer la transformation de cellules saines en cellules tumorales. Les mécanismes permettant la restauration d'une autophagie fonctionnelle après transformation ne sont pas encore élucidés.

(4) étude a également montré que l'autophagie participait au processus de la TME dans des hépatocytes[502], ce qui peut également favoriser le développement métastatique.

(5) Enfin, une fois le site secondaire colonisé, l'autophagie permet de restreindre l'expansion du pool de cellules tumorales lorsqu'elles sont en état de dormance (arrêt temporaire de la prolifération cellulaire)[487]. A l'inverse, l'autophagie peut permettre au pool de cellules métastatiques de s'adapter au stress afférent à leur migration, et ainsi favoriser leur prolifération[487].

1.3 Importance du stade de développement tumoral

Les rôles pro et anti-tumoraux de l'autophagie sont médiés par des mécanismes redondants. Par exemple, le fait que l'autophagie permette de protéger la cellule de stress extérieurs peut à la fois servir à l'inhibition du développement de la formation de tumeurs, mais peut également promouvoir la croissance tumorale une fois la tumeur développée[503]. L'hypothèse qui permet de réconcilier toutes ces observations tient compte de l'importance du stade de développement tumoral, et est présenté en Figure 36. Une cellule « saine » a besoin de l'autophagie pour résister à divers stress. Un déficit en autophagie dans une cellule normale peut faciliter sa transformation par un oncogène, car l'instabilité génétique et le stress métabolique seront par exemple moins bien gérés. Puis, l'autophagie est à nouveau requise lors de la progression tumorale et de la formation de métastases, notamment pour résister au stress dû au microenvironnement inhospitalier[430,504].

Ce rôle dynamique et paradoxal de l'autophagie dans le processus de tumorigenèse doit être défini plus précisément afin de permettre, à terme, l'utilisation à bon escient de modulateurs de l'autophagie dans les thérapies anti-cancéreuses.

2 ROLE DE L'AUTOPHAGIE EN REPONSE AUX TRAITEMENTS ANTI-CANCEREUX

Les rôles de l'autophagie dans le développement tumoral sont multiples, et peuvent notamment varier en fonction du stade tumoral. La grande question actuellement est de savoir si des drogues permettant la modulation de l'autophagie pourraient être associées à des thérapies anti-cancéreuses afin de potentialiser leurs effets cytotoxiques. Pour cela, il est nécessaire d'établir avec précision le rôle du processus autophagique dans la réponse aux traitements anti-cancéreux tels que la chimiothérapie, la radiothérapie ou encore les thérapies ciblées. Il a été décrit que selon le contexte tumoral et le traitement administré, l'autophagie pouvait revêtir au moins quatre rôles distincts que nous détaillerons ci-dessous. La caractérisation du rôle de l'autophagie en réponse au traitement par le

crizotinib dans les LAGC ALK+ a été un des objectifs de mon travail de thèse.

2.1 Rôle cytoprotecteur

Il n'existe actuellement aucun moyen morphologique, biochimique ou moléculaire permettant d'attribuer un rôle à l'autophagie. Il faut obligatoirement passer par des techniques empiriques permettant son inactivation, à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques, ou génétiques.

On dit que l'autophagie a une fonction cytoprotectrice lorsque son inhibition permet la sensibilisation des cellules tumorales au stress thérapeutique[505]. En général, cette sensibilisation se fait par augmentation de l'apoptose induite par le traitement[506]. Ce type d'autophagie, aussi appelé autophagie cytoprotectrice, peut entraîner la résistance des cellules cancéreuses aux traitements[507]. On peut citer l'exemple des leucémies myéloïdes chroniques, exprimant la tyrosine kinase oncogénique Bcr-Abl traitées par une thérapie ciblée : l'imatinib. Ce traitement induit un flux autophagique concomitant à la mort des cellules tumorales par apoptose. L'inhibition de l'autophagie adjointe au traitement à l'Imatinib permet de potentialiser les effets cytotoxiques du traitement, et ainsi de contrecarrer des résistances naissantes[508]. On retrouve de nombreux exemples d'autophagie cytoprotectrice induite en réponse à divers agents anti-cancéreux. C'est le cas dans d'autres cancers hématologiques tels que les leucémies aigues myéloides[509], mais également dans des cancers solides tels que le cancer du sein[510], du pancréas[511], de la prostate[512], des ovaires[513], du poumon[514], et aussi des glioblastomes[515,516] et les cancers gastro-intestinaux[517].

2.2 Rôle cytotoxique

L'autophagie peut également jouer un rôle cytotoxique c'est-à-dire qu'elle peut entrainer la mort cellulaire une fois induite[518]. Dans ce cas, elle agit en synergie avec le traitement anti-cancéreux pour induire la mort cellulaire soit par une augmentation de l'apoptose, soit par autophagie cytotoxique[505]. Il a notamment été démontré que l'induction d'autophagie *via* l'inhibition de Bcl-2 par interférence à l'ARN potentialise la mort cellulaire induite par la doxorubicine dans le cancer du sein[519]. D'autres cas d'autophagie cytotoxique ont été décrits dans le cancer du sein[338], mais également dans le cancer du poumon[520–522], dans les glioblastomes[523–525] ainsi que dans des cancers hématologiques[526–528].

2.3 Rôle cytostatique

Le rôle cytostatique de l'autophagie est moins décrit dans la littérature que les deux précédents. L'autophagie cytostatique permet la sensibilisation de la tumeur au traitement : elle n'entraîne pas l'induction de mort cellulaire mais permet en revanche l'arrêt prolongé de la croissance tumorale[505].

Le rôle de ce type d'autophagie sur l'induction du processus de sénescence est actuellement étudié dans quelques équipes. L'équipe du Dr. Gewirtz est la première à avoir décrit ce type d'autophagie dans les NSCLC ALK- après traitement par la vitamine D et par des analogues de la vitamine D[529]. Cette autophagie cytostatique permet d'augmenter la sensibilité des cellules au traitement par radiothérapie. Le groupe du Dr Huang a lui aussi récemment montré l'induction d'autophagie cytostatique dans le cancer du sein après traitement par l'Ivermectine, un agent antipaludique possédant des propriétés anticancéreuses[530].

2.4 Rôle non-protecteur

Cette forme d'autophagie est la moins décrite dans la littérature. Elle peut être induite par de nombreux stress, mais à la différence des autres formes, son inhibition n'entraine ni sensibilisation[531,532], ni résistance au traitement[505]. Des études supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer la fonction de cette autophagie et sa potentielle utilisation dans un contexte thérapeutique.

3 « SWITCH » DU ROLE FONCTIONNEL DE L'AUTOPHAGIE

Déterminer le rôle de l'autophagie dans un contexte tumoral précis et après un traitement particulier est très complexe. De nombreux exemples dans la littérature ont décrit que l'autophagie pouvait, selon la nature des traitements, changer de rôle fonctionnel au sein d'un même modèle expérimental. On parle alors de « switch » dans la fonction de l'autophagie. Plusieurs exemples seront détaillés ci-dessous, et nous exposerons ensuite le cas particulier de la régulation fonctionnelle de l'autophagie sur le plan moléculaire par le couple Beclin 1/BCL-2.

3.1 De la cytoprotection à la cytotoxicité

Plusieurs études décrivant un switch de l'autophagie cytoprotectrice vers l'autophagie cytotoxique ont été publiées. La première, dans le cancer du sein, a montré que le traitement de cellules de carcinomes mammaires par radiothérapie induit de l'autophagie cytoprotectrice. Lorsque la radiothérapie est combinée avec un traitement à base d'analogues de la vitamine D, la mort cellulaire est potentialisée, les cellules meurent en partie par autophagie[510,533]. L'addition de vitamine D dans ce système induit donc un switch entre un rôle cytoprotecteur et un rôle cytotoxique de l'autophagie. Une autre étude dans le cancer du côlon semble indiquer que la protéine p53 jouerait un rôle dans le switch de fonction de l'autophagie. En effet, l'autophagie joue un rôle cytoprotecteur en réponse au topotecan, un inducteur de dommages à l'ADN dans des cellules de cancer colorectal exprimant une protéine p53 sauvage, alors que dans les cellules exprimant une mutation de p53,

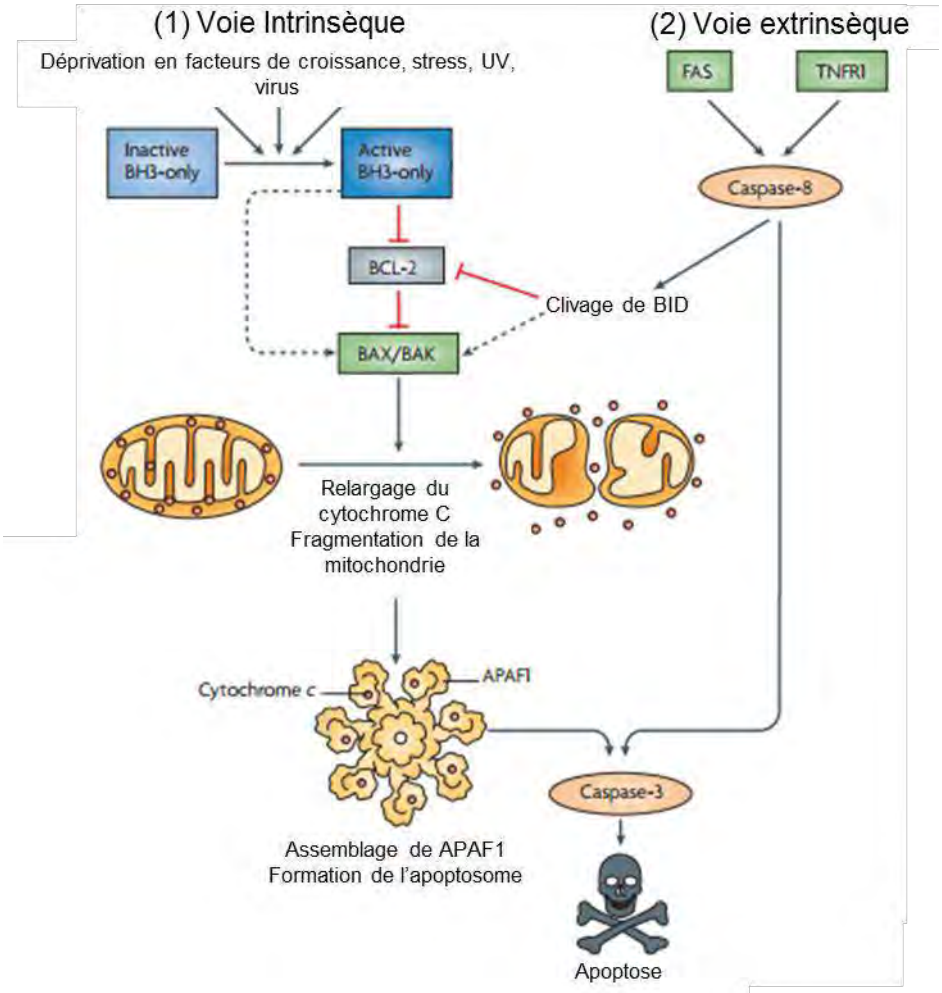


Figure 37 : Les voies permettant l'induction de l'apoptose
(d'après Youle et al., 2008)[534]
L'apoptose peut être induite par deux voies majeures. (1) La voie intrinsèque survient en réponse à divers stress cellulaires (génotoxiques, métaboliques ou transcriptionnels). Ces stress déclencheront l'activation de protéines à domaine BH3-seulement, qui résulte en l'inactivation de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Cette inactivation lève l'inhibition de Bax et Bak qui pourront former des pores au niveau de la mitochondrie et induire le relargage du cytochrome C. Certaines protéines à domaine BH3-seulement, peuvent activer Bax et Bak directement. (2) La voie extrinsèque implique des récepteurs de surface cellulaire tels que FAS ou TNFR1, qui vont activer la caspase 8, qui à son tour permettra l'activation de la caspase 3, et conduira à l'apoptose. Les deux voies apoptotiques sont interconnectées *via* la protéine BID dont le clivage par la caspase 8 permet l'induction de la voie apoptotique intrinsèque.

l'autophagie induite en réponse au traitement est de type cytotoxique[535]. D'autres études suggèrent que le rôle de l'autophagie serait dépendant du statut sensible ou résistant des cellules tumorales au traitement. C'est notamment le cas dans des cellules d'ostéosarcome résistantes ou non à la camptothécine (un inhibiteur de la topoisomérase II)[536], et dans des cellules myéloïdes, résistantes ou non au vorinostat (un inhibiteur d'histones déacétylases)[537]. Dans ces deux études, les traitements induisent de l'autophagie, qui revêt une fonction cytotoxique dans les cellules normales, et cytoprotectrice dans les cellules résistantes au traitement.

3.2 Le cas du couple Beclin 1/BCL-2

Dans ce contexte de switch autophagique, nous allons nous intéresser plus particulièrement à la protéine BCL-2, connue pour moduler à la fois la réponse apoptotique, mais également la réponse autophagique de la cellule, notamment en liant la protéine Beclin 1.

a. Généralités sur la protéine BCL-2

Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) est une protéine qui a initialement été identifiée dans le lymphome B folliculaire[538] et qui représente le prototype d'une famille de protéines contenant toutes un ou plusieurs domaines BH (Bcl-2 homology). Ces protéines sont séparées en deux groupes : celles possédant une fonction anti-apoptotique comme Bcl-2, Bcl-XL ou Mcl-1 et celles possédant des propriétés pro-apoptotiques comme Bax et Bak[539]. Cette famille de protéines prend part à de nombreuses interactions protéiques, afin de réguler la réponse apoptotique d'une cellule à un stress. La régulation de l'apoptose par la famille de protéines portant un domaine BH est présentée en Figure 37. Elle se déroule principalement au niveau mitochondrial : c'est ce qu'on appelle la voie apoptotique intrinsèque[540–542]. En temps normal, les protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-XL et Mcl-1 sont localisées à la surface de la mitochondrie où elles forment des hétérodimères avec Bax et Bak et empêchent la perméabilisation de la membrane mitochondriale. En présence d'un stimulus apoptotique, Bax et Bak vont se détacher de ces protéines, et former des pores à la surface de la mitochondrie, entraînant le relargage du cytochrome C dans le cytoplasme. Ceci activera ensuite les caspases, et aboutira à la mort de la cellule par apoptose.

b. Rôle de Bcl-2 : de l'apoptose à l'autophagie

La protéine Beclin 1 a été initialement identifiée comme une protéine pouvant se lier à Bcl-2[543] *via* son domaine BH3[544], et a été la première protéine humaine décrite comme indispensable pour

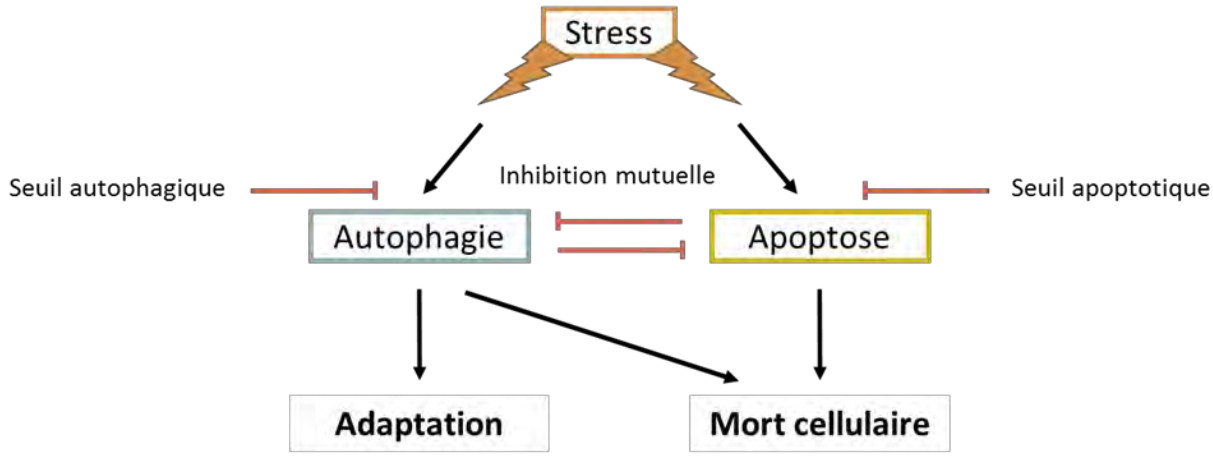


Figure 38 : Interconnexion entre l'autophagie et l'apoptose
(Adapté de Maiuri et al., 2007)[545]
De nombreux stress peuvent induire soit de l'apoptose soit de l'autophagie, en fonction de seuils de sensibilité (à déterminer). L'induction exclusive de l'un ou l'autre de ces processus peut s'expliquer par le fait que l'apoptose et l'autophagie s'inhibent mutuellement (notamment au niveau de l'interaction entre Beclin 1 et Bcl-2). L'induction parallèle de ces deux processus a cependant également été démontrée. Il est aujourd'hui admis que l'apoptose conduit à une mort cellulaire massive et irréversible, alors que l'autophagie permet l'adaptation des cellules et leur survie face à un stress. Néanmoins, un rôle cytotoxique de l'autophagie a également été démontré dans plusieurs modèles.

l'autophagie[423]. La découverte de l'interaction entre ces deux protéines a permis de mettre en lumière une des interconnexions entre les processus apoptotiques et autophagiques. Le rôle de la protéine Beclin 1 dans l'induction de l'autophagie a été décrit dans le chapitre 3, partie 2.3. Cette protéine fait partie du complexe de nucléation de l'autophagie et permet l'activation de Vps34, une PI3kinase de classe III, essentielle pour la formation de l'autophagosome. La liaison de BCL-2 à Beclin 1 empêche la formation de ce complexe et inhibe ainsi l'induction du processus autophagique. En absence de stimulus apoptotique, Bcl-2 est liée à Bax et Bak afin d'empêcher la perméabilisation de la membrane mitochondriale. Beclin 1 est donc libre d'induire de l'autophagie. En présence d'un stimulus apoptotique, Bcl-2 est dans l'incapacité de se lier avec Bax et Bak et est libre pour se lier à Beclin 1. Dans ce contexte, l'induction d'apoptose exclue donc l'induction d'autophagie[545]. La relation entre l'apoptose et l'autophagie est présentée en Figure 38. Bcl-2 peut donc être considéré comme un levier moléculaire pouvant enclencher l'apoptose ou l'autophagie de par son interaction avec la protéine Beclin 1.

Il est cependant important de noter que la protéine Bcl-2 n'est pas la seule protéine permettant à la fois la régulation de l'autophagie et de l'apoptose. De nombreuses autres régulations croisées entre ces deux processus ont été décrites et sont présentés en Figure 39.

c. Beclin 1/BCL2 : un frein à l'activation d'autophagie cytotoxique

L'interaction Beclin 1/Bcl-2 permet la modulation fine de l'induction du processus autophagique. Certaines hypothèses reliant l'intensité du flux autophagique à son rôle fonctionnel ont été proposées : lorsque l'autophagie est induite à un niveau modéré, elle aurait des fonctions permettant la survie cellulaire, en permettant le recyclage des nutriments ou des macromolécules afin de fournir de l'énergie aux cellules. Lorsque le flux autophagique augmente, le processus s'emballe, et on assisterait à la digestion massive des composants intracellulaires[545], aboutissant à la mort par autophagie. Le rôle de la protéine Bcl-2 est très intéressant si l'on considère cette hypothèse. En effet, comme montré dans le paragraphe précédent, Bcl-2 permet de moduler l'intensité de l'autophagie en liant la protéine Beclin 1. Le groupe du Dr. Levine a démontré que l'introduction d'une mutation dans le domaine BH3 de Beclin 1 (empêchant la liaison de Beclin 1 à Bcl-2), induit une augmentation massive du flux autophagique associée à une mort cellulaire importante[323]. Ce phénomène de mort cellulaire a été montré comme étant indépendant des caspases, et l'inhibition de l'autophagie permet sa réversion. Une induction massive d'autophagie médiée par l'absence d'interaction entre Beclin 1 et Bcl-2 joue donc un rôle cytotoxique. Une deuxième étude confirme le rôle de Bcl-2 dans ce contexte. L'équipe du Dr. Zehng-Hong a démontré qu'après une carence en nutriments, une forte augmentation du flux autophagique, et en parallèle une forte augmentation de l'expression de Bcl-2 sont observées. L'administration d'un inhibiteur de Bcl-2 (tel que l'ABT-737 ou le HA 14-1), en en combinaison à une

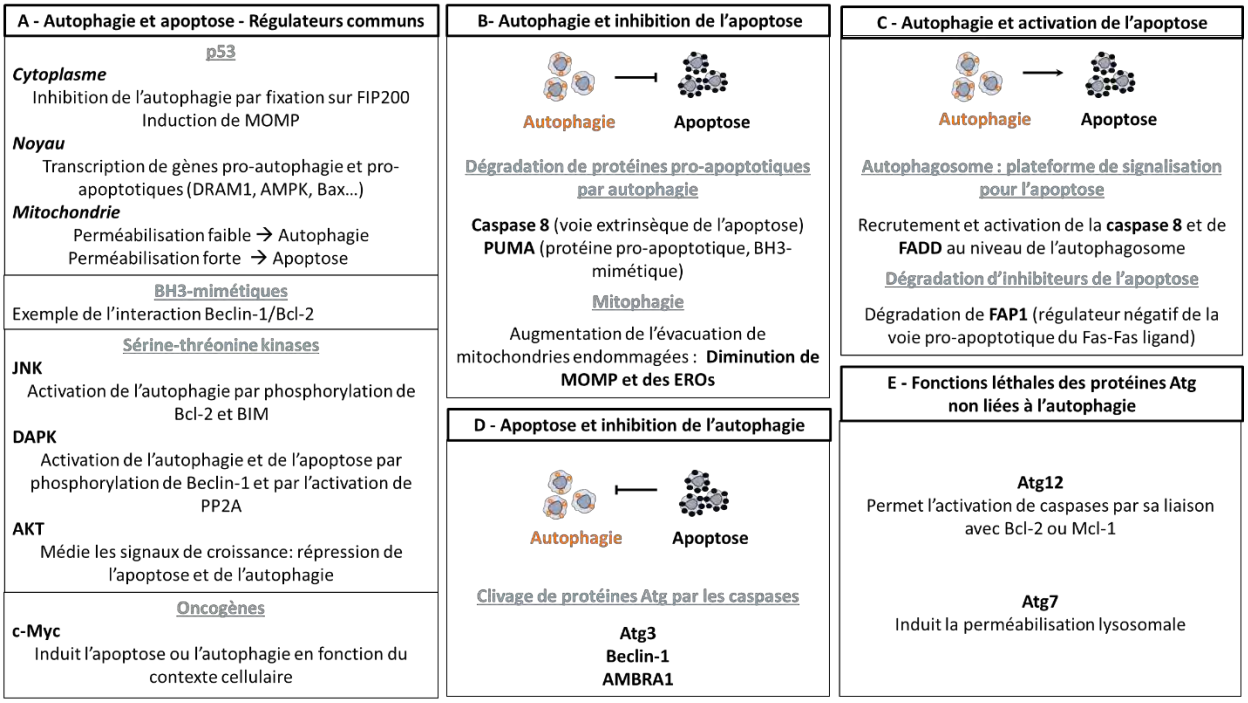


Figure 39: Acteurs moléculaires de l'interconnection entre l'autophagie et l'apoptose
(Adapté de Marino et al., 2014, Thorburn et al., 2015)[546,547]

L'interconnexion entre l'autophagie et l'apoptose peut être médiée par de nombreux acteurs moléculaires communs aux deux processus (panel A). Les protéines impliquées dans la machinerie de l'autophagie peuvent être responsables de l'inhibition (panel B) ou de l'activation (panel C) de l'apoptose. Les protéines impliquées dans la machinerie apoptotique peuvent également entrainer l'inhibition de l'autophagie (panel D). Enfin, des fonctions léthales des protéines Atg non liées à l'autophagie ont été décrites (panel E).

FIP200, focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kD ; MOMP, Mitochondrial outer membrane permeabilization; DRAM1, DNA Damage Regulated Autophagy Modulator 1 ; AMPK, AMP-activated protein kinase ; Bax, Bcl-2–associated X ; Bcl-2, B-cell lymphoma 2 ; BIM, Bcl-2 interacting mediator ; JNK, Jun N-terminal kinase ; DAPK1, Death Associated Protein Kinase 1 ; PP2A, Protein phosphatase 2A ; AKT, AKT8 virus oncogene cellular homolog ; c-Myc, Avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog ; PUMA, p53 upregulated modulator of apoptosis ; AMBRA1, Autophagy And Beclin 1 Regulator 1 ; FADD, Fas-Associated protein with Death Domain ; FAP1, Familial Amyloidotic Polyneuropathy Type 1 ; Mcl-1, Induced myeloid leukemia cell differentiation protein

déprivation en nutriments entraine un flux autophagique encore plus important, accompagné d'une mort cellulaire massive, qui peut être contrecarrée par des inhibiteurs d'autophagie[548]. Enfin, dans une troisième étude, l'équipe du Dr Staudt a montré que dans le myélome multiple, la caspase 10 entraine le clivage de BCLAF1 (BCL2 Associated Transcription Factor 1) une protéine pouvant se lier à Bcl-2[549]. Lorsque BCLAF1 est clivée, Bcl-2 peut se lier à Beclin 1, ce qui inhibe l'autophagie. Cette étude confirme bien l'implication de Bcl-2 dans la régulation de l'autophagie. Ces trois études indiquent que la protéine Bcl-2 agirait comme un frein moléculaire permettant de restreindre la réponse autophagique d'une cellule afin d'éviter un flux trop intense qui lui serait délétère. Cette hypothèse est actuellement en cours d'étude dans notre laboratoire (Torossian, Frentzel *et al.,* manuscrit en préparation), et sera également évoquée dans la partie résultats de ce manuscrit.

d. *Les microARNs dans le « switch » autophagique*

Les microARNs peuvent inhiber l'expression de nombreux gènes communs aux processus d'autophagie et d'apoptose[358,550]. C'est notamment le cas de la famille des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, MCL1, BCL2L1), qui représentent un point central à l'intersection entre ces deux voies de signalisation, et qui peuvent être régulés par plusieurs de ces petits ARNs[551]. Cependant, actuellement aucun cas de microARN permettant d'induire un « switch autophagique » n'a été rapporté dans la littérature.

4 MODULATION DE L'AUTOPHAGIE DANS LES CANCERS

La découverte de l'implication de l'autophagie dans le développement tumoral a généré beaucoup d'enthousiasme et de nombreux essais cliniques combinant des modulateurs de l'autophagie aux traitements anti-cancéreux sont actuellement en cours (Tableau 9). Néanmoins, plusieurs problèmes se posent encore quand à l'utilisation en routine de modulateurs de l'autophagie dans la thérapie anti-cancéreuse : (1) il est à l'heure actuelle impossible de prédire si une réponse autophagique va être déclenchée systématiquement après un traitement chez un patient. (2) Si une réponse autophagique est enclenchée, il n'existe pas de moyen de déterminer son rôle fonctionnel dans la réponse au traitement (cytoprotecteur ou cytotoxique), bien que l'autophagie cytoprotectrice semble être la forme la plus répandue. (3) Il n'existe actuellement pas de marqueurs fiables de mesure de l'autophagie pouvant être utilisé pour le diagnostic[505]. De nombreux efforts sont donc encore à fournir avant que la modulation de l'autophagie puisse être possible en clinique. Il est tout particulièrement important de pouvoir déterminer le rôle de la réponse autophagique induite par différents traitements, pour savoir de quelle manière la moduler.

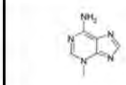
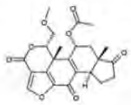
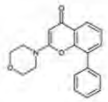
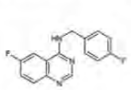
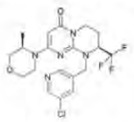
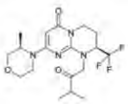
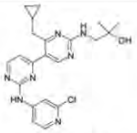
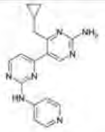
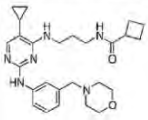
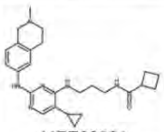
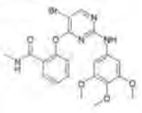
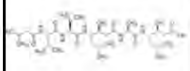
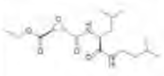
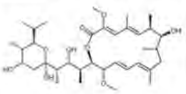
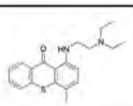
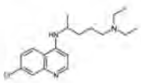
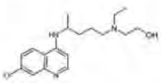
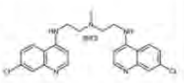
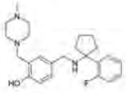
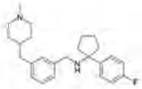
Inhibiteurs Pan PI3K	 3-methyladenine	 Wortmannine	 LY294002		
Inhibiteurs de Vps34	 Spautin-1	 SAR405	 Composé 31	 VPS34-IN1	 PIK-III
Inhibiteurs de ULK1	 MRT-67307	 MRT68921	 SBI-0206965		
Inhibiteurs du Lysosome	 Pepstatine A	 E64d	 Bafilomycine A1	 Clomipramine	 Lucanthone
	 Chloroquine	 Hydroxychloroquine	 Lys05	 ARN5187	 Composé 30

Tableau 9 : Tableau présentant les molécules permettant l'inhibition de l'autophagie
(d'après Pasquier et al., 2016)[552]
Diverses classes de molécules permettent l'inhibition de l'autophagie. On retrouve notamment des inhibiteurs pan-PI3K, des inhibiteurs de la PI3K de classe III Vps34, des inhibiteurs de la kinase ULK1 mais aussi des inhibiteurs de l'activité lysosomale.

L'autophagie pouvant jouer un rôle pro- ou anti-tumoral, il est nécessaire de disposer d'outils permettant son activation ou son inhibition pour potentialiser l'effet d'agents thérapeutiques anti cancéreux.

4.1 Outils pharmacologiques permettant la modulation de l'autophagie

a. Inhibiteurs d'autophagie

Dans la plupart des cas, il a été décrit que l'autophagie aurait un rôle cytoprotecteur en réponse à un traitement anti-tumoral. Le focus a donc été mis sur le développement d'inhibiteurs de l'autophagie pouvant potentiellement être utilisés en clinique par la suite. Les composés utilisés pour inhiber l'autophagie sont présentés dans le Tableau 9.

- *Agents lysomotropiques*

L'inhibiteur classique le plus connu de l'autophagie est la chloroquine ou l'hydroxychloroquine, qui empêchent l'acidification du lysosome et préviennent donc la dégradation du contenu de l'autophagosome, bloquant ainsi le flux autophagique[285]. Cette molécule est utilisée en première intention pour son activité anti-paludique : elle s'accumule dans la vacuole digestive du *Plasmodium*, où elle se fixe à la ferriprotoporphyrine IX, et empêche son élimination. L'accumulation de cette ferriprotoporphyrine IX entraine la mort du parasite[553]. De nombreux essais cliniques combinant la chloroquine à des traitements anti cancéreux ont déjà été menés et sont également en cours.

Malgré son utilisation précoce en thérapie, la chloroquine présente plusieurs problèmes majeurs, freinant son utilisation en clinique : (1) son activité n'est absolument pas spécifique à l'inhibition de l'autophagie : certaines études démontrent que la chloroquine peut avoir des effets sur l'apoptose[554,555] ou sur la vascularisation tumorale[556]. Elle possède également des propriétés immunosuppressives[557,558], la rendant difficile à attribuer à des patients subissant un traitement lourd. (2) La dose à laquelle elle est administrée dans les essais cliniques (10mg/kg/jour) ne permet absolument pas l'inhibition de l'autophagie chez les patients. Pour pouvoir inhiber le flux autophagique, il faudrait monter à des doses d'au moins 50mg/kg/jour de chloroquine[559], ce qui n'est pas tolérable par l'homme. (3) Son habilité à inhiber le flux autophagique est très réduite dans un environnement hypoxique et/ou acide. Or, dans le cas des cancers solides, le centre de la tumeur est pauvre en oxygène et très acide : la capacité de la chloroquine à inhiber l'autophagie y serait donc fortement limitée[560]. (4) La chloroquine présente des propriétés immunosuppressives : l'adjonction de cette drogue avec des traitements lourds, comme de la chimiothérapie par exemple engendreraient une fragilisation supplémentaire du patient[557,558].

Composé	Mécanisme d'induction de l'autophagie
Molécules approuvées par la Food and Drug Administration	
Carbamazépine	Diminue le taux d'inositol et d'inositol (1,4,5) Phosphate
Clonidine	Diminue le taux d'AMPc
Lithium	Diminue le taux d'inositol et d'inositol (1,4,5) Phosphate
Metformine	Active l'AMPK qui phosphoryle Beclin 1 et ULK1
Rapamycine	Inhibe mTORC1
Rilmenidine	Diminue le taux d'AMPc
Valproate de Sodium	Diminue le taux d'inositol et d'inositol (1,4,5) Phosphate
Vérapamil	Diminue le taux de calcium intracellulaire par inhibition des canaux calciques de type L
Trifluopérazine	Inconnu
Statines	Activation de l'AMPK
Inhibiteurs de tyrosines kinases	Inhibe la voie Akt-mTOR, la phosphorylation de Beclin 1 et augmente l'interaction Beclin 1/Parkin
Molécules expérimentales	
BH3-mimétiques	Empêche l'interaction entre Beclin 1 et les membres de la famille de Bcl-2
Compléments alimentaires	
Caféine	Inhibe la voie mTOR
Acides gras poly-insaturés, oméga-3	Inhibe la voie Akt-mTOR, empêche l'interaction Beclin1/Bcl-2
Resvératrol	Active la sirtuine 1
Spermidine	Inhibiteur d'acétylases
Vitamine D	Rôle dans la signalisation du calcium, transcription de gènes de l'autophagie dépendant de hCAP18/LL37
Tréhalose	Inconnu

Tableau 10 : Tableau présentant les molécules couramment utilisées permettant l'induction de l'autophagie *(d'après Levine et al., 2015)*[561]

Ce tableau présente une sélection de molécules permettant l'induction d'autophagie. On peut classer ces molécules en trois groupes : (1) les molécules approuvées par la Food and Drug Administration (FDA), (2) les molécules en cours d'expérimentation et (3) les compléments alimentaires.

Afin d'augmenter l'activité de l'hydroxychloroquine, des équipes se sont intéressées au développement d'analogues de ce composé : c'est ainsi que le Lys05 a été identifié[562]. Les tests précliniques de ce composé semblent donner des résultats prometteurs, et des études plus approfondies sont en cours. D'autres agents lysomotropiques ont aussi été décrits (également présentés sur le Tableau 9). Il faut cependant noter qu'aucun d'entre eux n'est à l'heure actuelle utilisé en clinique.

- *Inhibiteurs de PI3Kinases*

Certains inhibiteurs pan PI3Kinases sont utilisés pour l'inhibition de l'autophagie. On peut notamment citer la 3 methyladenine (3-MA), la wortmannin, et le LY294002, qui inhibent les PI3kinases de classe I et III. Ces inhibiteurs ne sont pas envisageables pour une utilisation clinique dû à leur manque de spécificité, mais aussi du fait de leur faible efficacité (nécessité d'administration de fortes doses ce qui augmente également leurs effets non spécifiques)[552]. De nouveaux inhibiteurs pan PI3Kinases ont depuis été développés : il s'agit du PT210 et du GSK-2126458[563,564], mais leurs effets sur l'inhibition de l'autophagie *in vivo* restent encore à démontrer. Plusieurs études ont permis l'identification de Vps34 comme une bonne cible thérapeutique pour invalider l'autophagie. De nombreux inhibiteurs spécifiques de cette PI3K de classe III ont alors été développés. La spautin-1 (specific and potent inhibitor of autophagy 1) n'influence pas l'activité catalytique de Vps34, mais permet la dissociation des complexes formés par cette protéine[565]. Des études pré-cliniques ont montré que cette molécule permettait la potentialisation des effets de l'Imatinib[566] dans les leucémies myéloïdes chroniques. Deux familles d'inhibiteurs de l'activité catalytique de Vps34 ont également été développées : les pyrimidinones comprenant Sar405 et le composé 31, ainsi que les bisaminopyrimidines telles que Vps34-IN1 et PIK-III (Tableau 9).

- *Inhibiteurs de ULK1*

La protéine ULK1 fait également partie des protéines à cibler préférentiellement pour inhiber le flux autophagique. A l'heure actuelle, trois composés sont disponibles pour inhiber ULK1.

Le SBI-0206965 empêche la phosphorylation de Vps34 par ULK1[567]. Cette molécule présente cependant de nombreux effets non spécifiques, et reste encore à ajuster avant une potentielle utilisation en clinique. Le MRT68921 et le MRT67307, sont deux inhibiteurs compétitifs de l'ATP permettant l'inhibition de l'activité de ULK1 mais également de son homologue ULK2[568]. Le rôle de ces inhibiteurs dans la réponse aux traitements anti-cancéreux doit encore être étudié plus en détail dans des modèles animaux puis en essais cliniques.

b. Activateurs d'autophagie

Bien que le consensus général reste l'inhibition de l'autophagie dans le traitement du cancer, il faut garder en mémoire que dans certains cas, les propriétés cytotoxiques de l'autophagie prennent le dessus. Il est donc nécessaire de disposer de molécules permettant l'induction de l'autophagie. Il a été montré que ces molécules induisent l'autophagie, mais la mort cellulaire par autophagie suite au traitement par ces composés n'a pas été démontrée[569]. On retrouve notamment des inhibiteurs de la voie mTOR comme la rapamycine, des inhibiteurs de tyrosine kinases comme l'imatinib, et aussi d'autres molécules comme des BH3 mimétiques, ou des compléments alimentaires comme la caféine, le resvératrol ou la vitamine D (Tableau 10)[561]. Ces activateurs de l'autophagie sont présentés dans le tableau 11. Il est d'ailleurs intéressant de noter que la rapamycine est une thérapie envisagée dans le traitement des LAGC ALK+, car elle exerce une très forte action antiproliférative sur les cellules tumorales portant l'oncogène ALK[570].

En conclusion, il faut noter que pour une utilisation en clinique de modulateurs de l'autophagie, de nombreuses données sont encore manquantes. Il faut garder à l'esprit que des déficits en autophagie ont été associés à des pathologies humaines sévères et notamment neurodégénératives. Une meilleure compréhension du rôle de l'autophagie aux différentes étapes du développement tumoral et de la réponse au traitement est absolument nécessaire, tout comme le perfectionnement du développement d'inhibiteurs spécifiques de ce processus.

4.2 Outils moléculaires permettant la modulation de l'autophagie

Les microARNs (miRs) sont des outils envisagés dans des stratégies thérapeutiques et notamment dans la détection et le traitement du cancer. Leur expression tissu-spécifique (rôle oncogénique ou tumeur suppresseur) ainsi que leur présence dans différents fluides corporels (urine, salive, sérum) les place comme des candidats idéaux en tant que biomarqueurs du cancer[571]. On peut notamment citer une étude ayant développé un test sanguin basé sur la présence d'une signature de microARNs dans le sérum (« miR-test »), et permettant le diagnostic du cancer du poumon avec une fiabilité de 74.9%[572].

Les miRs peuvent également donner des informations pronostiques, c'est-à-dire qu'ils peuvent être utilisés dans la prévision de la réponse à un traitement. De nombreuses études vont dans ce sens, mais leur validation reste encore nécéssaire[571]. On peut néanmoins citer le cas de miR-224, un marqueur de mauvais pronostique dans le cancer colorectal[573], miR-200a qui au contraire est de bon pronostic dans ce même cancer[574], ou encore miR-155 qui a été associé à une mauvaise réponse au traitement R-CHOP dans des lymphomes B diffus à grandes cellules[575].

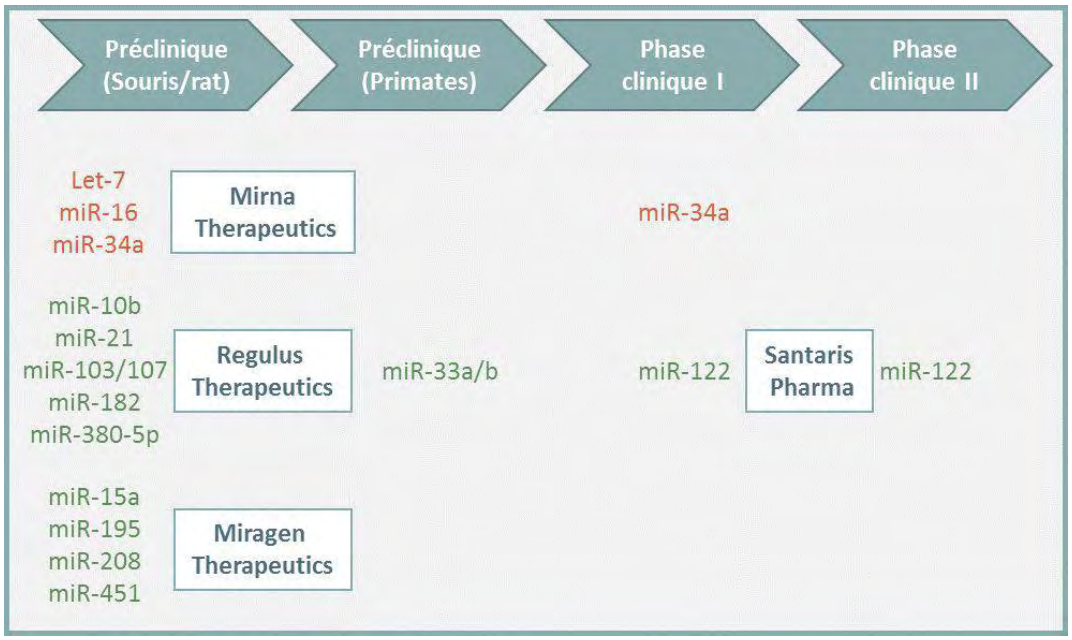


Figure 40 : Applications thérapeutiques et cliniques des microARNs
(adapté de Hydbring et al., 2013)[576]
Les quatre principales entreprises impliquées dans le développement de thérapies à base de microARNs sont présentées sur cette figure. Les microARNs en rouge représentent une thérapie de remplacement, où une molécule mimant le microARN est administrée au patient. Les microARNs en vert représentent les thérapies d'inhibition, où des molécules ciblant le microARN endogène sont administrées.

Comme évoqué dans la partie 4.2 du chapitre 3, les microARNs peuvent réguler l'autophagie à toutes les étapes du processus. Globalement, ils peuvent avoir une fonction d'inhibiteur ou d'activateur du flux autophagique et pourraient donc être des molécules d'avenir dans la modulation thérapeutique du flux autophagique. Enfin certaines études démontrent que les microARNs possèdent un potentiel thérapeutique certain. La thérapie la plus avancée utilisant un miR est le MRX34, un mimétique du miR-34 qui permet de restaurer l'expression de ce miR dans les cellules cancéreuses (Mirna Therapeutics, http://www.mirnarx.com/). D'autres entreprises comme Regulus Therapeutics, Miragen Therapeutics ou Santaris pharma sont intéressées dans le développement de thérapies à base de micoARNs, elles sont présentées en Figure 40. Les microARNs sont connus pour avoir des cibles multiples, participant en général aux mêmes voies de signalisation : cette propriété permettrait à une thérapie à base de microARN, d'être plus efficace qu'une thérapie classique. Cependant, cette propriété renforce également la possibilité d'effets non-spécifiques, c'est pourquoi le choix des microARNs à cibler reste crucial.

OBJECTIFS DE LA THESE

Les données de la littérature indiquent que les Lymphomes Anaplasiques à Grandes Cellules exprimant la tyrosine kinase oncogénique ALK (LAGC ALK+) sont des cancers de bon pronostic, par rapport aux autres lymphomes T périphériques. Cependant, près de 30% des patients rechutent précocement après la première ligne de traitement, et ces rechutes sont agressives. Il faut également noter que cette pathologie touche une population pédiatrique, et que le traitement par chimiothérapie entraine de nombreux effets secondaires à long terme que l'on cherche à éviter. L'utilisation de thérapies permettant l'inhibition de l'activité tyrosine kinase de ALK, comme le crizotinib, commence à se développer en clinique, et permettrait une amélioration certaine des conditions de vie des patients lors du traitement. Cependant, il faut garder à l'esprit que ces traitements ne sont pas optimaux : on constate notamment une reprise de la croissance tumorale dès l'arrêt de la thérapie ciblée. De plus, de nombreux mécanismes de résistance à ces inhibiteurs sont apparus, ce qui a conduit au développement d'inhibiteurs de ALK de nouvelle génération. Pour l'avenir, les cliniciens s'orientent donc vers des thérapies combinant deux ou plusieurs agents, afin de cibler la pathologie sur plusieurs fronts et de réduire les doses des différents agents utilisés. Plusieurs essais cliniques sont actuellement en cours et visent à déterminer l'efficacité de combinaisons comprenant des chimiothérapies (CHOP, vinblastine), des thérapies ciblant ALK (crizotinib, ceritinib), ou d'autres molécules comme l'anticorps anti-CD-30 (brentuximab-vedotin).

En parallèle, de plus en plus d'études ont permis de montrer que l'autophagie était un processus impliqué dans la tumorigenèse, ainsi que dans la réponse au traitement. Dans la littérature, il a été mis en évidence que son rôle pouvait être double car en fonction des conditions dans lesquelles elle est activée, l'autophagie peut favoriser ou freiner la croissance tumorale. Certaines études ont également proposé que le ciblage de l'autophagie par des approches pharmacologies ou moléculaires pourrait permettre de contrer les résistances aux inhibiteurs de tyrosine kinases[577]. Cependant, le rôle de l'autophagie reste ambivalent, et peut basculer de la cytoprotection vers la cytotoxicité : on parle alors de « switch autophagique ».

C'est dans ce contexte que s'inscrivent mes travaux de thèse qui ont eu pour objectifs principaux :

- De déterminer si l'autophagie était activée dans les LAGC ALK+ en réponse à divers traitements (Inhibiteurs de ALK de première et de seconde génération et chimiothérapies)
- De déterminer le rôle de l'autophagie dans les LAGC ALK+ en réponse aux traitements.
- D'étudier les voies permettant la régulation de l'autophagie dans les LAGC ALK+ en se focalisant d'une part sur la voie mTOR et d'autre part sur l'étude des microARNs, dont le microARN miR-7, dans le contrôle du « switch autophagique » sous traitement par le crizotinib.

RESULTATS

PARTIE I : ARTICLE I

L'inhibition de l'autophagie potentialise l'action anti-tumorale du crizotinib dans les LAGC ALK+

1 INTRODUCTION

L'utilisation en clinique du crizotinib, un inhibiteur de la tyrosine kinase ALK, s'est récemment développée et fait désormais partie de la première ligne de traitements des NSCLC ALK+. En Europe, les premiers patients de LAGC ALK+ ont également bénéficié du traitement par cet inhibiteur. Cependant, cette thérapie pose toujours problème, car son arrêt induit une régénération systématique de la croissance tumorale, ce qui entraine la rechute des patients ayant bénéficié de ce traitement.

Au moment où j'ai débuté ma thèse, l'autophagie avait déjà été proposée comme un mécanisme de résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase. Il avait notamment été démontré que l'inhibition de cette voie pouvait potentialiser l'effet anti-tumoral de divers traitements comprenant aussi bien des thérapies ciblées que des chimiothérapies. A l'inverse, d'autres études montraient également que l'autophagie pouvait contribuer à la mort des cellules tumorales, confirmant ainsi l'ambivalence de ce processus qui peut être soit bénéfique, soit néfaste pour les tumeurs.

Ces données de la littérature nous ont conduits à mener une première étude, dont les objectifs étaient :

1. De caractériser l'autophagie en réponse à l'inhibition de ALK dans les LAGC NPM-ALK+
2. De déterminer le rôle de cette réponse autophagique dans les LAGC NPM-ALK+

2 RESULTATS DE L'ETUDE

2.1 Mise en évidence d'une réponse autophagique après l'inhibition de ALK

Le premier objectif de mon travail de thèse a été d'évaluer la réponse autophagique suite à l'inhibition de ALK dans des cellules de LAGC NPM-ALK+ (Karpas-299 et SU-DHL-1), notamment après traitement de ces cellules par le crizotinib, un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase de ALK (ITK).

Pour cela, nous avons tout d'abord observé différents marqueurs de l'autophagie dans les cellules traitées ou non par cet ITK. Nous avons ainsi pu montrer l'augmentation du nombre de vésicules acides en réponse au traitement au crizotinib dans les Karpas-299, de la même façon qu'avec un traitement

à la rapamycine (inhibiteur de mTOR et un inducteur classique de l'autophagie) *(Figure 1a, 1b, 1c, Article I)*. Il est intéressant de noter qu'une inhibition moléculaire de ALK (siRNA dirigé contre ALK) dans la même lignée cellulaire provoque également une augmentation du nombre de ces vésicules acides, ce qui n'est pas le cas dans la lignée FE-PD, une lignée de LAGC n'exprimant pas la protéine ALK (LAGC ALK-).

Afin de vérifier la nature de ces vésicules, nous avons ensuite effectué des observations par microscopie électronique. Celles-ci nous ont permis de visualiser une augmentation du nombre de vésicules autophagiques à la fois initiales (Avi), qui correspondent à des autophagosomes, et de dégradation (Avd) correspondant à des autophagolysosomes *(Figure 1d, 1e, Article I)*. Ces vésicules sont caractérisées par une double membrane ainsi que par la présence de la protéine LC3-II à leur surface. Un marquage par immunohistochimie (IHC) de cette protéine sur des cellules Karpas-299 nous a permis d'observer une distribution « ponctuée » de LC3 (« LC3-puncta ») en réponse au traitement au crizotinib *(Figure 1f, Article I)*. Ce marquage est caractéristique de la relocalisation de LC3 au niveau de la membrane des autophagosomes lors de leur formation. Une analyse quantitative a permis de mettre en évidence une augmentation de l'intensité de ces marquages dans les cellules traitées au crizotinib par rapport aux cellules non traitées. *(Figure S1, Article I).* Enfin, une analyse transcriptomique sur des Karpas-299 nous a permis d'observer une augmentation de l'expression de nombreux gènes impliqués dans les différentes étapes de la machinerie autophagique, tels que ULK1, Vps34, WIPI1 ou encore LC3 *(Figure 1g, Article I)*. Tous ces résultats montrent une augmentation importante de divers marqueurs de l'autophagie lors de l'inhibition de NPM-ALK.

Nous nous sommes ensuite attachés à l'analyse du flux autophagique dans ces mêmes cellules, notamment par la visualisation de la protéine LC3 par western blotting (« LC3 turnover assay »). Ces westerns blots montrent l'accumulation de LC3-II consécutive à l'inhibition de NPM-ALK. Celle-ci est encore plus importante lorsque le flux autophagique est bloqué par de la chloroquine, ce qui démontre donc l'induction du flux autophagique à la fois en réponse au traitement par le crizotinib et lors de l'inhibition moléculaire de NPM-ALK *(Figure 2c, 2d, 2e, Article I)*.

Nous avons également montré que le double traitement de cellules de LAGC NPM-ALK+ par le crizotinib et par un inhibiteur des phases précoces de l'autophagie soit pharmacologique (3-méthyladénine) ou moléculaire (siARN dirigé contre Beclin1) induisait une diminution du nombre de vésicules acides dans la cellule. L'inhibition de NPM-ALK seule, quant à elle, induit l'augmentation du nombre de ces vésicules *(Figure 2a, Article I),* car le flux autophagique n'est pas bloqué dans cette condition. L'ensemble de ces résultats a été reproduit dans une seconde lignée de LAGC NPM-ALK+, les SU-DHL-1 *(Figure S2, Article I)*. Toutes ces observations nous ont permis de conclure que l'inhibition

de NPM-ALK, qu'elle soit moléculaire (siARN dirigé contre ALK) ou pharmacologique (traitement par le crizotinib), entrainait l'induction de flux autophagique dans nos modèles cellulaires de LAGC NPM-ALK+.

2.2 Détermination du rôle de l'autophagie induite en réponse à l'inhibition de NPM-ALK

Une fois ces résultats obtenus nous avons effectué des tests de viabilité cellulaire (tests MTS) en présence et en absence d'un inhibiteur de l'autophagie (chloroquine ou 3-méthyladénine). Ces expériences nous ont permis d'étudier le rôle de l'autophagie induite en réponse au traitement par le crizotinib. Dans les Karpas-299, l'ajout d'un inhibiteur de l'autophagie combiné au traitement par le crizotinib (500nM, 24h), entraine une forte diminution de la viabilité cellulaire. Ainsi, l'inhibition de l'autophagie potentialise les effets cytotoxiques du crizotinib : c'est pourquoi on qualifie l'autophagie de « cytoprotectrice » *(Figure 3, Article I)*. Ces résultats ont été validées par l'inhibition moléculaire de NPM-ALK (par un siARN ciblant ALK) ainsi que de l'autophagie (par un siARN ciblant Atg7) et ont été confirmées par des tests de clonogénicité (croissance en agar mou), qui permettent de visualiser l'impact du traitement, à plus long terme, sur la capacité des cellules à former des colonies et à proliférer *(Figure 4, Article I)*.

D'autre part, nous avons mis en évidence que la diminution de la viabilité cellulaire induite par le double traitement crizotinib (500nM, 48h) et chloroquine (30uM, 48h), était corrélée à une forte augmentation de l'apoptose (test par marquage de l'annexine V) (*Figure S7, Article I*). Grâce à la méthode de calcul développée par les Drs Chou et Talalay[578] et au logiciel Compusyn (http://www.combosyn.com/), nous avons également mis en évidence que l'interaction entre ces deux traitements est de type synergique dans notre modèle car l'effet combiné des deux traitements est supérieur à l'addition des effets de chaque traitement seul *(Figure S5, Article I)*.

Tous ces résultats ont été confirmés dans un modèle de xénogreffe de cellules Karpas-299 dans des souris immunodéprimées (NOD-SCID), où le double traitement par le crizotinib et par un inhibiteur de l'autophagie (la chloroquine) induit une forte inhibition de la croissance tumorale, ainsi qu'une augmentation de l'apoptose mesurée par la détection, en immunohistochimie, de la caspase 3 clivée *(Figure 5, Article I)*.

Ainsi nous avons pu démontrer que l'inhibition de NPM-ALK par le traitement au crizotinib ainsi que par inhibition moléculaire de ALK, permet d'induire de l'autophagie dans nos lignées cellulaires de LAGC NPM-ALK+. L'autophagie joue donc un rôle cytoprotecteur, car son inhibition permet de potentialiser les effets cytotoxiques du crizotinib, notamment par une augmentation de l'apoptose

induite par la thérapie ciblée. Ces résultats ont été publiés dans un article paru en août 2015 dans le journal Oncotarget (inclus ci-dessous).

Targeting autophagy enhances the anti-tumoral action of crizotinib in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma

Géraldine Mitou[1,2,3,*], Julie Frentzel[1,2,3,*], Aurore Desquesnes[4], Sophie Le Gonidec[4,7], Talal AlSaati[5], Isabelle Beau[6], Laurence Lamant[1,2,3,7,8,10], Fabienne Meggetto[1,2,3,10], Estelle Espinos[1,2,3,7,10], Patrice Codogno[9], Pierre Brousset[1,2,3,7,8,10], Sylvie Giuriato[1,2,3,10]

[1]Inserm, UMR1037 CRCT, F-31000 Toulouse, France

[2]Université Toulouse III-Paul Sabatier, UMR1037 CRCT, F-31000 Toulouse, France

[3]CNRS, ERL5294 CRCT, F-31000 Toulouse, France

[4]Phenotyping Service, INSERM-US006 ANEXPLO/CREFRE, Toulouse, France

[5]INSERM/UPS - US006/CREFRE, Service d'Histopathologie, CHU Purpan, Toulouse, France

[6]INSERM UMRS 1185; Faculté de Médecine Paris Sud, Le Kremlin-Bicêtre, France

[7]Université Toulouse III - Paul Sabatier, Toulouse, France

[8]Department of Pathology, IUCT, Toulouse, France

[9]Institut Necker Enfants-Malades, INSERM U1151-CNRS UMR 8253, Paris, France

[10]European Research Initiative on ALK-related malignancies (ERIA)

[*]These authors have contributed equally to this work

Correspondence to:
Sylvie Giuriato, **e-mail:** sylvie.giuriato@inserm.fr

Keywords: *anaplastic large cell lymphoma, NPM-ALK, autophagy, crizotinib, cytoprotection*

Received: *March 02, 2015* ***Accepted:*** *August 07, 2015* ***Published:*** *August 17, 2015*

ABSTRACT

Anaplastic Lymphoma Kinase-positive Anaplastic Large Cell Lymphomas (ALK+ ALCL) occur predominantly in children and young adults. Their treatment, based on aggressive chemotherapy, is not optimal since ALCL patients can still expect a 30% 2-year relapse rate. Tumor relapses are very aggressive and their underlying mechanisms are unknown. Crizotinib is the most advanced ALK tyrosine kinase inhibitor and is already used in clinics to treat ALK-associated cancers. However, crizotinib escape mechanisms have emerged, thus preventing its use in frontline ALCL therapy. The process of autophagy has been proposed as the next target for elimination of the resistance to tyrosine kinase inhibitors. In this study, we investigated whether autophagy is activated in ALCL cells submitted to ALK inactivation (using crizotinib or ALK-targeting siRNA). Classical autophagy read-outs such as autophagosome visualization/quantification by electron microscopy and LC3-B marker turn-over assays were used to demonstrate autophagy induction and flux activation upon ALK inactivation. This was demonstrated to have a cytoprotective role on cell viability and clonogenic assays following combined ALK and autophagy inhibition. Altogether, our results suggest that co-treatment with crizotinib and chloroquine (two drugs already used in clinics) could be beneficial for ALK-positive ALCL patients.

INTRODUCTION

Anaplastic Large Cell Lymphoma (ALCL) is an aggressive form of malignant lymphoma of T/null lineage, which occurs mostly in children and young adults. Two systemic forms of ALCL have been defined according to the presence or absence of aberrant anaplastic lymphoma kinase (ALK) expression [1, 2]. The identification of ALK and its role in the pathogenesis of ALCL were originally described in 1994 by Morris et al. [3]. Since then, it has become increasingly clear that ALK is a prevalent oncogene that is aberrantly expressed in a variety of tumors, including some

B-cell lymphoma (DLBCL), inflammatory myofibroblastic tumors (IMT), some non-small-cell lung cancers (NSCLC), renal carcinoma (RCC), colorectal carcinoma (CRC) and neuroblastoma (NB) [4–6]. In the case of ALCL, ALK is mainly activated as a consequence of a chromosomal translocation whereby the oligomerization domain of the nucleophosmin (NPM) gene is juxtaposed to the kinase domain of ALK. The resultant NPM-ALK fusion protein is constitutively active, and has been described in different cell and mouse models for NPM-ALK tumorigenesis [4, 7–10]. In NSCLC, an inversion event fuses the echinoderm microtubule-associated protein-like 4 (EML4) gene to ALK. Other less represented chromosomal abnormalities involving the ALK gene have also been described both for ALCL and NSCLC [5]. In addition, ALK activation in cancer can also arise through overexpression and mutation of full-length ALK [6].

ALK-expressing tumors are sensitive to treatment with small molecule inhibitors [11–14]. Among these, crizotinib is a potent ATP-competitive inhibitor of ALK and c-Met [15]. It is already used in the clinic for the treatment of late stage and metastatic cases of ALK-positive NSCLC, and promising results have accumulated concerning its use in the treatment of IMT [16, 17] and recurring/refractory ALCL [17, 18]. However, as has been reported for other tyrosine kinase inhibitors, escape mechanisms to overcome the effects of crizotinib have been described in ALK-positive NSCLC and ALCL patients [6, 13, 18–23]. These mainly occur through ALK tyrosine kinase domain punctual mutations, ALK gene amplification and/or activation of compensatory signaling pathways and more than one mechanism can develop simultaneously within the same tumor [13, 24]. Thus, to circumvent resistance, second generation ALK inhibitors (AP26113, LDK 378, ASP3026, CH5424802) have been developed [5], and new combined therapies have also been proposed using a non-ALK-targeting drug alongside an ALK inhibitor [25, 26]. Despite this, our understanding of crizotinib resistance mechanisms at both the cellular and molecular levels needs improvement in order to develop better treatment options. For instance, tumor cell autophagy has been proposed as a new target for overcoming resistance to tyrosine kinase inhibitors [27–30], yet its role in crizotinib-treated ALCL has never been studied.

Autophagy is a highly-conserved catabolic pathway used by the cell to degrade and recycle its own constituents [31]. The autophagy process involves first the formation of an isolation membrane, which elongates and closes in on itself to isolate unwanted cytoplasmic components such as damaged or obsolete organelles and toxic protein aggregates within a double-membraned structure called an autophagosome. Autophagosomes then dock and fuse with lysosomes, where acidic hydrolases degrade the "cargo", therefore assuring a constant cytoplasmic quality control. All of the steps of this process are tightly regulated [32–34].

Malfunctioning autophagy is observed in many human diseases (including neurodegenerative diseases, infectious diseases, heart diseases and diabetes) [35]. In cancer development, autophagy plays a dual role [36–39]. During the initial stages of tumor development it exerts anti-tumoral effects, essentially by removing damaged mitochondria, preventing ROS accumulation, tissue damage, inflammation and genomic instability [40]. Conversely, once the tumor is formed it fuels tumorigenesis by delivering energy in a metabolically stressed environment [41].

Emerging evidence shows that these dual functions of autophagy, in promoting either death or survival mechanisms, are also observed in therapeutically-challenged tumor cells. Indeed, some tumor treatments have been associated with autophagy-mediated oncoprotein degradation [42, 43]. Other compounds have been shown to induce autophagy-mediated cell death [44–46] or autophagy-mediated immunogenic cell death [47]. Conversely, survival autophagy mechanisms have also been observed in different studies upon either chemo-, radio- or targeted therapies [27, 29, 48–50] and inhibiting autophagy in these contexts has been proven to enhance treatment efficiency [51, 52]. Thus, whether to use autophagy inducers or inhibitors to optimize a given cancer treatment is clearly a matter of context [50].

In this study we sought to investigate whether autophagy activation acts as a tumor survival mechanism to overcome ALK oncogene inactivation in ALCL cell lines and whether disabling autophagy may represent a clinical benefit for ALCL patients.

RESULTS

ALK inactivation induces autophagy in ALK-positive ALCL cell lines

To determine whether ALK inactivation induces autophagy, we used flow cytometry to assay the development of acidic vesicular organelles (AVOs), which are indicative of autophagy, using the lysosomo-tropic agent, acridine orange [53]. This compound accumulates in acidic compartments to form aggregates that fluoresce bright red. As a positive control, Karpas-299 cells were treated with rapamycin (100 nM, 24 h), a well-known inducer of autophagy (Figure 1A). We observed that when ALK-positive Karpas-299 (Figure 1A and 1B) or SU-DHL-1 cells (Supplemental Figure S1A and S1B) were submitted to pharmacological or molecular ALK inactivation, through crizotinib treatment or ALK-targeted siRNA transfection respectively, an increase in the red fluorescence (y-axis) was observed. This demonstrates the induction of AVOs following ALK inactivation, from 3.2 to 17.5% upon crizotinib treatment and from 5.4 to 16.7% following NPM-ALK downregulation. We confirmed the loss of NPM-ALK autophosphorylation (data not shown) and the decreased viability of the ALCL cell lines (Supplemental Figure S2A and S2B) following treatment with crizotinib at either 500 nM for Karpas-299

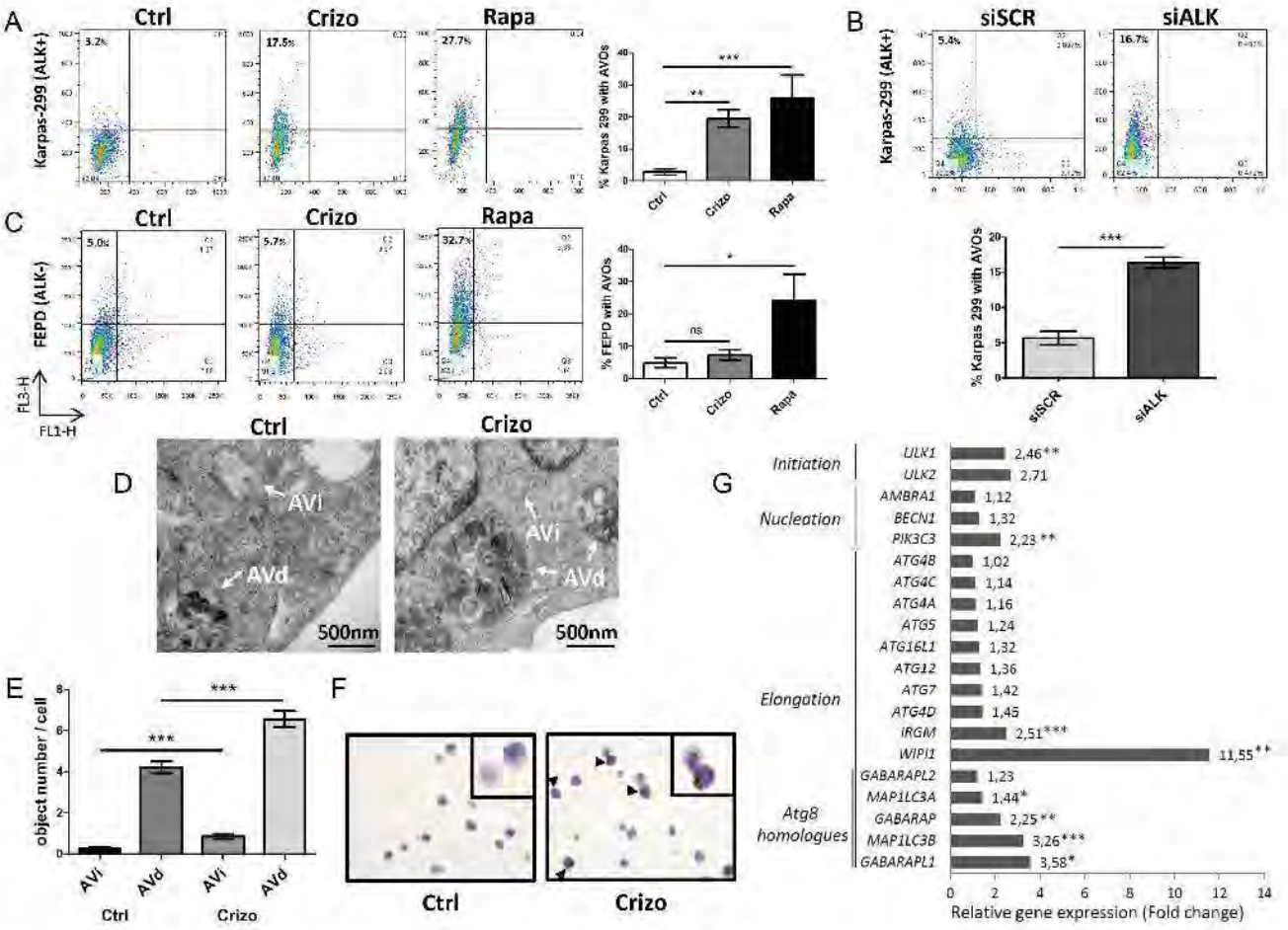


Figure 1: Induction of autophagy upon ALK inactivation in NPM-ALK-positive Karpas-299 ALCL cells. A. Acridine orange flow cytometry staining was performed to detect the formation of acidic vesicular organelles (AVOs) following crizotinib (Crizo) (500 nM, 24 h) or rapamycin (Rapa) (100 nM, 24 h) treatment, compared to control cells (Ctrl). FL1-H indicates green color intensity (cytoplasm and nucleus), while FL3-H shows red color intensity (AVOs). The percentage of AVOs is displayed in the left upper quadrants. Representative flow diagrams are shown. Data on graph represent mean AVOs quantification ± SD from three independent experiments. Statistical analysis was performed by unpaired *t*-tests; $***p \leq 0.001$; $**p \leq 0.01$. **B.** AVOs development and quantification were determined, as indicated in (A), following transfection for 72 h with ALK-targeted siRNA (siALK) or scramble siRNA (siSCR). **C.** AVOs quantification was determined, as indicated in (A), for untreated, crizotinib-treated (500 nM, 24 h) and rapamycin-treated (100 nM, 24 h) ALK-negative FEPD ALCL cells. Mean AVOs percentages are represented ± SD, quantified from three independent experiments. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by the Newman–Keuls multiple comparison test; $***p \leq 0.001$. **D.** Quantification of autophagic vacuoles was performed on around 100 cells from TEM sections prepared from untreated (Ctrl) and crizotinib-treated (Crizo) (500 nM, 24 h) conditions. Characteristic double membrane autophagosomes were counted as initial autophagic vacuoles (AVi) whereas autophagosomes that had fused with vesicles originated from the endo/lysosomal compartment were counted as degradative autophagic vacuoles (AVd). Representative images at x 10,000 magnification are shown. **E.** Data represent mean vesicle number per cell ± SEM. Statistical analysis was performed by an unpaired *t*-test; $***p \leq 0.001$. **F.** LC3 immunohistochemical staining in control (Ctrl) and crizotinib-treated Karpas-299 cells (500 nM, 24 h) (Crizo). Sections were stained with anti-LC3 antibodies, and nuclei were counterstained with hematoxylin. Black arrows denote punctuate LC3 staining. Original images were produced with a leica DM4000B microscope (total magnification: x 400). **G.** Autophagy-related gene expression profile following crizotinib treatment. This selected data set was obtained using SABiosciences autophagy PCR arrays ($n = 3$). Results are expressed as fold change compared to levels measured in untreated Karpas-299 cells (set to 1). Statistical analysis was performed using unpaired *t*-tests; $*p \leq 0.05$; $**p \leq 0.01$; $***p \leq 0.001$.

cells (a concentration which corresponds to the plasmatic dose measured in patients being treated for ALK tumors) or 400 nM for SU-DHL-1 cells, which are more sensitive to the drug [15]. The downregulation of NPM-ALK expression following ALK-targeted siRNA was also checked, and is shown in Supplemental Figure S3A.

To assess the specificity of AVOs induction following ALK inactivation, we used the ALK-negative ALCL cell line, FEPD, treated or not with crizotinib (500 nM, 24 h) or rapamycin (100 nM, 24 h). Rapamycin treatment induced AVOs formation, whereas crizotinib treatment did not (Figure 1C). This strongly argues for a

direct causal relationship between ALK inactivation and AVOs generation in ALK-positive ALCL cell lines.

This observed accumulation of AVOs prompted us to validate that autophagy was induced using other techniques. To this end, we first checked for the presence of autophagosomes by electron microscopy. As shown in Figure 1D and 1E, we observed an increased number of double-membrane autophagosomes (shown by arrows) upon crizotinib treatment in Karpas-299 cells compared to untreated cells. ALK-inhibition increased the number of autophagosomes at both their initial (AVi) and late maturation stages (AVd), as morphologically defined in the Eskelinen review [54]. We then used immunohistochemistry to demonstrate an increased percentage of cells harboring a punctate distribution of the autophagy marker microtubule-associated protein 1 light chain 3 (MAP1LC3) [55], hereafter referred to as LC3, upon crizotinib treatment compared to untreated cells (Figure 1F and Supplemental Table 1). Finally, we investigated whether crizotinib treatment in ALK-positive Karpas-299 cells could have an effect on the expression levels of genes involved in the autophagy initiation and elongation processes. The analysis of a focused autophagy RT-PCR array showed a global increase in the expression of autophagy-related genes upon crizotinib treatment, in comparison with untreated Karpas-299 cells (Figure 1G). Strikingly, the highest significant up-regulations were found for genes that orchestrate the three crucial steps for autophagosome formation: (i) ULK1: involved in initiation, 2.46 fold change, $p < 0.01$; (ii) PIK3C3: involved in nucleation, 2.23 fold change, $p < 0.01$; (iii) MAP1LC3B: involved in elongation/closure, 3.26 fold change, $p < 0.001$; and (iv) WIPI1: involved in elongation/closure, 11.55 fold change, $p < 0.01$. We validated the increased levels of these four mRNAs and some of their encoding proteins in Karpas-299 cells in which ALK inactivation had been achieved through the use of ALK-targeting siRNA (Supplemental Figure S4). Altogether, these observations demonstrate that a loss of ALK activity is able to elicit morphological and molecular signatures specific to the autophagic process.

To further confirm the induction of autophagy and address the question of the activation of autophagic flux in ALK-inactivated Karpas-299 cells, we first performed acridine orange FACS analysis to monitor AVOs generation upon disruption of the autophagy process at an early stage. Vps34 and Beclin1 are two key proteins belonging to the PI3-kinase/Beclin1 complex that is required early on in the activation of autophagy. We used the pharmacological drug 3-methyladenine (3MA) to specifically inhibit Vps34 (a class III PI3-kinase), and an siRNA approach to inactivate Beclin1 (Supplemental Figure S3B) [32, 56]. As shown in Figure 2A and 2B, in both experimental settings we observed a drop in crizotinib-induced AVOs generation, from 18.9 ± 2.6% to 10.2 ± 2.3% upon 3-methyladenine addition ($p \leq 0.001$) and from 13.6 ± 1.5% to 5.3 ± 2.1% upon Beclin1 downregulation ($p \leq 0.01$). Taken together, these results indicate that the crizotinib-induced increase in red fluorescence is attributable to the development of AVOs associated with autophagy. We then analyzed autophagic flux using the LC3 turnover assay [57, 58]. For this, we inhibited ALK in Karpas-299 cells using crizotinib or siALK transfection, combined or not with chloroquine (CQ), a drug known to block autophagy by impairing the lysosomal degradation of the autophagic cargo. We then monitored the conversion of the cytosolic LC3 form (LC3-I, 18kDa) to the pre-autophagosomal and autophagosomal membrane-bound form of LC3 (LC3-II, 16kDa). Levels of LC3-II were higher in cells submitted to chloroquine treatment alongside ALK inactivation (for both crizotinib treatment and ALK-targeted siRNA) than in cells submitted to either treatment alone (Figure 2C and 2D). Furthermore, when we analyzed the kinetics of crizotinib treatment (after 6 h, 24 h and 48 h) in the presence or absence of chloroquine, we observed an accumulation of the LC3-II form over time (Figure 2E). Similarly, a CQ-dependent accumulation of LC3-II was observed in ALK-positive SU-DHL-1 cells treated with crizotinib (400 nM, 24 h) (Supplemental Figure S1C). Overall, these results indicate that ALK inactivation, either through pharmacological (crizotinib) or molecular approaches (ALK-targeted siRNA), induces an increase in the number of autophagosomes and autophagic flux in at least two of the most commonly used ALK-positive ALCL cell lines: Karpas-299 and SU-DHL-1.

Synergistic loss of Karpas-299 cell viability upon pharmacological or molecular inhibition of both the ALK oncogene and the autophagic process

It is now well known that cancer cells that are able to mount an autophagic response under stress conditions are highly sensitive to chloroquine. We thus investigated, *in vitro*, how this drug would impact on ALCL cell viability following co-treatment with crizotinib. As shown in Figure 3A, we observed a decrease in ALK-positive Karpas-299 cell viability, from 63.6 ± 3.1% upon single crizotinib treatment to 41.5 ± 5.4% upon crizotinib and chloroquine co-treatment ($p \leq 0.01$). Similar results were obtained with SU-DHL-1 cells (Supplemental Figure S1D), and when another pharmacological drug targeting autophagy was used, *i.e.* 3-methyladenine (Figure 3B). Increasing concentrations of crizotinib (0–2000 nM), combined with increasing doses of either chloroquine (0–120 μM) or 3-methyladenine (0–10 mM) (Tables 1 and 2) allowed a Chou-Talalay analysis to be performed [59], which demonstrated the synergism (defined by a combination index (CI) < 1) of co-treatment. Indeed, the CI value for crizotinib+chloroquine was between 0.85 and 0.9, indicating a slight synergism between the two drugs, and the CI value of crizotinib+3-methyladenine was between 0.3 and 0.7, showing synergism, as described by Chou (Supplemental Figure S5A and S5B) [60].

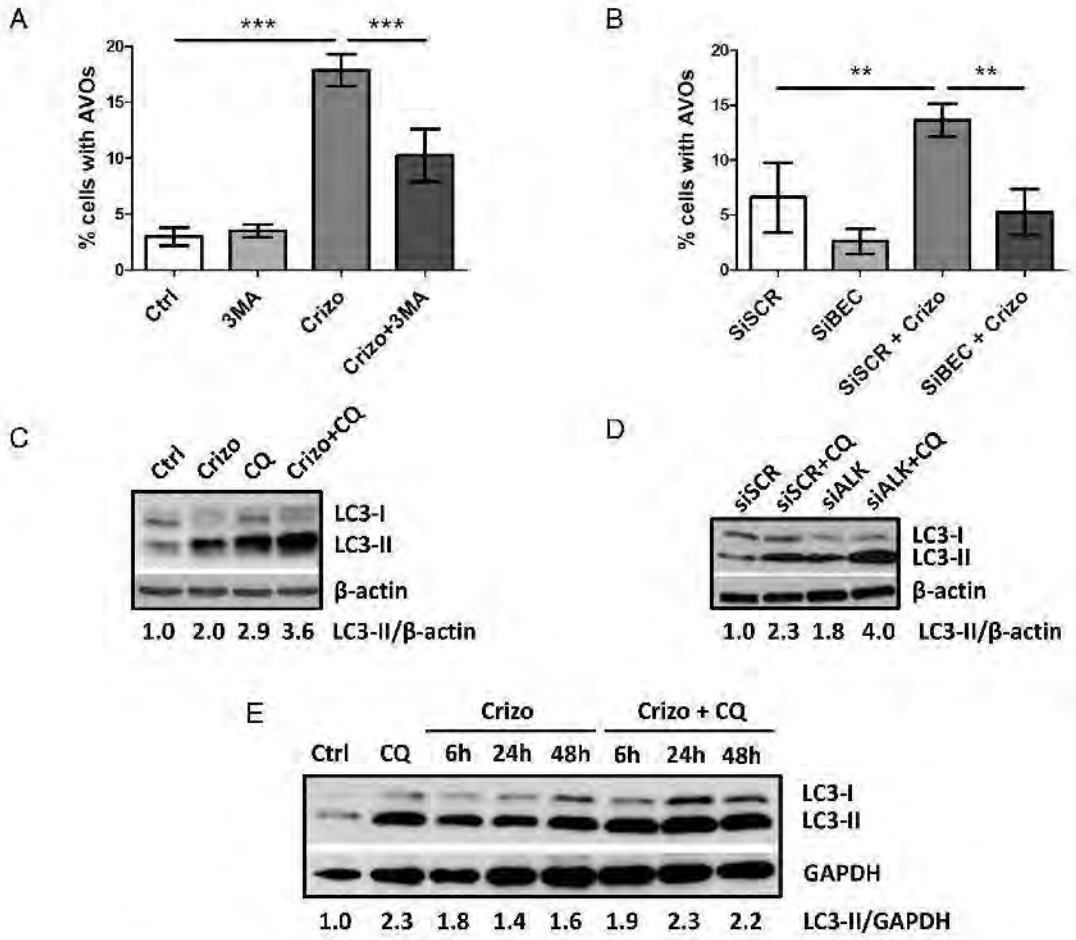


Figure 2: ALK inactivation increases autophagic flux in the Karpas-299 ALCL cell line. A-B. Effect of 3-methyladenine treatment or Beclin1 knockdown on the development of AVOs in crizotinib-treated cells. Karpas-299 cells were treated or not with crizotinib (500 nM, 24 h) (Crizo). 3-methyladenine (3MA) (10 mM) was added or not 4 h before AVOs quantification by acridine orange FACS staining (A). Karpas-299 cells, transfected with either scramble (siSCR) or Beclin-1-targeted siRNAs (siBECN1), were treated or not with crizotinib (500 nM, 24 h). AVOs quantification was performed by acridine orange FACS staining (B). Data are expressed as mean values ± SD quantified from at least three independent experiments. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by a Newman–Keuls multiple comparison test; $^{**}p \leq 0.01$; $^{***}p \leq 0.001$. **C-E.** Autophagic flux was determined in Karpas-299 cells following treatment with crizotinib (500 nM, 24 h) (Crizo) in the presence or absence of chloroquine (CQ) (30 μM, 24 h) (C). Karpas-299 cells were transfected with either scramble (siSCR) or ALK-targeted siRNAs (siALK) for 72 h and with additional treatment or not of 30 μM chloroquine (CQ) for the last 24 h (D). The kinetics of crizotinib treatment (500 nM, 6 h, 24 h and 48 h) (Crizo) was observed in Karpas-299 cells in the presence or absence of chloroquine (CQ) (30 μM, 24 h) (E). Total cell lysates were analyzed by western blotting using antibodies against LC3 and β-actin or GAPDH (as a loading control). Blots from three representative experiments are shown.

Similar results were also observed for ALK-positive SU-DHL-1 cells (Supplemental Figure S1E). Chloroquine and 3-methyladenine can also induce off-target or alternative target effects (besides autophagy inhibition) [61–63], which could have accounted for the reduced cell viability in our MTS assays. Thus, to rule out these potential effects we used siRNA targeting ATG7 to molecularly inhibit the autophagic machinery. ATG7 is a key protein involved in the maturation of the LC3 protein during the autophagosome elongation phase [32, 56]. We first checked the efficiency of ATG7 knockdown (Supplemental Figure S3C) and the effect of this on the conversion of LC3-I to LC3-II. As shown in Supplemental Figure S6, accumulation of the LC3-II form was reduced by 50% in siATG7-transfected Karpas-299 cells, both under basal and crizotinib-treated conditions, in comparison to cells transfected with scramble siRNA (siSCR). It is important to point out that under these conditions we found that ATG7 invalidation alone did not impair cell viability (Figure 3C) or cell growth on agar plates (Figure 4C). However, when combined with crizotinib treatment, it potently inhibited these two cell responses (Figures 3C and 4C). Similar results were observed with ALK-targeted siRNA combined with chloroquine (Figure 3D). Altogether, these results indicate that combined ALK and autophagy inhibition, even using diverse approaches, leads to a reduction in cell viability.

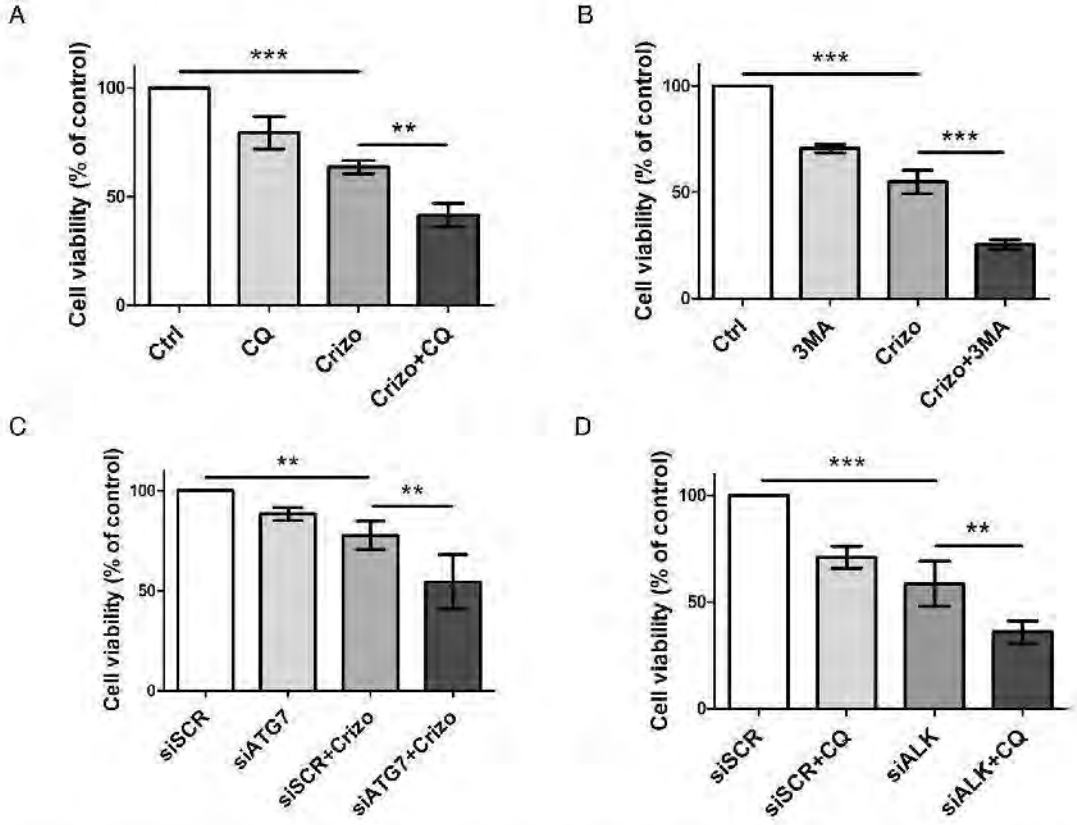


Figure 3: Effect of pharmacological or molecular inhibition of the ALK oncogene combined with inhibition of the autophagic process on Karpas-299 cell viability. A-B. Karpas-299 cells were treated with crizotinib (Crizo) (500 nM) with or without chloroquine (CQ) (30 μM) (A) or 3-methyladenine (3MA) (1.25 mM) (B) for 48 h, then cell viability was determined by MTS assay. C-D. Karpas-299 cells were transfected with either scramble (siSCR) or ATG7-targeted (siATG7) siRNAs (C) or with scramble (siSCR) or ALK-targeted (siALK) siRNAs (D) and treated or not with crizotinib (500 nM) (Crizo) (C) or chloroquine (30 μM) (CQ) (D). Cell viability was determined by MTS assay. The graph represents mean values ± SD from three to four independent experiments. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by the Newman–Keuls multiple comparison test; $^{**}p \leq 0.01$; $^{***}p \leq 0.001$.

Table 1: Viability (%) of Karpas-299 cells after a 48 h treatment with crizotinib and chloroquine alone or in combination

	Crizotinib (nM)					
	0	**125**	**250**	**500**	**1000**	**2000**
Chloroquine (μM)						
0	100	93,88 ± 5,66	80,27 ± 3,31	58,75 ± 9,64	46,07± 17,67	36,03 ± 21,11
7,5	100 ± 5,72	82,52 ± 7,05				
15	96,97 ± 3,83		69,01± 13,08			
30	79,35± 7,36			41,53 ± 5,36		
60	68,56 ± 3,37				20,90 ± 2,96	
120	15,13 ± 5,13					

Karpas-299 cells were treated for 48 h with the indicated concentrations of crizotinib (nM) and chloroquine (μM), either alone or in combination. A constant ratio design was used for combination experiments. Viability was measured by MTS assay. Experiments were done at least in triplicate and were normalized to cells incubated without drug (100%). Data represent the mean values ± SD.

Table 2: Viability (%) of Karpas-299 cells after a 48 h treatment with crizotinib and 3-methyladenine (3MA) alone or in combination

	Crizotinib (nM)					
	0	**125**	**250**	**500**	**1000**	**2000**
3MA (mM)						
0	100	83,65 ± 2,70	69,79 ± 3,38	52,48 ± 4,13	41,43 ± 3,87	37,5 ± 4,33
0,625	82,74 ± 3,17	62,42 ± 6,92				
1,25	71,23 ± 1,63		44,09 ± 3,89			
2,5	51,61 ± 0,38			15,81± 4,46		
5	31,24 ± 1,20				8,15 ± 4	
10	14,33± 3,82					

Karpas-299 cells were treated for 48 h with the indicated concentrations of crizotinib (nM) and 3-methyladenine (mM), either alone or in combination. A constant ratio design was used for combination experiments. Viability was measured by MTS assay. Experiments were done at least in triplicate and were normalized to cells incubated without drug (100%). Data represent the mean values ± SD.

Reduced clonogenic potential and increased apoptosis following combined ALK and autophagy inhibition

The synergistic effect of combined ALK and autophagy inhibition on reducing ALK-positive Karpas-299 and SU-DHL-1 cell viability raised the question of whether this was due to a decrease in cell growth and/or an increase in cell death. To address this point, we first analyzed the ability of Karpas-299 cells to grow in soft agar following treatment with either crizotinib or chloroquine or both drugs in combination (Figure 4A and 4B). To confirm these results, the same experiments were also performed using siRNAs targeting ATG7 to directly impair autophagy (Figure 4C and 4D). We found that the ability of tumor cells to form clones and grow in soft agar was significantly reduced by crizotinib alone but decreased further following combined treatment. To address the question of cell death, we performed annexinV/7-AAD flow cytometry analysis. We found a clear induction of apoptosis upon crizotinib and chloroquine co-treatment when compared to untreated or single treatments, in both ALK-positive Karpas-299 and SU-DHL-1 cells (Supplemental Figure S7A-C and S7B-D, respectively, red quadrants). Of note, necrotic SU-DHL-1 cells were also detected (Supplemental Figure S7B, dark quadrant). Altogether, these results indicate that the reduced viability, soft agar growth capacity, and survival of ALK-positive Karpas-299 cells submitted to a combined ALK and autophagy inhibition strongly relies on the inactivation of a cytoprotective autophagy.

Chloroquine treatment potentiates the growth inhibitory effect of crizotinib on Karpas-299 xenografted tumors

Having shown that autophagy inhibition enhances the anti-tumoral activity of crizotinib in ALCL cell lines *in vitro*, we next investigated the effect of the drug combination on the growth of Karpas-299 tumor grafts *in vivo*. As seen in Figure 5A, mice treated with a combination of crizotinib and chloroquine exhibited a significant decrease in tumor growth compared to untreated mice or mice treated with each drug alone. Overall these findings demonstrate that chloroquine treatment enhances the efficacy of crizotinib *in vivo*, and that the combined therapy, which was well-tolerated in mice, efficiently reduces ALCL tumor growth. We next examined the effects of these drugs on tumor cell necrosis/apoptosis using hematoxylin/eosin (HE) and anti-cleaved caspase 3 (CC3) staining in xenografted tumor tissues (Figure 5C and 5D). As shown in Figure 5C, HE staining reveals that tumor necrotic areas (arrows) were more extensive in tumors submitted to crizotinib and chloroquine co-treatment than in untreated (Ctrl) or individually-treated (Crizo or CQ) tumors, despite the fact that tumors submitted to a combined treatment were smaller than the untreated ones (Figure 5A and 5B). Similar findings were obtained for apoptosis using CC3 staining as an indicator of apoptosis (Figure 5C). Remarkably, a significant increase in CC3 staining was observed in the subcutaneous tumors harvested from animals that had been given the combined treatment compared to the individual treatments (Figure 5D). It should be noted that necrotic regions of the sections were excluded for the quantification of CC3. Altogether, these results suggest that the induction of necrosis/apoptosis could account for the anti-tumoral effects of the crizotinib and chloroquine co-treatment, which corroborates the *in vitro* findings shown in Supplemental Figure S7 and supports a cytoprotective role for autophagy upon crizotinib treatment (Figures 3 and 4). We conclude that crizotinib and chloroquine in combination is highly effective for impairing *in vivo* ALCL tumor growth.

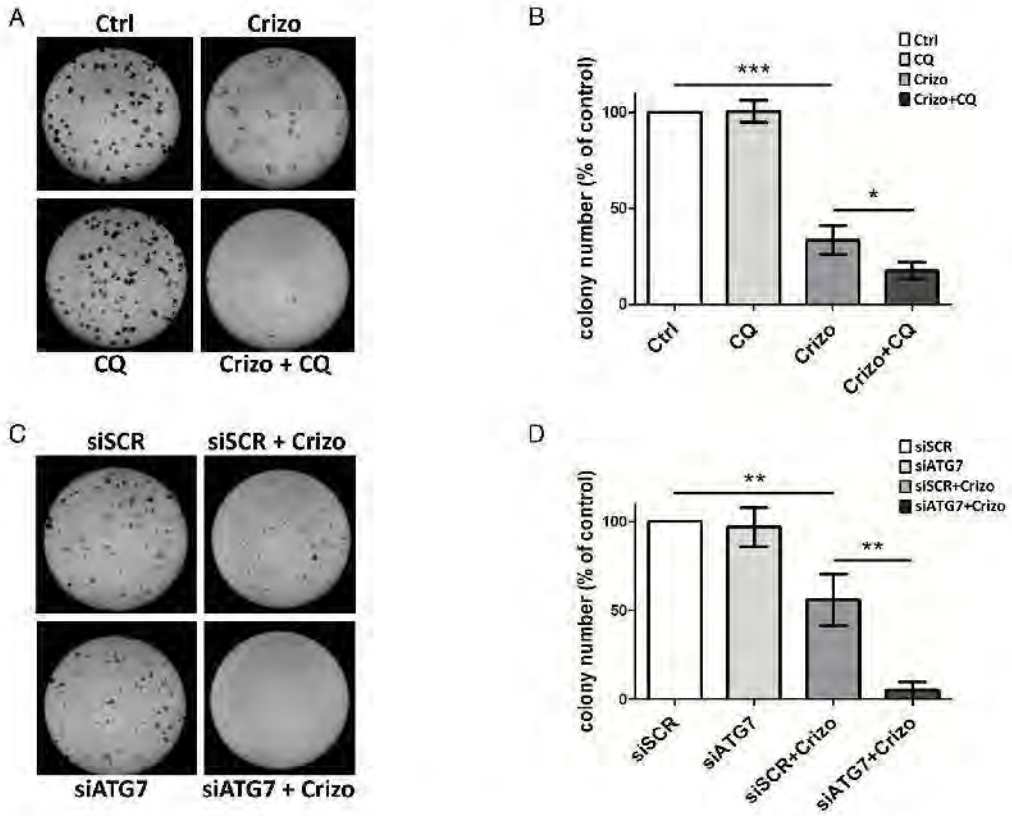


Figure 4: Effect of ALK oncogene inhibition combined with pharmacological or molecular inhibition of the autophagy machinery on Karpas-299 clonogenic survival. A-B. Karpas-299 cells were treated with crizotinib (Crizo) (500 nM) with or without chloroquine (CQ) (30 μM) for 16 h. Cells were then plated onto agar plates. Colonies were detected after 6 days upon addition of the MTT reagent and were scored by Image J quantification software. Representative pictures are shown (A). Results are expressed as the number of colony forming cells per field (B). The graph represents mean values ± SEM from four independent experiments. **C-D.** Karpas-299 cells were transfected with ATG7-targeted (siATG7) or scramble (siSCR) siRNAs then treated or not with crizotinib (Crizo) (500 nM) for 16 h. Cells were then plated onto agar plates. Colonies were detected after 6 days upon addition of the MTT reagent and were scored by Image J quantification software. Representative pictures are shown (C). Results are expressed as the number of colony forming cells per field (D). The graph represents mean values ± SEM from three independent experiments. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by the Newman–Keuls multiple comparison test; $*p \leq 0.05$; $**p \leq 0.01$; $***p \leq 0.001$.

DISCUSSION

In this study, we demonstrate that crizotinib induces autophagy in ALK-positive ALCL cell lines, a result that has never been reported before in this particular subset of lymphoma. Since autophagy inhibition (either by pharmacological inhibition or by an siATG7-mediated approach) potentiates the anti-tumoral activity of ALK inactivation (either by crizotinib treatment or by an siALK-mediated approach), our results indicate that autophagy could act as a survival mechanism in therapeutically-challenged ALK-positive ALCL cells. ALK has previously been linked with autophagy, in glioblastoma and in crizotinib-resistant NSCLC cell lines [64, 65], however in both of these studies the ALK tyrosine kinases (the full length ALK receptor in glioblastoma, and the EML4-ALK fused oncoprotein in NSCLC) were not the direct target of the therapeutic treatment. In the glioblastoma cell lines autophagy was induced following cannabinoid therapy (acting on cannabinoid receptors), and in crizotinib-resistant NSCLC cells, high doses (1 to 8 μM) of crizotinib were used in cells harboring a loss of EML4-ALK. Therefore, another target point of crizotinib in those resistant NSCLC cell lines might be considered. We thus believe this ALCL study to be the very first one to reveal the induction of autophagy upon both pharmacological and molecular NPM-ALK inactivation. Indeed, our *in vitro* results demonstrate that an autophagy response is mounted and activated shortly after either crizotinib treatment (at a plasmatic concentration equivalent to that found in patients being treated for ALK tumors [66, 67]) or after siRNA-mediated specific ALK inhibition in ALCL cells. We observed five complementary results that support an autophagic response following ALK inhibition: 1) increased AVOs; 2) increased number of autophagosomes as identified by electron microscopy;

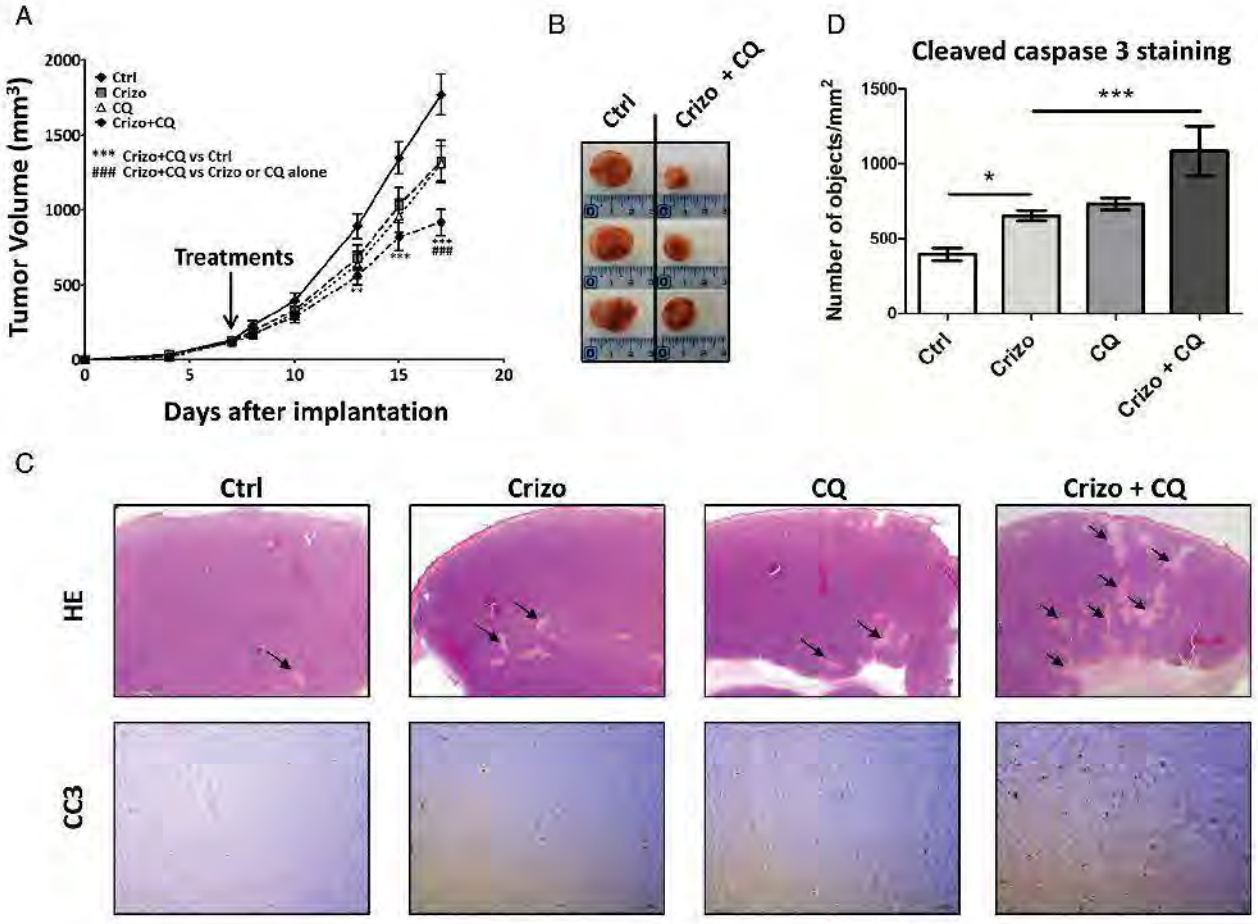


Figure 5: A combination of a low dose of crizotinib plus chloroquine inhibits Karpas-299 xenograft growth in NOD/SCID mice. **A.** Karpas-299 subcutaneous tumors ($n = 8$ for each condition) were allowed to grow and, when measurable (around 100 mm^3), mice were matched for tumor volumes and randomly assigned to receive crizotinib (Crizo, 10 mg/kg), chloroquine (CQ, 60 mg/kg) or a combination of both drugs (Crizo+CQ). Tumor volumes are reported as mean ± S.E.M.. Statistical analysis was performed by two-way ANOVA using the Bonferonni correction; $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$; $^{\#\#\#}p < 0.001$. **B.** Representative tumors resected from mice submitted to either vehicle (Ctrl) or 10 mg/kg crizotinib and 60 mg/kg chloroquine combined treatment (Crizo+CQ). **C.** Micrographs of hematoxylin/eosin (HE) staining (original magnification x 12.5) and anti-cleaved caspase 3 (CC3) immunohistochemistry staining (original magnification x 100). Photographs shown are representative of similar observations in three different control (Ctrl), crizotinib (Crizo), chloroquine (CQ) and crizotinib + chloroquine co-treated tumors (Crizo+CQ), harvested from NOD-SCID mice developing Karpas-299 subcutaneous tumor xenografts. **D.** Active caspase 3 in tumor sections as indicated in (C). Quantifications were performed on scanned immune-stained slides (Pannoramic 250 Flash digital microscope) using a Pannoramic Viewer and HistoQuant software. Segmentation of the detected objects and the calculation of their number per mm^2 were automatically performed. Statistical analyses were performed on individual raw data using one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls multiple comparison test; $^{*}p < 0.05$; $^{***}p < 0.001$. Values are expressed as mean ± S.E.M.

3) increased LC3-II immunohistochemistry staining and relocation to autophagosomal membranes; 4) increased autophagy flux (with LC3-II accumulation observed via western blotting following ALK inactivation and chloroquine co-treatment); 5) increased expression of autophagy genes. To decipher whether this crizotinib-induced autophagy affected cell death or cell survival functions, we performed several assays, testing cell viability, clonogenic survival, apoptosis and the ability of ALCL cells to form xenografted tumors *in vivo*. Together these assays demonstrated the cytoprotective action of autophagy following ALK inactivation in ALCL. Indeed, we found that: 1) upon combined ALK and autophagy pharmacological inhibition (using crizotinib and chloroquine or 3-methyladenine), these drugs had a synergistic (and not just an additive) effect on the reduction of cell viability; 2) the molecular inactivation of autophagy using siRNA directed against ATG7 did not induce, *per se*, a loss in cell viability, as was recently highlighted by D.A. Gewirtz [68]. It is noteworthy that a potentiating effect of autophagy and ALK co-inhibition was still observed following ATG7 downregulation; 3) ALK inactivation combined with autophagy inhibition drove cells towards apoptotic/necrotic cell death;

4) combined crizotinib and chloroquine treatment strongly reduced ALK-positive Karpas-299 clonogenic survival, unequivocally proving that autophagy harbors cytoprotective functions [68], and impaired xenograft tumor growth.

Altogether, these results strongly suggest that a combination of ALK and autophagy inhibition could be beneficial for the treatment of ALK-dependent ALCL, a therapeutic combination that has never been considered before. ALK-positive ALCL patients are currently treated with aggressive chemotherapy (cyclophosphamide, hydroxydoxorubicin, oncovin and prednisone (CHOP)). The use of crizotinib for ALK-positive ALCL is currently under debate. A good response to crizotinib has been reported in a few adult patients with recurring ALK-positive ALCL, as well as in one phase 1 clinical trials [17, 69, 70]. Furthermore, a recent clinical study using crizotinib as a monotherapy was performed on eleven adult ALCL patients who were resistant/refractory to cytotoxic therapy [18]. Their results, showing that crizotinib exerted a potent antitumor activity with durable responses and a benign safety profile, encourage the future use of crizotinib as a front line therapy. However, ALK mutations conferring resistance to crizotinib have been identified in relapsed patients. Thus, in light of our new data we propose that crizotinib-induced autophagy, through its cytoprotective function, could allow some cells to escape the targeted therapy and survive in a dormant state, as proposed by White and DiPaola [36] and as demonstrated in models of ovarian carcinoma and gastrointestinal stromal tumors (GIST) [29, 71–73]. This dormant state may be used by tumor cells to develop and acquire resistance to crizotinib, allowing subsequent tumor recurrence. Thus, in line with previous studies on imatinib-treated CML or GIST, showing that autophagy inhibition may represent a new strategy to enhance sensitivity to tyrosine kinase inhibitors, our current work supports the concept that crizotinib resistance and subsequent ALCL tumor relapse might be prevented or diminished by blocking autophagy. Nevertheless, before considering autophagy inhibition in ALCL patient therapeutic protocols, further clinical and fundamental investigations are needed to demonstrate that cytoprotective autophagy does indeed occur in human tumors upon crizotinib treatment and to provide a better understanding of how crizotinib mechanistically triggers autophagy induction. A possible mechanism could be inhibition of the mTOR pathway, which is known to be a negative regulator of autophagy [74], and which is reported to be activated downstream of NPM-ALK [75, 76]. Further studies on hydroxychloroquine (or new improved autophagy inhibitors) are also essential to determine the dose, frequency and treatment duration that should be used in patients to achieve autophagy inhibition [52, 77, 78]. Finally, besides ALK-dependent ALCL, this study should motivate further investigation into the effects of modulating autophagy in other ALK-related malignancies that harbor either different ALK fusions or overexpressed/activated full length ALK oncogenes.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and cell culture conditions

Karpas-299 and SU-DHL-1 ALK-positive ALCL cell lines bearing the t(2;5)(p23;q35) translocation were obtained from DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Culture, Braunschweig, Germany). The FEPD ALK-negative cell line was a gift from Dr. K. Pulford (Oxford University, Oxford, UK). Cells were cultured in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) supplemented with 20% Foetal Calf Serum (FCS), 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, and 100 U/ml penicillin/streptomycin (all from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) at 37°C with 5% CO_2 and were maintained in exponential growth phase. This medium is hereafter referred to as "complete IMDM".

Chemicals

Crizotinib (Xalkori) was synthesized and purchased at @rtMolecule (Poitiers, France). Chloroquine (Aralen) (#C6628), 3-methyladenine (#M9281) and acridine orange (#318337) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). Stock solutions of crizotinib, chloroquine, acridine orange and 3-methyladenine were prepared in phosphate buffered saline (PBS).

Small interfering RNA (siRNA) transfections

SiRNA transfections were performed by electroporation using Gene Pulser Xcell Electroporation Systems (Biorad) (Hercules, CA, USA). Briefly 5.10^6 cells were electroporated at 950 µF to 250 V in 400 µl IMDM medium with 50 nM Beclin-1 siRNA, 100 nM ATG7 siRNA or 100 nM ALK siRNA from a 100 µmol/l stock solution or with the same quantity of a negative control siRNA (Eurogentec) (Seraing, Liège, Belgium). SiRNA sequences used were 5′-CAGUUUGGCACAAUCAAUATT-3′ for Beclin-1, 5′-GGAGUCACAGCUCUUCCUUTT-3′ for ATG7 and 5′-GGGCGAGCUACUAUAGAAATT–3′ for ALK. Following shock, cells were rapidly resuspended in 5 ml IMDM supplemented with 20% FCS. They were subsequently used for protein extraction, flow cytometry and viability/proliferation assays.

Detection of acidic vesicular organelles (AVOs) with acridine orange

AVOs were quantified by flow cytometry. ALK-positive (Karpas-299 and SU-DHL-1) and negative

(FEPD) cells (10^5 cells), were treated or not for 24 h with crizotinib (500 nM and 400 nM, respectively), in the presence or absence of 10 mM 3-methyladenine (3MA) (added 4 h prior to harvesting the cells), or were transfected with scramble siRNA or Beclin-1 siRNA. They were then stained for 17 min with acridine orange (AO), at a final concentration of 1 μg/ml. Cells were washed twice in PBS, then resuspended in 0.3 ml PBS and analyzed on a FACSCalibur from Beckton Dickinson, (NJ, USA) using FlowJo software.

Electron microscopy

Karpas-299 cells, treated or not for 24 h with 500 nM crizotinib, were collected, washed twice with PBS and fixed in 2% glutaraldehyde in 0.1 M Sorensen phosphate buffer (pH 7.4) for 4 h at 4°C. Cell pellets were then embedded in low melting point agarose to obtain solid blocks. These were washed overnight in 0.2 M phosphate buffer then post-fixed for 1 h at room temperature with 1% osmium tetroxide in 250 mM saccharose and 0.05 M phosphate buffer. Samples were then dehydrated in a series of graded ethanol solutions, followed by propylene oxide, and embedded in an Epon resin (Embed 812, Electron Microscopy Sciences (Hatfield, PA, USA)). Ultrathin sections (70 nm) were prepared (Ultracut Reichert Jung (Vienna, Austria)) and observed with a transmission Hitachi HT7700 electron microscope (TKY, Japan) at an accelerating voltage of 80 kV.

Immunohistochemistry

Sections from formalin-fixed and paraffin-embedded xenografted tumors were stained with hematoxylin and eosin. Immunohistochemical analysis was performed using antibodies directed against LC3b (Nanotools (Teningen, Allemagne) #0231–100; mouse mAb; clone 5F10; 1/100) and cleaved caspase 3 (R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) #AF835; polyclonal rabbit Ab; 1/500). Karpas-299 cells, treated or not with 500 nM crizotinib for 24 h, were included in low melting agarose and then formalin-fixed and paraffin-embedded. Sections were immunostained with antibodies directed against LC3b (Nanotools) and nuclei were counterstained with hematoxylin. Antibody binding was detected with the streptavidin-biotin-peroxidase complex method (Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)). Pictures were taken using either a Leica DM4000B microscope (Wetzlar, Germany) or a Pannoramic 250 device (3DHISTECH) (Budapest, Hungary).

Autophagy RT-PCR array

Karpas-299 cells were treated or not for 24 h with 500 nM crizotinib, then washed once with PBS and harvested. Frozen cell pellets were sent to SABiosciences (Hilden, Germany), where both the RNA extraction and the Human Autophagy RT^2 Profiler PCR array were performed to study the expression profile of 84 key genes involved in autophagy. Amplification data (fold changes in C_t values of all the genes) were analyzed by the $\Delta\Delta C_t$ method. Data were normalized to controls (PBS-treated cells), assigned as 1.

qPCR

Briefly, 1 μg total RNA was reverse transcribed in 20 μl using the Superscript II reverse transcription kit (Invitrogen) and random hexamers (Roche), according to the manufacturer's protocol. Reverse Transcription (RT) reactions were diluted 10 fold prior to qPCR. Amplification was performed in a total volume of 10 μl containing 5 μl of a SYBR Premix Ex TaqTM (Tli RNaseH plus), Bulk master mix (Takara), 1 μl forward and reverse primers (final concentration of 300 nM each), and 2 μl diluted cDNA. The forward and reverse primers were, respectively: CCTCGCCAAGTCTCAGACGC/CCCCACCGTTGCAGTACTCC for ULK1, GAGCGCCTCTTCTCCAGCAG/CAGCCTTTGCCGGTTCAGCC for WIPI1, AAGCAGCGCCGCACCTTCGA/CGCTGACCATGCTGTGTCCG for MAP1LC3B, GGGAAGCCTTTGGCCTTGCC/CCACTTGGGCATTCCTGGGC for PIK3C3, and CAACGACCACTTTGTCAAGCT/CTCTCTTCCTCTTGTGCTCTTGC for GAPDH. Q-PCR cycling conditions were performed according to the manufacturer's protocol, using the StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems). Results were analysed with the StepOne software.

Western blotting

Cells were lyzed in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (20 mM Tris HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 4 mM EDTA, 1% Triton X-100, and 0.2% SDS) supplemented with phosphatase inhibitors (1 mM Na_3VO_4, 1 mM NaF) and 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), purchased from Sigma-Aldrich, and protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science) (Penzberg, Upper Bavaria, Germany). Protein lysates were fractionated on SDS-PAGE (10 or 15%), and transferred to a nitrocellulose membrane (Whatman) (GE Healthcare, Little Chalfont, England). Western-blotting was performed using LC3-B (Sigma-Aldrich #L7543), ATG7 (Cell Signaling Technology #2631), Beclin-1 (Cell Signaling Technology #3738), ALK (D5F3 XP, Cell Signaling Technology #3633), ULK1 (Cell Signaling Technology #4773), GAPDH (Millipore MAB374) and β-actin (Santa Cruz #7210) antibodies. Proteins were visualized using the Chemiluminescent Peroxidase Substrate-3

Kit (Sigma-Aldrich) or the ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (Amersham Biosciences) (Buckingshire, UK).

Cell viability assay and multiple drug effect analysis

Karpas-299 and SU-DHL-1 cells were counted and seeded in 96-well plates (10,000 cells/well, in 100 µl IMDM/20% FBS). Cells were incubated at 37°C in the presence of either increasing concentrations of crizotinib (0 to 2000 nM) or were transfected by siRNA targeting ALK; and either chloroquine (0 to 120 µM), 3-methyladenine (0.625 to 10 mM) or siRNA targeting ATG7, alone or in combination. Combination experiments were carried out at constant ratios. After 48 h, cell viability was assessed using the CellTiter 96 AQueous One Solution cell proliferation assay (Promega) (Fitchburg, Wisconsin USA). Drug combination analyses were performed following the median-effect method using the CompuSyn software (ComboSyn, Inc., Paramus, NJ, USA) [59]. Briefly, drug interactions were determined by calculating the Combination Index (CI). In this method, synergy is defined by a CI values < 1, an additive effect by CI = 1, and antagonism is defined by CI > 1. The results are shown on the Fa-CI plot where Fa represents the fraction affected by the drug tested.

Soft-agar colony formation assay

Karpas-299 cells were treated with 500 nM crizotinib and/or 30 µM chloroquine or were transfected with Atg7siRNA or scramble siRNA and allowed to recover for 8 h before treatment with 500 nM crizotinib. After 16 h, 20,000 Karpas-299 cells from each condition were resuspended in complete IMDM containing 0.33% agar onto the top of an agar underlay (complete IMDM containing 0.5% agar). Cells were fed twice a week with 400 µl complete IMDM containing the appropriate drug. After 7 days, viable cells were stained for 2 h with complete IMDM containing 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (0.5 mg/ml). Four different fields were then scored from each plate and colony numbers were counted using Image J quantification software (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Experiments were carried out in triplicate.

Apoptosis measurement

Analysis of apoptosis was done using annexin V (AnnexinV-PE) and 7-amino-actinomycin (7-AAD) (BD Bioscience #559763) staining according to standard protocols, followed by flow cytometry using a FACSCalibur cytometer from Beckton Dickinson. Results were analyzed using FlowJo software.

Murine xenograft model

Mice were housed under specific pathogen-free conditions in an animal room at a constant temperature (20–22°C), with a 12 h/12 h light/dark cycle and free access to food and water. All animal procedures were performed following the principle guidelines of INSERM, and our protocol was approved by the Midi-Pyrénées Ethics Committee on Animal Experimentation. A total of 4.10^6 Karpas-299 cells were injected subcutaneously into both flanks of 6-week old female non-obese diabetic-severe combined immunodeficient (NOD-SCID) mice (Janvier Labs) (Laval, France). Mouse body weight and tumor volumes were measured three times a week (once a day at the end of the experiment) with calipers, using the formula "length × width^2 × $\pi/6$". Mice (4 per group) were treated 5 times per week (monday through friday) once the tumor volume reached 100 mm^3. Mice received crizotinib (10 mg/kg) or H_2O orally, and chloroquine (60 mg/kg) or PBS by intraperitoneal injection. At the end of the experiment, mice were humanely sacrificed. Subcutaneous tumors and adjacent inguinal lymph nodes were harvested and sections were fixed in 10% neutral buffered formalin for immunohistochemical analysis.

Active cleaved caspase 3-positive cell quantification

Immunohistochemical-stained slides were digitized using a Pannoramic 250 Flash digital microscope (P250 Flash, 3DHISTECH). Whole slides were scanned using brightfield scan mode with a 20X/NA0.80 Zeiss Plan-Apochromat dry objective (Zeiss) (Oberkochen, Germany), and images were acquired with a two megapixel 3CCD color camera (CIS Cam Ref #VCC-FC60FR19CL, CIS Americas Inc., Tokyo, Japan), achieving a 0.39 µm/pixel resolution. Pannoramic Viewer and HistoQuant software were used for viewing and analyzing the digital slides, respectively (RTM 1.15.3, 3DHISTECH). A minimum of 8 annotations per slide covering 50% of the entire tissue were analyzed using the same profile with the following characteristics: noise reduction (median filter strength = 0), object definition (HSV: 137 < Hue < 226, 26 < Saturation < 189, 17 < Value < 41), no filtering by size and no object separation. These settings allowed the automatic segmentation of the detected objects and the measurement of the number of detected objects per mm^2.

Statistical analyses

Results are presented as mean values ± standard deviations (SD) from at least 3 independent experiments unless otherwise indicated. Determination of statistical significance was performed using the Student's *t*-test

for side by side comparison of two conditions. Welsch's correction was applied when variances were significantly different. For the experiments comparing more than two conditions, determination of statistical significance was performed using one-way ANOVA followed by a Newman-Keuls multiple comparison test. Xenografted tumor growths were expressed as the mean ± S.E.M.. Statistical analyses were performed using the two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni test using GraphPad Prism 5 software (GraphPad software) (La Jolla, CA, USA). For all tests, *p*-values less than 0.05 (*), 0.01 (**) or 0.001 (***) were considered statistically significant.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr Carine Joffre, Dr Stéphane Manenti, Dr Christian Touriol and Camille Daugrois at the UMR1037, CRCT, for critical reading and helpful discussions; Dr Etienne Chatelut at the IUCT Oncopole, for pharmacological advice; Fatima L'Faqihi and Valérie Dupan at the flow cytometry facility of INSERM UMR1043, Toulouse; Florence Capilla and Christine Salon at the histology facility of INSERM/UPS-US006/CREFRE; Manon Farcé at the flow cytometry facility at the UMR1037, CRCT; Isabelle Fourquaux and Bruno Payré at the "Centre de Microscopie Electronique Appliquée à la Biologie" (CMEAB), Université Paul Sabatier, Toulouse; and Jeannine Boyes at the UMR1037, CRCT, for their excellent technical assistance. S.G. dedicates this work to the memory of Mme Louise Attali-Guedj.

FUNDING

This work was supported by funding from the National Research Agency-Young Researcher (ANR-JCJC) (R12004BB), the French local league against cancer (R12020BB) and the Fondation ARC (R15002BB), awarded to S.G.; and fellowships from ANR to G.M. and from the French league against cancer (LNCC) to J.F.. This work was supported by the Institut Universitaire de France (IUF) and the LABEX TOUCAN.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

Authorship contributions

G.M. and J.F. designed and performed experiments, analyzed data and contributed to writing the manuscript. S.L.G. helped design and performed experiments, analyzed data and contributed to writing the manuscript. A.D. and T.A. performed experiments and analyzed data. L.L., F.M., E.E. and P.B. participated in discussions. I.B. and P.C. helped design experiments and contributed to writing the manuscript. S.G. designed and performed experiments, analyzed data and wrote the manuscript.

REFERENCES

1. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. Blood. 2011; 117:5019–32.
2. Delsol G. The WHO lymphoma classification. Ann Pathol. 2008; 28:S20–4.
3. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, Look AT. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. Science (80-.). 1994; 263:1281–4.
4. Chiarle R, Voena C, Ambrogio C, Piva R, Inghirami G. The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. Nat Rev Cancer. 2008; 8:11–23.
5. Gorczynski A, Prelowska M, Adam P, Czapiewski P, Biernat W. ALK-positive cancer: still a growing entity. Futur. Oncol. 2014; 10:305–21.
6. Hallberg B, Palmer RH. Mechanistic insight into ALK receptor tyrosine kinase in human cancer biology. Nat Rev Cancer. 2013; 13:685–700.
7. Giuriato S, Foisseau M, Dejean E, Felsher DW, Al Saati T, Demur C, Ragab A, Kruczynski A, Schiff C, Delsol G, Meggetto F. Conditional TPM3-ALK and NPM-ALK transgenic mice develop reversible ALK-positive early B-cell lymphoma/leukemia. Blood. 2010; 115:4061–70.
8. Turner SD, Alexander DR. What have we learnt from mouse models of NPM-ALK-induced lymphomagenesis? Leukemia. 2005; 19:1128–34.
9. Giuriato S, Turner SD. Twenty years of modelling NPM-ALK-induced lymphomagenesis. Front Biosci (Schol Ed). 2015; 7:236–47.
10. Tabbo F, Barreca A, Piva R, Inghirami G. ALK Signaling and Target Therapy in Anaplastic Large Cell Lymphoma. Front Oncol. 2012; 2:41.
11. Cheng M, Quail MR, Gingrich DE, Ott GR, Lu L, Wan W, Albom MS, Angeles TS, Aimone LD, Cristofani F, Machiorlatti R, Abele C, Ator MA, et al. CEP-28122, a highly potent and selective orally active inhibitor of anaplastic lymphoma kinase with antitumor activity in experimental models of human cancers. Mol Cancer Ther. 2012; 11:670–9.
12. George SK, Vishwamitra D, Manshouri R, Shi P, Amin HM. The ALK inhibitor ASP3026 eradicates NPM-ALK(+) T-cell anaplastic large-cell lymphoma *in vitro* and in a systemic xenograft lymphoma model. Oncotarget. 2014; 5:5750–63.

13. Kruczynski A, Delsol G, Laurent C, Brousset P, Lamant L. Anaplastic lymphoma kinase as a therapeutic target. Expert Opin Ther Targets. 2012; 16:1127–38.

14. Marzec M, Kasprzycka M, Ptasznik A, Wlodarski P, Zhang Q, Odum N, Wasik MA. Inhibition of ALK enzymatic activity in T-cell lymphoma cells induces apoptosis and suppresses proliferation and STAT3 phosphorylation independently of Jak3. Lab Invest. 2005; 85:1544–54.

15. Christensen JG, Zou HY, Arango ME, Li Q, Lee JH, McDonnell SR, Yamazaki S, Alton GR, Mroczkowski B, Los G. Cytoreductive antitumor activity of PF-2341066, a novel inhibitor of anaplastic lymphoma kinase and c-Met, in experimental models of anaplastic large-cell lymphoma. Mol Cancer Ther. 2007; 6:3314–22.

16. Butrynski JE, D'Adamo DR, Hornick JL, Dal Cin P, Antonescu CR, Jhanwar SC, Ladanyi M, Capelletti M, Rodig SJ, Ramaiya N, Kwak EL, Clark JW, Wilner KD, et al. Crizotinib in ALK-rearranged inflammatory myofibroblastic tumor. N Engl J Med. 2010; 363:1727–33.

17. Mosse YP, Lim MS, Voss SD, Wilner K, Ruffner K, Laliberte J, Rolland D, Balis FM, Maris JM, Weigel BJ, Ingle AM, Ahern C, Adamson PC, et al. Safety and activity of crizotinib for paediatric patients with refractory solid tumours or anaplastic large-cell lymphoma: a Children's Oncology Group phase 1 consortium study. Lancet Oncol. 2013; 14:472–80.

18. Gambacorti Passerini C, Farina F, Stasia A, Redaelli S, Ceccon M, Mologni L, Messa C, Guerra L, Giudici G, Sala E, Mussolin L, Deeren D, King MH, et al. Crizotinib in advanced, chemoresistant anaplastic lymphoma kinase-positive lymphoma patients. J Natl Cancer Inst. 2014; 106:djt378.

19. Choi YL, Soda M, Yamashita Y, Ueno T, Takashima J, Nakajima T, Yatabe Y, Takeuchi K, Hamada T, Haruta H, Ishikawa Y, Kimura H, Mitsudomi T, et al. EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. N Engl J Med. 2010; 363:1734–9.

20. Doebele RC, Pilling AB, Aisner DL, Kutateladze TG, Le AT, Weickhardt AJ, Kondo KL, Linderman DJ, Heasley LE, Franklin WA, Varella-Garcia M, Camidge DR. Mechanisms of resistance to crizotinib in patients with ALK gene rearranged non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res. 2012; 18:1472–82.

21. Katayama R, Shaw AT, Khan TM, Mino-Kenudson M, Solomon BJ, Halmos B, Jessop NA, Wain JC, Yeo AT, Benes C, Drew L, Saeh JC, Crosby K, et al. Mechanisms of acquired crizotinib resistance in ALK-rearranged lung Cancers. Sci Transl Med. 2012; 4:120ra17.

22. Sasaki T, Koivunen J, Ogino A, Yanagita M, Nikiforow S, Zheng W, Lathan C, Marcoux JP, Du J, Okuda K, Capelletti M, Shimamura T, Ercan D, et al. A novel ALK secondary mutation and EGFR signaling cause resistance to ALK kinase inhibitors. Cancer Res. 2011; 71:6051–60.

23. Laimer D, Dolznig H, Kollmann K, Vesely PW, Schlederer M, Merkel O, Schiefer AI, Hassler MR, Heider S, Amenitsch L, Thallinger C, Staber PB, Simonitsch-Klupp I, et al. PDGFR blockade is a rational and effective therapy for NPM-ALK-driven lymphomas. Nat Med. 2012; 18:1699–704.

24. Voena C, Chiarle R. The battle against ALK resistance: successes and setbacks. Expert Opin Investig Drugs. 2012; 21:1751–4.

25. Foyil K V, Kennedy DA, Grove LE, Bartlett NL, Cashen AF. Extended retreatment with brentuximab vedotin (SGN-35) maintains complete remission in patient with recurrent systemic anaplastic large-cell lymphoma. Leuk Lymphoma. 2012; 53:506–7.

26. Sequist L V, Gettinger S, Senzer NN, Martins RG, Janne PA, Lilenbaum R, Gray JE, Iafrate AJ, Katayama R, Hafeez N, Sweeney J, Walker JR, Fritz C, et al. Activity of IPI-504, a novel heat-shock protein 90 inhibitor, in patients with molecularly defined non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol. 2010; 28:4953–60.

27. Bellodi C, Lidonnici MR, Hamilton A, Helgason G V, Soliera AR, Ronchetti M, Galavotti S, Young KW, Selmi T, Yacobi R, Van Etten RA, Donato N, Hunter A, et al. Targeting autophagy potentiates tyrosine kinase inhibitor-induced cell death in Philadelphia chromosome-positive cells, including primary CML stem cells. J Clin Invest. 2009; 119:1109–23.

28. Calabretta B, Salomoni P. Inhibition of autophagy: a new strategy to enhance sensitivity of chronic myeloid leukemia stem cells to tyrosine kinase inhibitors. Leuk Lymphoma. 2011; 52:54–9.

29. Gupta A, Roy S, Lazar AJ, Wang WL, McAuliffe JC, Reynoso D, McMahon J, Taguchi T, Floris G, Debiec-Rychter M, Schoffski P, Trent JA, Debnath J, et al. Autophagy inhibition and antimalarials promote cell death in gastrointestinal stromal tumor (GIST). Proc Natl Acad Sci U S A. 2010; 107:14333–8.

30. Mishima Y, Terui Y, Mishima Y, Taniyama A, Kuniyoshi R, Takizawa T, Kimura S, Ozawa K, Hatake K. Autophagy and autophagic cell death are next targets for elimination of the resistance to tyrosine kinase inhibitors. Cancer Sci. 2008; 99:2200–8.

31. Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. Dev Cell. 2004; 6:463–77.

32. Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. Annu Rev Cell Dev Biol. 2011; 27:107–32.

33. Rubinsztein DC, Shpilka T, Elazar Z. Mechanisms of autophagosome biogenesis. Curr Biol. 2012; 22:R29–34.

34. Lamb CA, Yoshimori T, Tooze SA. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. Nat Rev Mol Cell Biol. 2013; 14:759–74.

35. Beau I, Mehrpour M, Codogno P. Autophagosomes and human diseases. Int J Biochem Cell Biol. 2011; 43:460–4.

36. White E, DiPaola RS. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. Clin Cancer Res. 2009; 15:5308–16.

37. Rosenfeldt MT, Ryan KM. The role of autophagy in tumour development and cancer therapy. Expert Rev Mol Med. 2009; 11:e36.

38. Lorin S, Hamai A, Mehrpour M, Codogno P. Autophagy regulation and its role in cancer. Semin Cancer Biol. 2013; 23:361–79.

39. Galluzzi L, Pietrocola F, Bravo-San Pedro JM, Amaravadi RK, Baehrecke EH, Cecconi F, Codogno P, Debnath J, Gewirtz DA, Karantza V, Kimmelman A, Kumar S, Levine B, et al. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. EMBO, J. 2015; 23:34:856–80.

40. Mathew R, Kongara S, Beaudoin B, Karp CM, Bray K, Degenhardt K, Chen G, Jin S, White E. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. Genes Dev. 2007; 21:1367–81.

41. Jin S, White E. Role of autophagy in cancer: management of metabolic stress. Autophagy. 2007; 3:28–31.

42. Isakson P, Bjoras M, Boe SO, Simonsen A. Autophagy contributes to therapy-induced degradation of the PML/RARA oncoprotein. Blood. 2010; 116:2324–31.

43. Goussetis DJ, Gounaris E, Wu EJ, Vakana E, Sharma B, Bogyo M, Altman JK, Platanias LC. Autophagic degradation of the BCR-ABL oncoprotein and generation of antileukemic responses by arsenic trioxide. Blood. 2012; 120:3555–62.

44. Grander D, Kharaziha P, Laane E, Pokrovskaja K, Panaretakis T. Autophagy as the main means of cytotoxicity by glucocorticoids in hematological malignancies. Autophagy. 2009; 5:1198–200.

45. Puissant A, Robert G, Fenouille N, Luciano F, Cassuto JP, Raynaud S, Auberger P. Resveratrol promotes autophagic cell death in chronic myelogenous leukemia cells via JNK-mediated p62/SQSTM1 expression and AMPK activation. Cancer Res. 2010; 70:1042–52.

46. Salazar M, Carracedo A, Salanueva IJ, Hernandez-Tiedra S, Lorente M, Egia A, Vazquez P, Blazquez C, Torres S, Garcia S, Nowak J, Fimia GM, Piacentini M, et al. Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells. J Clin Invest. 2009; 119:1359–72.

47. Michaud M, Martins I, Sukkurwala AQ, Adjemian S, Ma Y, Pellegatti P, Shen S, Kepp O, Scoazec M, Mignot G, Rello-Varona S, Tailler M, Menger L, et al. Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. Science. 2011; 334:1573–7.

48. Lomonaco SL, Finniss S, Xiang C, Decarvalho A, Umansky F, Kalkanis SN, Mikkelsen T, Brodie C. The induction of autophagy by gamma-radiation contributes to the radioresistance of glioma stem cells. Int J Cancer. 2009; 125:717–22.

49. Torgersen ML, Engedal N, Boe SO, Hokland P, Simonsen A. Targeting autophagy potentiates the apoptotic effect of histone deacetylase inhibitors in t(8;21) AML cells. Blood. 2013; 122:2467–76.

50. White E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. Nat Rev Cancer. 2012; 12:401–10.

51. Levy JM, Thorburn A. Targeting autophagy during cancer therapy to improve clinical outcomes. Pharmacol Ther. 2011; 131:130–41.

52. Mancias JD, Kimmelman AC. Targeting autophagy addiction in cancer. Oncotarget. 2011; 2:1302–6.

53. Paglin S, Hollister T, Delohery T, Hackett N, McMahill M, Sphicas E, Domingo D, Yahalom J. A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. Cancer Res. 2001; 61:439–44.

54. Eskelinen EL. Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. Autophagy. 2005; 1:1–10.

55. Ladoire S, Chaba K, Martins I, Sukkurwala AQ, Adjemian S, Michaud M, Poirier-Colame V, Andreiuolo F, Galluzzi L, White E, Rosenfeldt M, Ryan KM, Zitvogel L, et al. Immunohistochemical detection of cytoplasmic LC3 puncta in human cancer specimens. Autophagy. 2012; 8:1175–84.

56. Yang Z, Klionsky DJ. An overview of the molecular mechanism of autophagy. Curr Top Microbiol Immunol. 2009; 335:1–32.

57. Tanida I, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T, Kominami E. Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. Autophagy. 2005; 1:84–91.

58. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. Cell. 2010; 140:313–26.

59. Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. Adv Enzym. Regul. 1984; 22:27–55.

60. Chou TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. Pharmacol Rev. 2006; 58:621–81.

61. Wu YT, Tan HL, Shui G, Bauvy C, Huang Q, Wenk MR, Ong CN, Codogno P, Shen HM. Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. J. Biol. Chem. 2010; 285:10850–61.

62. Maycotte P, Aryal S, Cummings CT, Thorburn J, Morgan MJ, Thorburn A. Chloroquine sensitizes breast cancer cells to chemotherapy independent of autophagy. Autophagy. 2012; 8:200–12.

63. Maes H, Kuchnio A, Peric A, Moens S, Nys K, De Bock K, Quaegebeur A, Schoors S, Georgiadou M, Wouters J, Vinckier S, Vankelecom H, Garmyn M, et al. Tumor vessel normalization by chloroquine independent of autophagy. Cancer Cell. 2014; 26:190–206.

64. Lorente M, Torres S, Salazar M, Carracedo A, Hernandez-Tiedra S, Rodriguez-Fornes F, Garcia-Taboada E, Melendez B, Mollejo M, Campos-Martin Y,

Lakatosh SA, Barcia J, Guzman M, et al. Stimulation of the midkine/ALK axis renders glioma cells resistant to cannabinoid antitumoral action. Cell Death Differ. 2011; 18:959–73.

65. Ji C, Zhang L, Cheng Y, Patel R, Wu H, Zhang Y, Wang M, Ji S, Belani CP, Yang JM, Ren X. Induction of autophagy contributes to crizotinib resistance in ALK-positive lung cancer. Cancer Biol Ther. 2014; 15:570–7.

66. Lovly CM, Heuckmann JM, de Stanchina E, Chen H, Thomas RK, Liang C, Pao W. Insights into ALK-driven cancers revealed through development of novel ALK tyrosine kinase inhibitors. Cancer Res. 2011; 71:4920–31.

67. Sang J, Acquaviva J, Friedland JC, Smith DL, Sequeira M, Zhang C, Jiang Q, Xue L, Lovly CM, Jimenez JP, Shaw AT, Doebele RC, He S, et al. Targeted inhibition of the molecular chaperone Hsp90 overcomes ALK inhibitor resistance in non-small cell lung cancer. Cancer Discov. 2013; 3:430–43.

68. Gewirtz DA. When cytoprotective autophagy isn't... and even when it is. Autophagy. 2014; 10:391–2.

69. Foyil K V, Bartlett NL. Brentuximab vedotin and crizotinib in anaplastic large-cell lymphoma. Cancer J. 2012; 18:450–6.

70. Gambacorti-Passerini C, Messa C, Pogliani EM. Crizotinib in anaplastic large-cell lymphoma. N Engl J Med. 2010; 364:775–6.

71. Lu Z, Luo RZ, Lu Y, Zhang X, Yu Q, Khare S, Kondo S, Kondo Y, Yu Y, Mills GB, Liao WS, Bast RC Jr. The tumor suppressor gene ARHI regulates autophagy and tumor dormancy in human ovarian cancer cells. J Clin Invest. 2008; 118:3917–29.

72. Rubin BP, Debnath J. Therapeutic implications of autophagy-mediated cell survival in gastrointestinal stromal tumor after treatment with imatinib mesylate. Autophagy. 2010; 6:1190–1.

73. Sosa MS, Bragado P, Debnath J, Aguirre-Ghiso JA. Regulation of tumor cell dormancy by tissue microenvironments and autophagy. Adv Exp Med Biol. 2013; 734:73–89.

74. Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM, Kim DH. mTOR regulation of autophagy. FEBS Lett. 2010; 584:1287–95.

75. Vega F, Medeiros LJ, Leventaki V, Atwell C, Cho-Vega JH, Tian L, Claret FX, Rassidakis GZ. Activation of mammalian target of rapamycin signaling pathway contributes to tumor cell survival in anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large cell lymphoma. Cancer Res. 2006; 66:6589–97.

76. Marzec M, Kasprzycka M, Liu X, El-Salem M, Halasa K, Raghunath PN, Bucki R, Wlodarski P, Wasik MA. Oncogenic tyrosine kinase NPM/ALK induces activation of the rapamycin-sensitive mTOR signaling pathway. Oncogene. 2007; 26:5606–14.

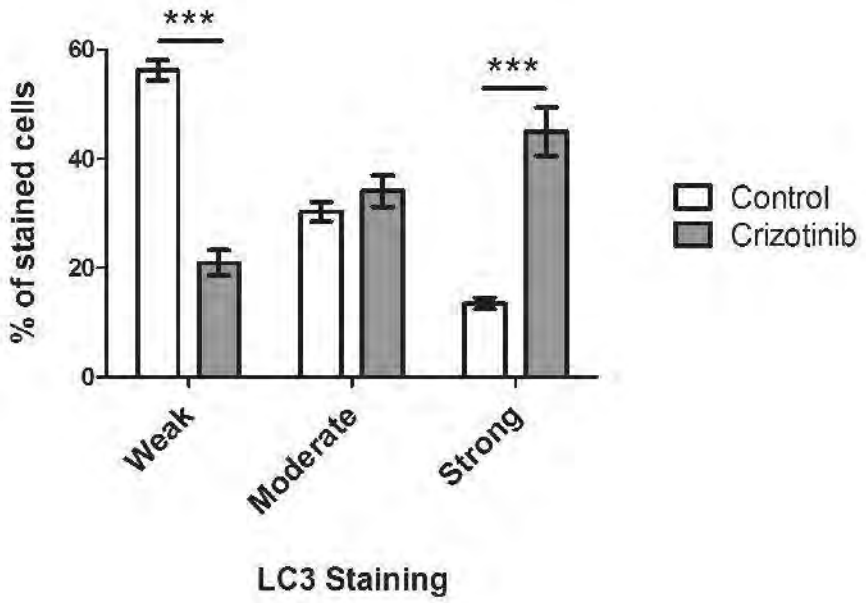
77. Poklepovic A, Gewirtz DA. Outcome of early clinical trials of the combination of hydroxychloroquine with chemotherapy in cancer. Autophagy. 2014; 10.

78. Garber K. Inducing indigestion: companies embrace autophagy inhibitors. J Natl Cancer Inst. 2011; 103:708–10.

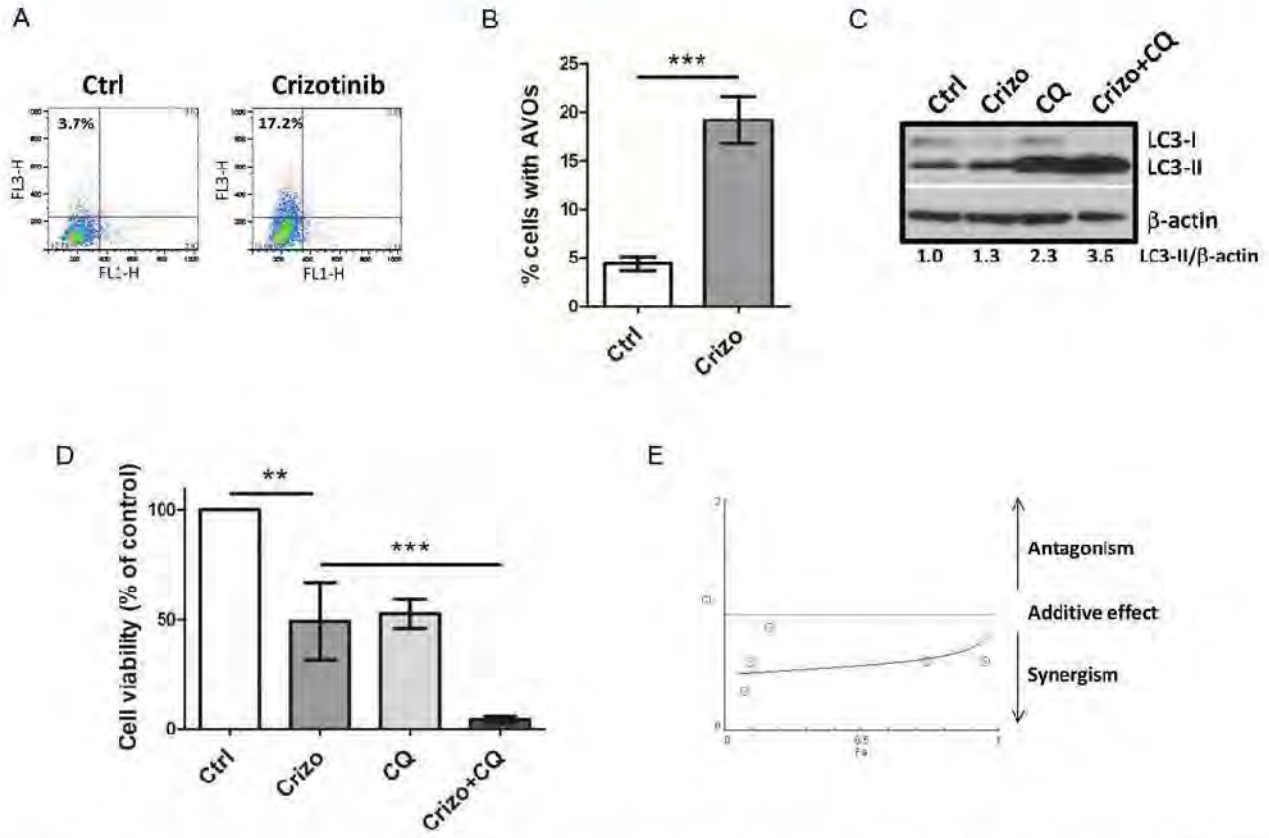
SUPPLEMENTAL TABLES AND FIGURES

Supplementary Table S1: Increased LC3 immunostaining upon crizotinib treatment

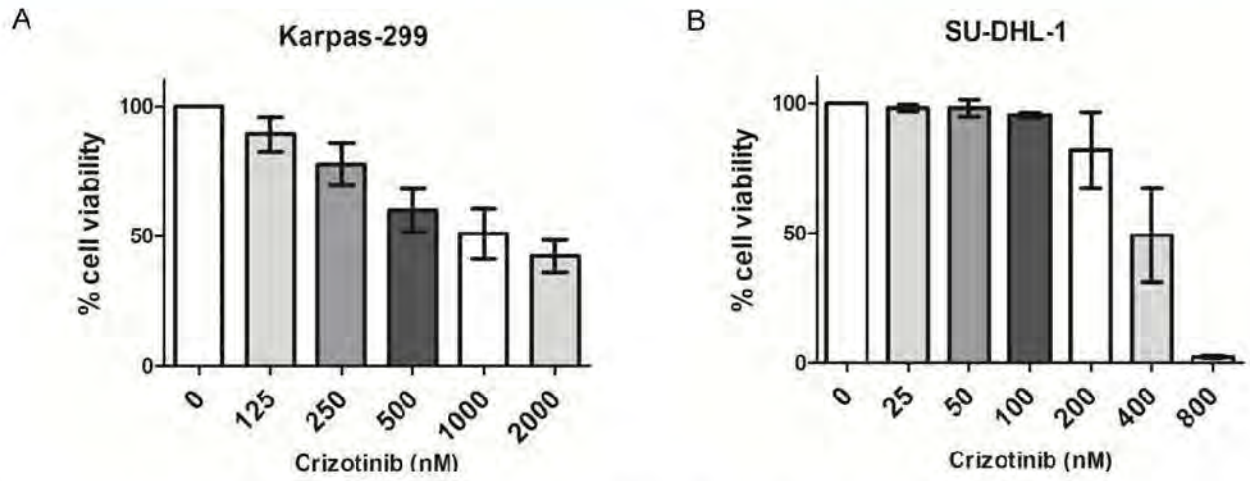
	Control			Crizotinib		
	Weak (%)	Moderate (%)	Strong (%)	Weak (%)	Moderate (%)	Strong (%)
Exp 1	57.6	28.3	14.1	18.6	31.4	50.0
Exp 2	56.8	30.9	12.3	20.9	37.2	41.9
Exp 3	54.1	31.8	14.1	23.3	33.7	43.0



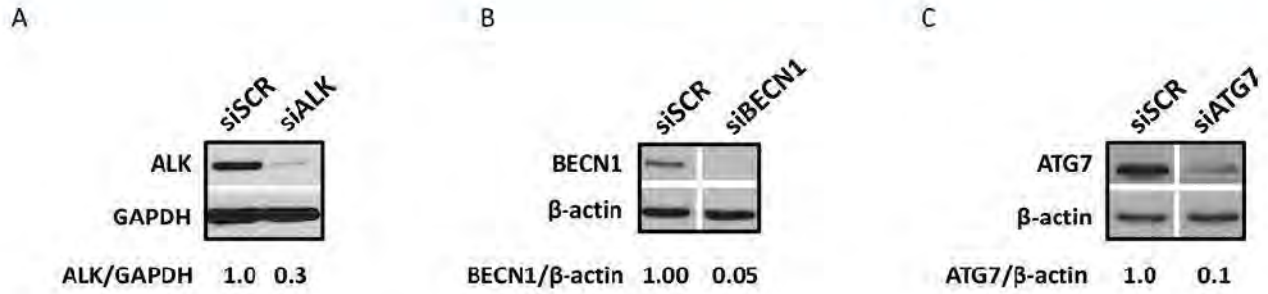
Immunohistochemical staining for LC3 was performed on crizotinib-treated (500 nM, 24 h) or untreated Karpas-299 cells (Control). Cells were counted and classified into three groups depending on the intensity of the staining. Within an observed cell, a weak signal corresponded to a diffuse staining, whereas a strong one corresponded to distinct LC3 puncta, indicative of autophagosome formation. The classification was performed on a total of approximately 100 cells, and by three different people. Mean values are shown in the graph below the table. Statistical analysis was performed by unpaired *t*-tests; ***$p \leq 0.001$.



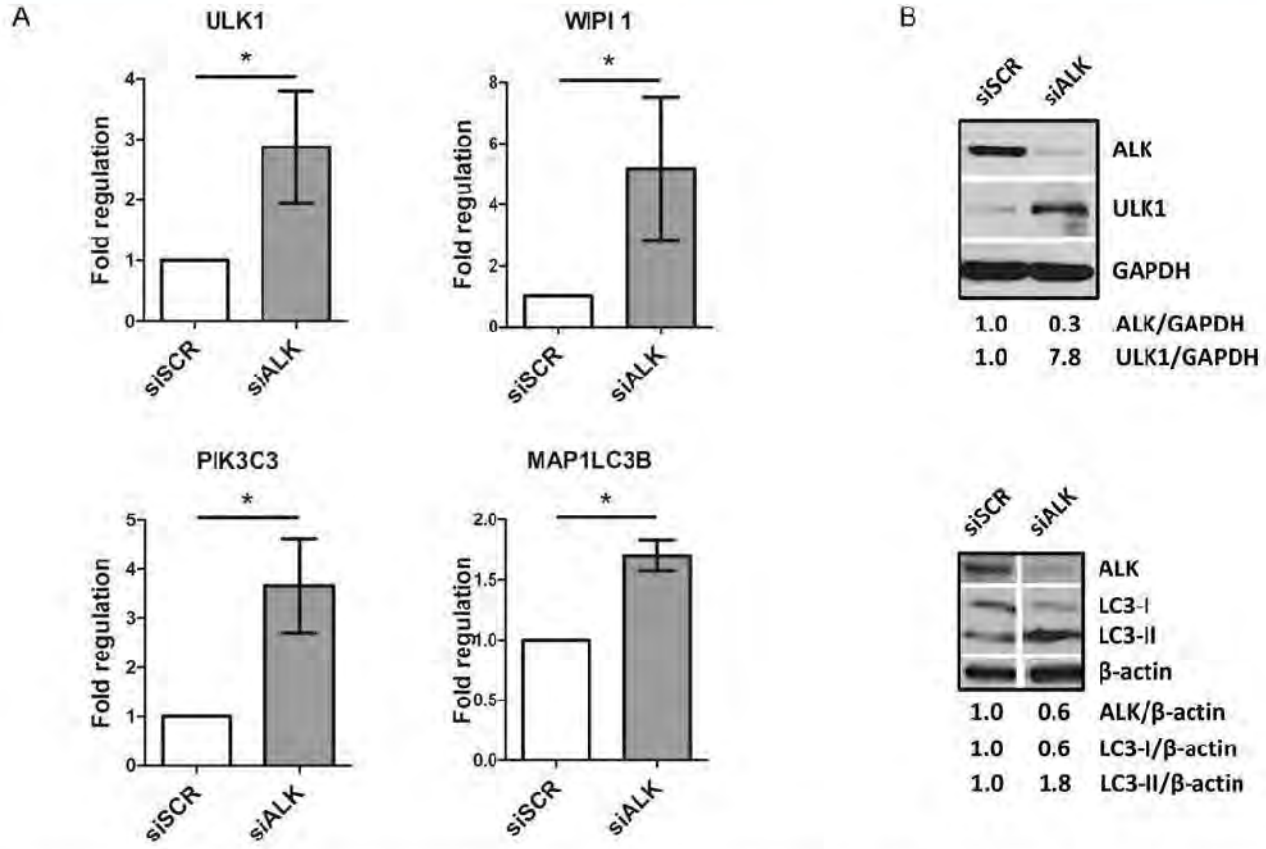
Supplementary Figure S1: Induction of cytoprotective autophagy in the SU-DHL-1 ALCL cell line by crizotinib. A. The formation of acidic vesicular organelles (AVOs) was determined upon crizotinib treatment (400 nM, 24 h) by the detection of red fluorescence in acridine orange-stained cells using flow cytometry analysis. The percentage of AVOs (left upper quadrants) is indicated. FL1-H indicates green color intensity (cytoplasm and nucleus), while FL3-H shows red color intensity (AVOs). Representative flow diagrams are shown. **B.** The development of AVOs (as indicated in (A)) was quantified by acridine orange FACS staining. The graph represents the mean values of three independent experiments ± SD. Statistical analysis was performed by unpaired *t*-tests; $***p \leq 0.001$. **C.** Autophagic flux was determined in SU-DHL-1 cells by treatment with crizotinib (400 nM, 24 h) (Crizo) in the presence or absence of chloroquine (30 μM, 24 h) (CQ). Total cell lysates were analyzed by western blotting using antibodies against LC3 and β-actin. Blots from one representative experiment are shown. The relative levels of LC3-II were normalized to β-actin. **D.** SU-DHL-1 cells were treated or not with crizotinib (400 nM) (Crizo) with or without chloroquine (30 μM) (CQ) for 48 h, then cell viability was determined by MTS assay. The graph represents the mean values of three independent experiments carried out in triplicate ± SD. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by the Newman–Keuls multiple comparison test; $**p \leq 0.01$; $***p \leq 0.001$. **E.** Cell viability data were analyzed and combination indexes (CI) were calculated using the CompuSyn software (ComboSyn, Inc., Paramus, NJ) for the determination of synergy. The results are shown on the Fa-CI plot where Fa represents the fraction affected by the drug tested. CI < 1 indicates synergism; CI = 1 indicates an additive effect, and CI > 1 indicates antagonism.



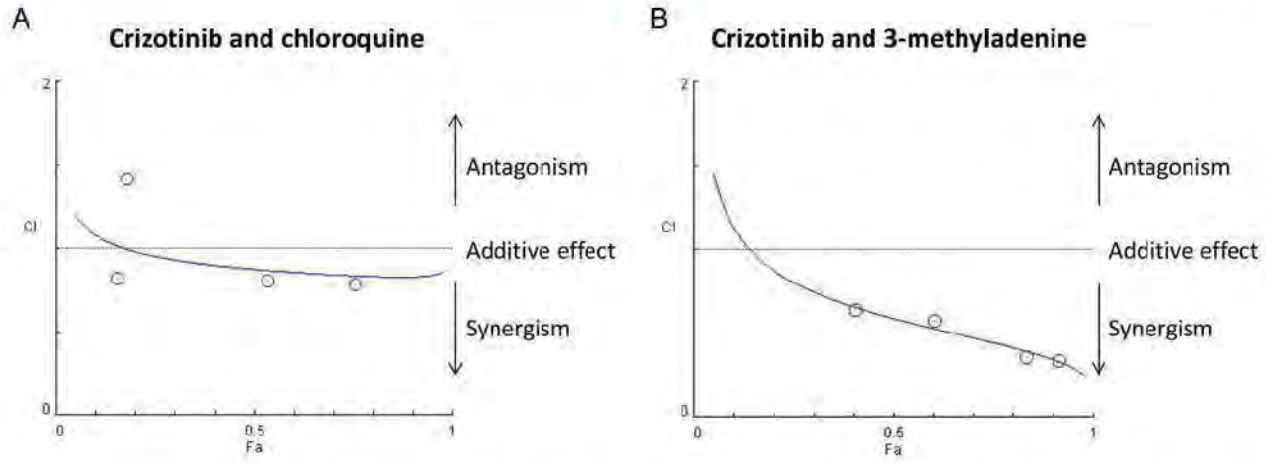
Supplementary Figure S2: Effect of crizotinib on Karpas-299 and SU-DHL-1 cell viability. **A-B.** Karpas-299 (A) and SU-DHL-1 (B) cells were treated for 48 h with the indicated concentrations of crizotinib (nM). Cell viability was measured by MTS assay. Experiments were done at least in triplicate and results were normalized to cells incubated without drug (100%). Data represent the mean values ± SD.



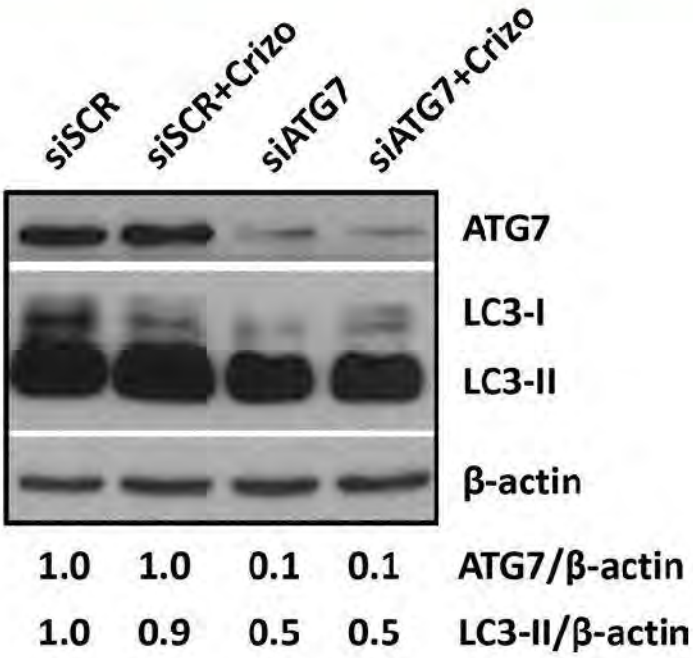
Supplementary Figure S3: Protein knockdown after siRNA transfection. A-C. Karpas-299 cells were transfected with scramble siRNA (SCR) or siRNA targeting *ALK* (A), *Beclin*-1 (BECN1) (B) or *ATG7* (C) for 72 h, 48 h and 72 h, respectively. The expression levels of ALK, Beclin-1 and ATG7 were then analyzed by western-blot. GAPDH or β-actin were used as loading controls.



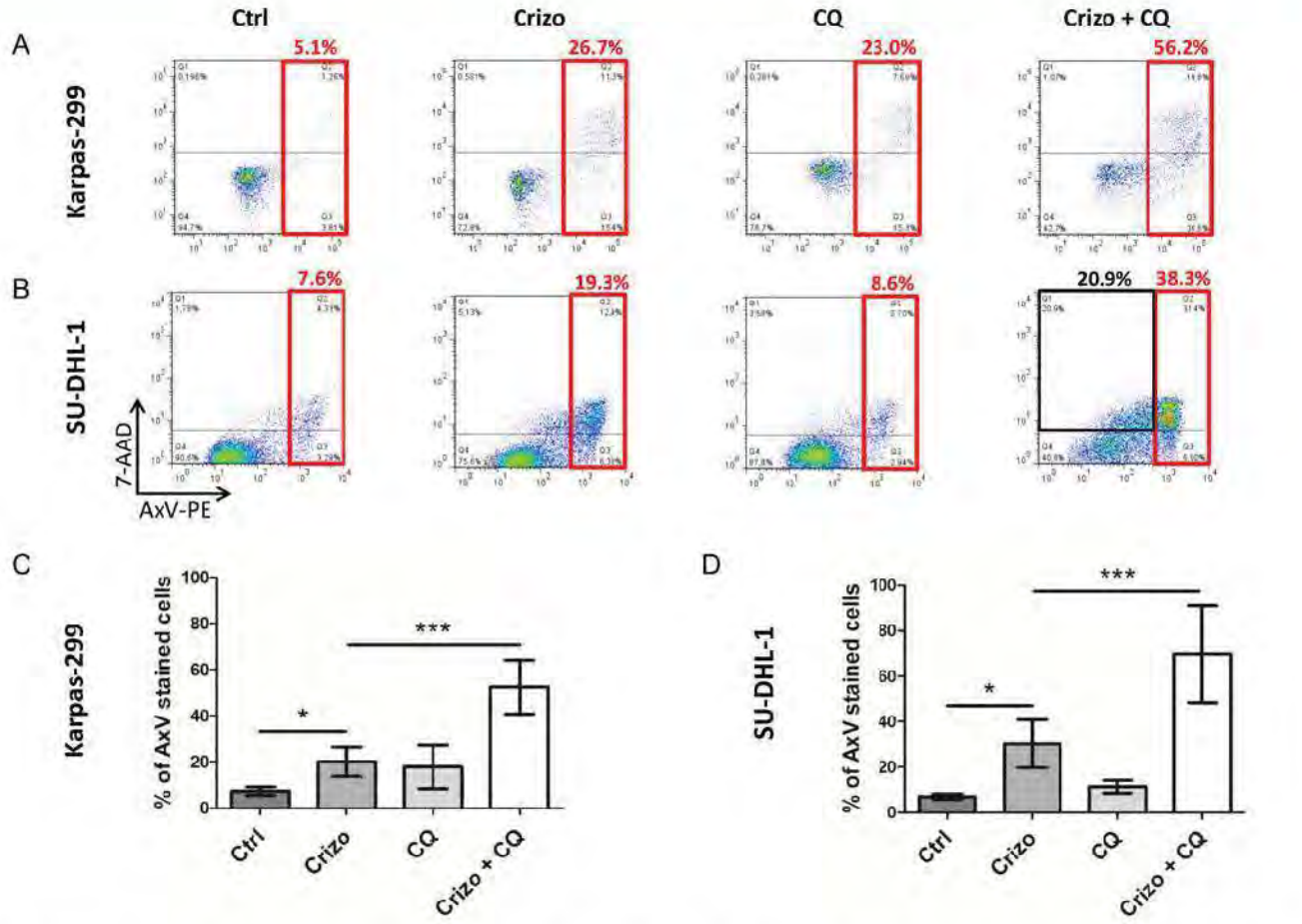
Supplementary Figure S4: Autophagy mRNA and protein upregulation upon ALK knockdown. **A.** ULK1, WIPI1, PI3KC3 and MAP1LC3B mRNA levels were determined by RTqPCR in Karpas-299 cells transfected with scramble siRNA (siSCR) and ALK-targeted siRNA (siALK). Values were normalized to the expression levels of the housekeeping gene GAPDH and are shown as fold regulation in mRNA expression compared to siSCR (set to 1). Statistical analysis was performed using unpaired *t*-tests; $*p < 0.05$. **B.** ULK1 and MAP1LC3B protein expression were analyzed by western blot with GAPDH or β-actin as loading controls.



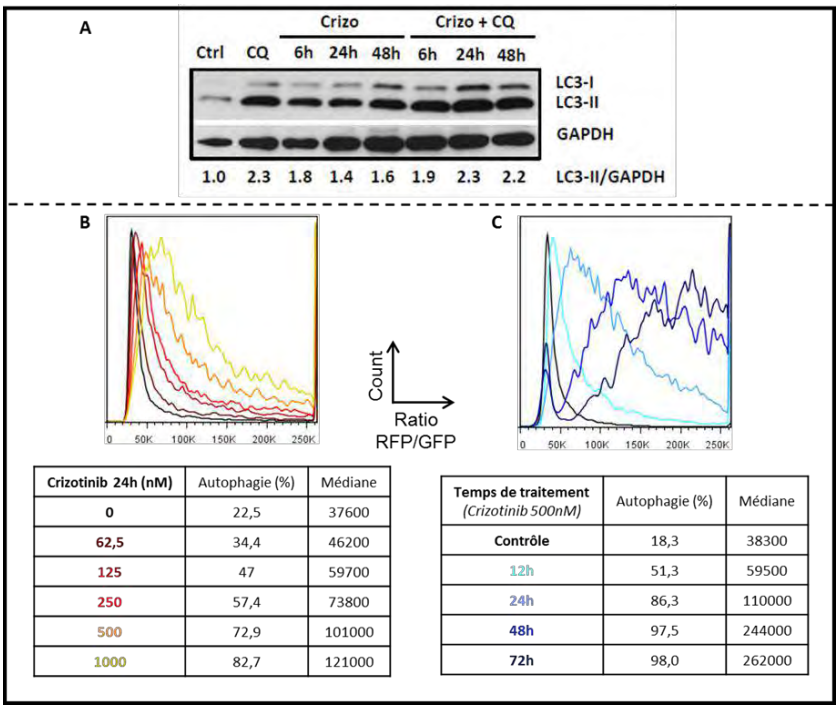
Supplementary Figure S5: ALK inhibition (with crizotinib) synergizes with autophagy inhibition (chloroquine or 3-methyladenine) to reduce Karpas-299 cell viability. Karpas-299 cells were treated with crizotinib and chloroquine **A.** or with crizotinib and 3-methyladenine **B.** simultaneously for 48 h ($n = 3$). The concentrations of crizotinib were (nM): 0, 125, 250, 500, 1000, 2000. The concentrations of chloroquine were (μM): 0, 7.5, 15, 30, 60, 120. The concentrations of 3-methyladenine were (mM): 0, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10. Cell viability data were analyzed and combination indexes (CI) were calculated using the CompuSyn software (ComboSyn, Inc., Paramus, NJ) for the determination of synergy. Results are shown on the Fa-CI plot where Fa represents the fraction affected by the drug tested. CI < 1 indicates synergism; CI = 1 indicates an additive effect, and CI > 1 indicates antagonism.



Supplementary Figure S6: Autophagic flux impairment using siRNA targeting ATG7. LC3 immunoblots were performed on Karpas-299 cells transfected with scramble siRNA (siSCR) or ATG7 targeting (siATG7) siRNA that were treated or not for the last 24 h with crizotinib (500 nM). β-actin was used as a loading control.



Supplementary Figure S7: Effect of crizotinib and chloroquine single and combined treatments on apoptosis. Karpas-299 **A, C.** and SU-DHL-1 **B, D.** cells were untreated (Ctrl) or submitted to crizotinib (Crizo) (500 nM for Karpas-299, 400 nM for SU-DHL-1) and/or chloroquine (CQ) (30 μM) single or combined (Crizo + CQ) treatment. Annexin V-PE / 7-AAD staining was performed 48 h after treatment. Representative flow diagrams are shown in A and B. The graphs in C and D represent the mean percentage of AnnexinV-stained cells from four independent experiments ± SD. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA; $*p \leq 0.05$; $***p \leq 0.001$.

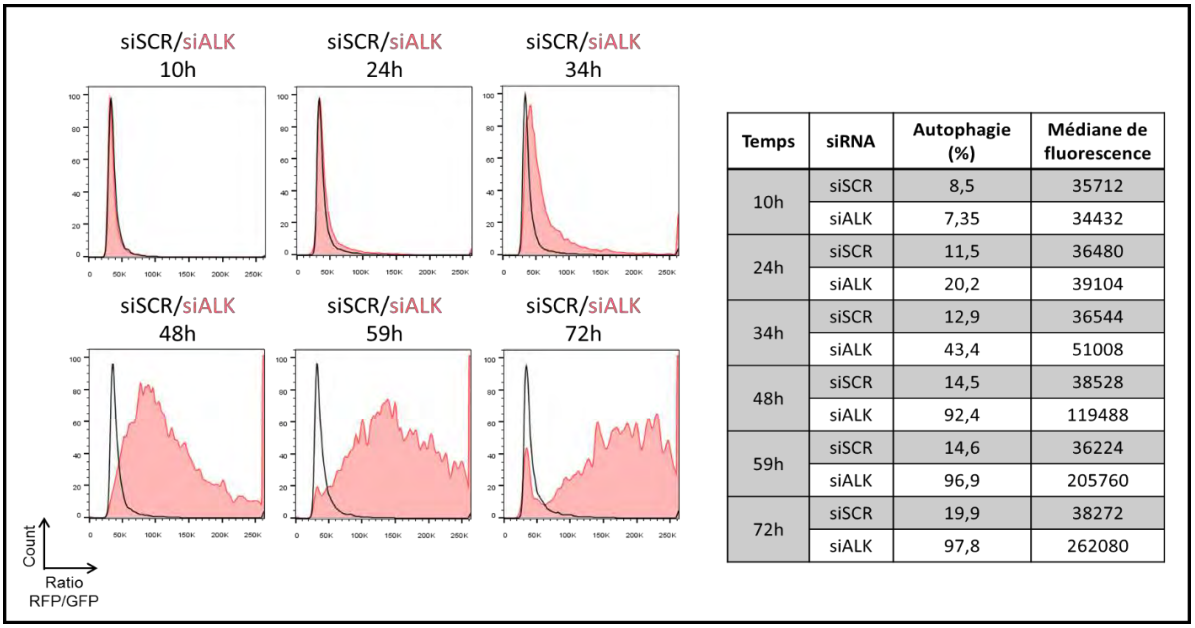


Crizotinib 24h (nM)	Autophagie (%)	Médiane
0	22,5	37600
62,5	34,4	46200
125	47	59700
250	57,4	73800
500	72,9	101000
1000	82,7	121000

Temps de traitement (Crizotinib 500nM)	Autophagie (%)	Médiane
Contrôle	18,3	38300
12h	51,3	59500
24h	86,3	110000
48h	97,5	244000
72h	98,0	262000

Figure 41 : Induction d'autophagie après traitement au Crizotinib dans le clone Karpas-299-RFP-GFP-LC3

(A)Mesure de l'induction du flux autophagique après traitement de cellules Karpas-299 au crizotinib (500nM, pendant 6, 24 ou 48h) et/ou par la chloroquine (30µM pendant 24h) par western blotting. (B) Mesure de l'induction d'autophagie par cytométrie en flux dans le clone cellulaire Karpas-299-RFP-GFP-LC3 après 24h de traitement par des doses croissantes de crizotinib (62.5, 125, 250, 500 et 1000nM). (C) Mesure de l'induction d'autophagie par cytométrie en flux après traitement du clone cellulaire Karpas-299-RFP-GFP-LC3 par 500nM de crizotinib pendant 12h, 24h, 48h et 72h. *(Figure représentative de 3 expériences)*



Temps	siRNA	Autophagie (%)	Médiane de fluorescence
10h	siSCR	8,5	35712
	siALK	7,35	34432
24h	siSCR	11,5	36480
	siALK	20,2	39104
34h	siSCR	12,9	36544
	siALK	43,4	51008
48h	siSCR	14,5	38528
	siALK	92,4	119488
59h	siSCR	14,6	36224
	siALK	96,9	205760
72h	siSCR	19,9	38272
	siALK	97,8	262080

Figure 42 : Induction d'autophagie après inhibition moléculaire de ALK (siARN) dans le clone cellulaire Karpas-299 RFP-GFP-LC3

Mesure de l'induction d'autophagie par cytométrie en flux après transfection du clone cellulaire Karpas-299-RFP-GFP-LC3 par un siARN contrôle (siSCR, 100nM) et un siARN ciblant l'ARNm de ALK (siALK, 100nM) pendant 10h, 24h, 34h, 48h, 59h et 72h. Le tableau présente le pourcentage de cellules qui activent l'autophagie, et la médiane du pic de fluorescence du ratio RFP/GFP. *(Figure représentative de 3 expériences)*

PARTIE II : SUITE DE L'ARTICLE I – TRAVAUX EN COURS

Lors de l'étude précédente, nous avons été confrontés à des difficultés lors de la mesure du flux autophagique *via* la détection de la protéine LC3 par western-blotting (« LC3 turnover assay »). En effet, cette technique est connue pour être relativement difficile, en particulier en ce qui concerne la reproductibilité dans l'intensité des signaux détectés.

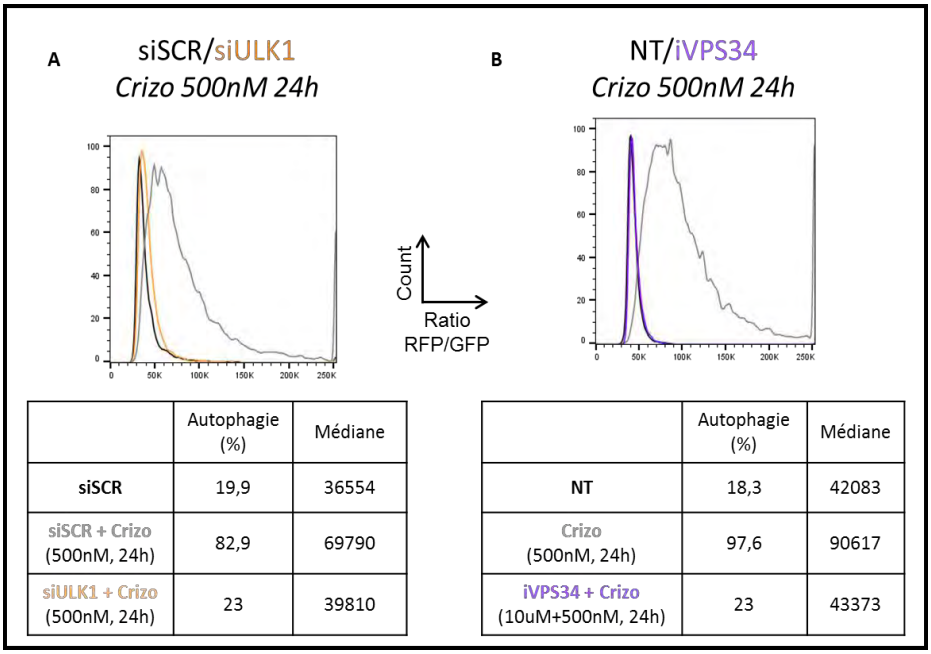
Afin de pallier à ces problèmes, nous avons développé une nouvelle méthode de mesure du flux autophagique au sein du laboratoire. Cette technique a initialement été mise au point par le groupe du Dr Thorburn[343] et est basée sur l'utilisation d'une protéine de fusion RFP-GFP-LC3 pour la mesure du flux autophagique par cytométrie en flux. Pour cela, nous avons transfecté une lignée cellulaire de LAGC-NPM-ALK+, les cellules Karpas-299, avec un plasmide codant pour cette protéine de fusion. Nous avons ensuite sélectionné (tri-cellulaire), puis amplifié un clone exprimant les fluorescences rouges (RFP) et vertes (GFP) de façon stable. L'induction du flux autophagique dans ce modèle peut être mesurée par le ratio de fluorescence RFP/GFP, car la fluorescence verte (GFP) est « quenchée » lors de l'acidification de l'autophagolysosome (voir Introduction, Chapitre 3, partie 3).

Au cours de ma thèse, je me suis attachée dans un premier temps à vérifier le comportement du clone cellulaire Karpas-299-RFP-GFP-LC3 en présence de stimuli activateurs et inhibiteurs de l'autophagie, afin de valider son utilisation comme outil de mesure du flux autophagique. Dans un second temps, j'ai étudié la réponse autophagique de ce clone Karpas-299-RFP-GFP-LC3 suite à différents traitements anti-cancéreux administrés actuellement en clinique.

1 VALIDATION D'UN NOUVEL OUTIL DE MESURE DU FLUX AUTOPHAGIQUE PAR CYTOMETRIE EN FLUX

1.1 Effets de l'inhibition de NPM-ALK sur le clone Karpas-299 RFP-GFP-LC3

Dans un premier temps, nous avons voulu évaluer la réponse autophagique du clone Karpas-299-RFP-GFP-LC3 induite après traitement par le crizotinib. Comme mentionné dans l'article publié dans Oncotarget, l'autophagie est fortement induite en réponse à un traitement par cet ITK. En effet, on peut observer une accumulation plus importante de la protéine LC3-II lorsque les cellules sont traitées à la fois par le crizotinib et par la chloroquine en comparaison avec les cellules traitées par la chloroquine seule, et ce même à différents temps de traitement (Figure 41A). Ainsi, le traitement du clone Karpas-299-RFP-GFP-LC3 par différentes doses de crizotinib (Figure 41B) permet de visualiser une augmentation graduelle du pourcentage de cellules activant un fort flux autophagique qui passe

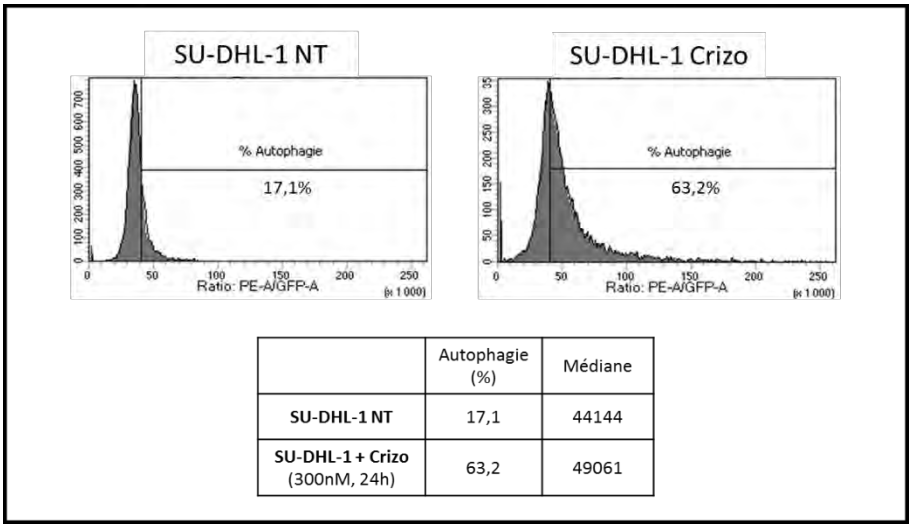


	Autophagie (%)	Médiane
siSCR	19,9	36554
siSCR + Crizo (500nM, 24h)	82,9	69790
siULK1 + Crizo (500nM, 24h)	23	39810

	Autophagie (%)	Médiane
NT	18,3	42083
Crizo (500nM, 24h)	97,6	90617
iVPS34 + Crizo (10uM+500nM, 24h)	23	43373

Figure 43 : Effets de divers inhibiteurs de l'autophagie sur l'inhibition du flux dans le clone cellulaire Karpas-299 RFP-GFP-LC3

Mesure de l'induction d'autophagie par cytométrie en flux dans le clone cellulaire Karpas-299-RFP-GFP-LC3 traité par le crizotinib (500nM, 24h) avec ou sans inhibiteurs de l'autophagie (A) un siARN dirigé contre l'ARNm de ULK1 (siULK1, 100nM) ou (B) un inhibiteur de la PI3K de classe III VPS34 (10µM, 24h). NT : cellules non traitées. *(Figure représentative de 3 expériences)*



	Autophagie (%)	Médiane
SU-DHL-1 NT	17,1	44144
SU-DHL-1 + Crizo (300nM, 24h)	63,2	49061

Figure 44 : Induction d'autophagie après traitement au crizotinib dans les SU-DHL-1-RFP-GFP-LC3

Mesure de l'induction d'autophagie par cytométrie en flux après 24h de traitement des cellules SU-DHL-1 transduites par un lentivecteur exprimant la protéine de fusion RFP-GFP-LC3 (SU-DHL-1-RFP-GFP-LC3) par le crizotinib (300nM). NT : cellules non traitées. *(Figure représentative de 3 expériences)*

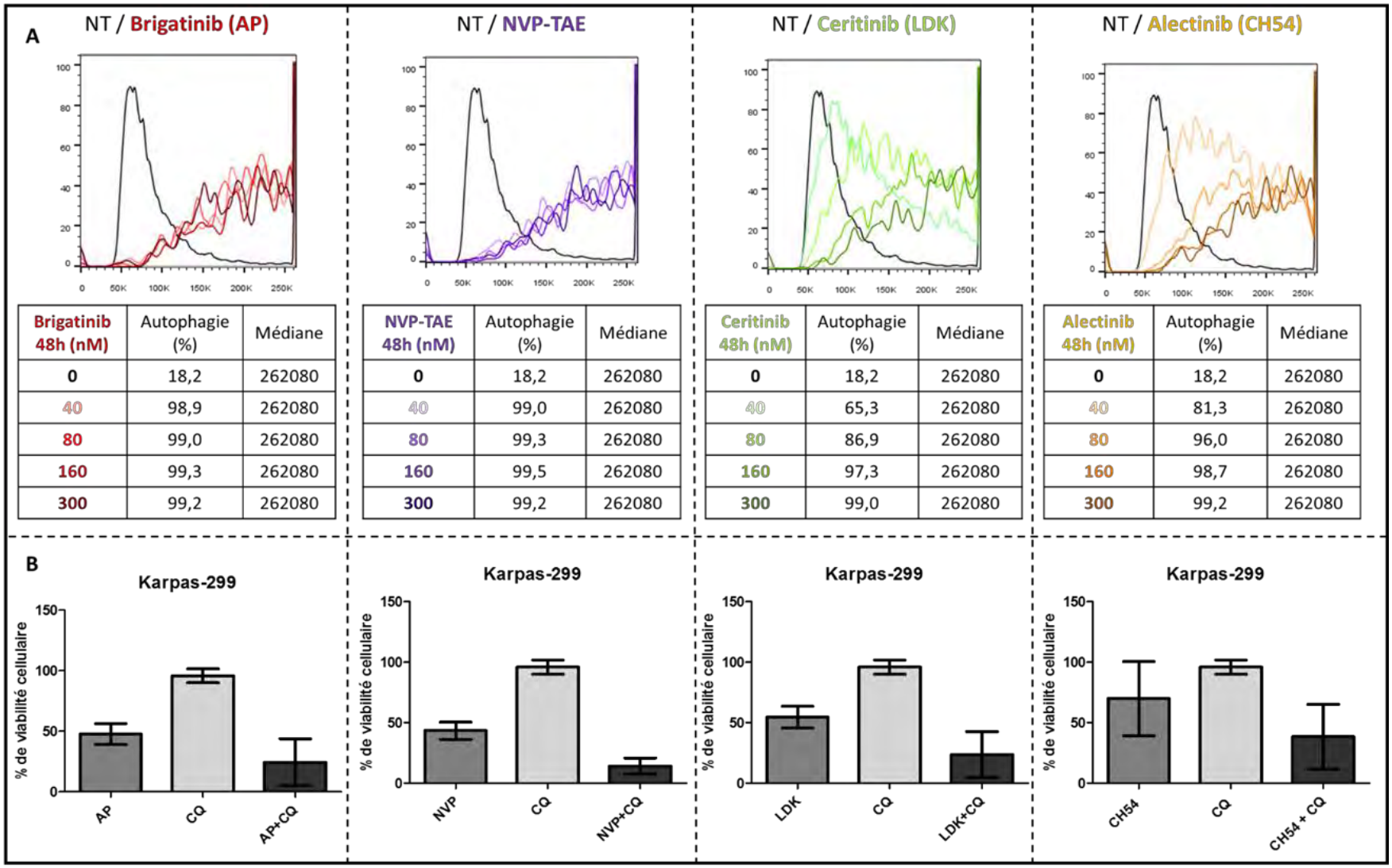
de 22.5% pour des cellules non traitées à 82.7% pour des cellules traitées avec 1000nM de crizotinib (24h) (Figure 41B). Nous avons également effectué une cinétique de traitement au crizotinib (500nM) sur une période de 12h à 72h (Figure 41C). Cette expérience a également montré une augmentation progressive du flux autophagique (18.3% pour les cellules non traitées et 98% pour les cellules ayant subi 72h de traitement) (Figure 41C). Ces observations ont par la suite été confirmées par une cinétique d'inhibition moléculaire de NPM-ALK à l'aide d'un siRNA dirigé contre l'ARNm de ALK (siALK) (Figure 42). Nous avons pu observer une activation progressive du flux autophagique en fonction du temps d'inhibition de l'oncogène (de 7.3% à 97.8% pour des cellules transfectées de 10h à 72h par un siALK) (Figure 42). Cependant, il faut noter que dans ce cas, à 72h de traitement, on observe la réapparition d'une population cellulaire qui se superpose avec le contrôle (exprimant un flux autophagique basal), et qui pourrait émerger suite à une baisse d'efficacité du siARN (Figure 42).

1.2 Effets de différents inhibiteurs de l'autophagie sur le clone Karpas-299 RFP-GFP-LC3

Après avoir validé la possibilité de visualiser une induction du flux autophagique par cytométrie en flux à l'aide du clone cellulaire Karpas-299-RFP-GFP-LC3, nous avons réalisé les mêmes expériences en utilisant des inhibiteurs de flux autophagique (Figure 43). Les cellules ont été transfectées ou non avec un siARN inhibant l'ARNm de ULK1, une protéine clef de la machinerie autophagique (siULK1, Figure 43A), ou traitées avec un inhibiteur de la protéine Vps34 (iVps34, 10µM, donné par le Pr M.P.Tschan) (Figure 43B), puis traitées avec 500nM de crizotinib pendant 24h. Globalement, nous avons observé que le traitement au crizotinib induisait entre 80 et 97% de flux autophagique (moyenne sur 6 expériences), par rapport à 20% dans les cellules non traitées (Figure 43). L'adjonction d'inhibiteurs de l'autophagie a permis de réduire fortement ce flux. En effet, le siULK1 comme le traitement par l'iVps34, ramènent les cellules à un niveau basal d'autophagie (environ 20%), équivalent à celui des cellules non traitées par le crizotinib (Figure 43). Ces deux dernières stratégies se sont donc avérées très efficaces pour inhiber le flux autophagique.

La protéine de fusion RFP-GFP-LC3 a également été introduite dans une deuxième lignée cellulaire de LAGC NPM-ALK+, les SU-DHL-1, par transduction lentivirale (vecteur aimablement donné par le Pr M. P. Tschan). Le crizotinib induit également le flux autophagique dans cette lignée cellulaire à hauteur de 63% (Figure 44). Ainsi cette lignée pourra également être utilisée pour des mesures du flux autophagique.

Tous ces résultats confirment que le clone Karpas-299-RFP-GFP-LC3 ainsi que les cellules SU-DHL-1 transduites par un lentivecteur exprimant la protéine de fusion RFP-GFP-LC3 sont de bons outils



Brigatinib 48h (nM)	Autophagie (%)	Médiane
0	18,2	262080
40	98,9	262080
80	99,0	262080
160	99,3	262080
300	99,2	262080

NVP-TAE 48h (nM)	Autophagie (%)	Médiane
0	18,2	262080
40	99,0	262080
80	99,3	262080
160	99,5	262080
300	99,2	262080

Ceritinib 48h (nM)	Autophagie (%)	Médiane
0	18,2	262080
40	65,3	262080
80	86,9	262080
160	97,3	262080
300	99,0	262080

Alectinib 48h (nM)	Autophagie (%)	Médiane
0	18,2	262080
40	81,3	262080
80	96,0	262080
160	98,7	262080
300	99,2	262080

Figure 45 : Effets de divers inhibiteurs de l'activité kinase de ALK sur le flux autophagique dans les lignées cellulaires de LAGC-NPM-ALK+

(A)Mesure du flux autophagique dans le clone cellulaire Karpas-299-RFP-GFP-LC3 après 48h de traitement à différentes doses (40, 80,160 et 300nM) d'ITK ciblant ALK : le brigatinib (AP, le NVP-TAE, le ceritinib (LDK) ou l'alectinib (CH54). Le tableau représente le pourcentage de cellules activant l'autophagie, et la médiane du pic de fluorescence du ratio RFP/GFP. (B) Tests de viabilité cellulaire effectués dans la lignée cellulaire de LAGC NPM-ALK Karpas-299 par ces différents ITK ciblant ALK (40nM, 48h) associé ou non à un traitement par la chloroquine (CQ, 15uM 48h). NT : non traité. *(Figure représentative de 3 expériences)*

permettant le criblage, par cytométrie en flux, de nombreuses molécules, afin d'avoir un aperçu rapide de leur effet sur le flux autophagique dans les cellules de LAGC NPM-ALK+.

2 AUTRES TRAITEMENTS DES LAGC ALK+ : IMPACT SUR LE FLUX AUTOPHAGIQUE

Notre première étude a permis de montrer que le crizotinib induisait de l'autophagie cytoprotectrice dans les LAGC NPM-ALK+. Dernièrement, une nouvelle génération d'inhibiteurs de l'activité kinase (ITK) ciblant ALK a été développée afin de pallier aux résistances naissantes au crizotinib. Les effets de ces ITK de seconde génération sur l'autophagie ne sont toutefois pas encore connus. Il faut également garder en mémoire que le traitement classique de première intention des LAGC NPM-ALK+ est la chimiothérapie (CHOP : cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine, prednisone), et que l'impact de ce type de traitement sur l'autophagie dans les cellules de LAGC NPM-ALK+ n'est à ce jour pas connu.

Dans ce contexte, le second objectif de mon travail de thèse a été d'étudier l'impact de ces différents traitements sur le flux autophagique dans les LAGC NPM-ALK+.

- Dans un premier temps, je me suis attachée à l'étude de 4 ITK ciblant ALK de seconde génération (le brigatinib, le NVP-TAE, le ceritinib et l'alectinib), afin de déterminer si, comme le crizotinib, ils permettaient l'induction d'une autophagie cytoprotectrice.
- Dans un second temps, je me suis intéressée aux traitements chimiothérapeutiques (doxorubicine et vinblastine), afin de déterminer si une réponse autophagique leur était également associée.
- Enfin, les résultats obtenus m'ont conduit à m'intéresser aux voies de signalisation activées en aval de ces traitements, et en particulier à la voie mTOR un régulateur majeur de l'autophagie.

2.1 Inhibiteurs de l'activité kinase de ALK de seconde génération

Au cours de ma thèse, j'ai travaillé sur quatre inhibiteurs de la kinase ALK de nouvelle génération : il s'agit du brigatinib, du ceritinib, de l'alectinib ainsi que du NVP-TAE (molécule précurseur du ceritinib). Leur efficacité étant plus importante que celle du crizotinib, il a tout d'abord fallu établir la dose permettant une diminution de la croissance cellulaire d'environ 50% (équivalente au traitement au crizotinib à 500nM, utilisé dans notre première étude). Ainsi, nous avons effectué des tests de viabilité cellulaire (tests MTS) qui nous ont indiqué que ces doses sont de 40nM, soit 12 inférieures à la dose de crizotinib utilisée pour obtenir le même effet (données non présentées dans ce manuscrit), quel que soit l'ITK de seconde génération considéré. C'est donc à cette concentration que nous nous sommes placés dans les études de combinaison thérapeutique impliquant ces ITKs.

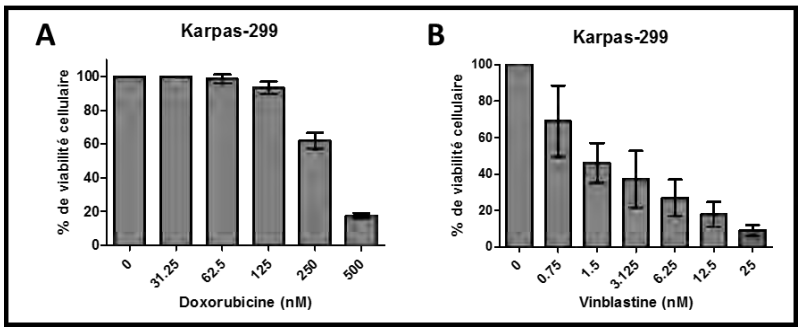
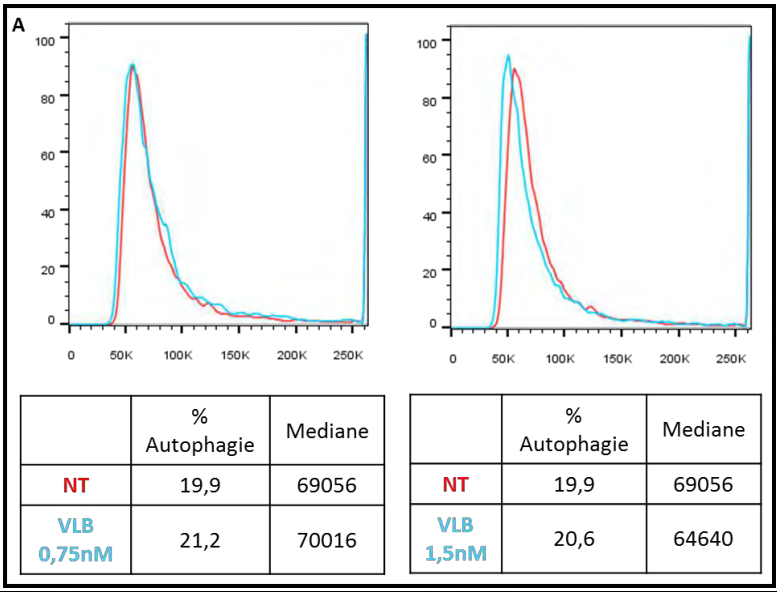
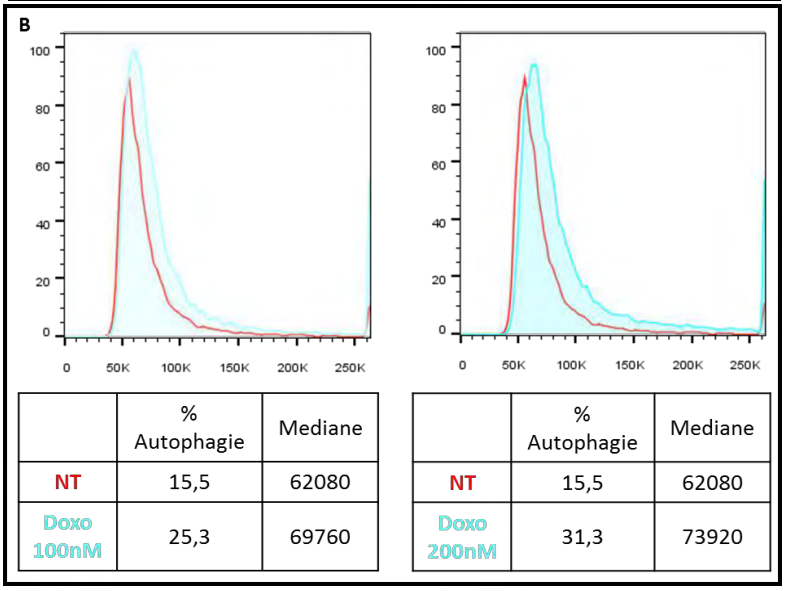


Figure 46 : Dose réponse du traitement de cellules de LAGC NPM-ALK+ par la doxorubicine et la vinblastine
Mesure de la viabilité cellulaire par test MTS dans les cellules Karpas-299 traitées pendant 48h par des doses croissantes (A) de doxorubicine (31.25, 62.5, 125, 250 et 500 nM) et (B) de vinblastine (0.75, 1.5, 3.125, 6.25, 12.5 et 25nM). *(Figure représentative de 3 expériences)*



	% Autophagie	Mediane
NT	19,9	69056
VLB 0,75nM	21,2	70016

	% Autophagie	Mediane
NT	19,9	69056
VLB 1,5nM	20,6	64640



	% Autophagie	Mediane
NT	15,5	62080
Doxo 100nM	25,3	69760

	% Autophagie	Mediane
NT	15,5	62080
Doxo 200nM	31,3	73920

Figure 47 : Absence d'induction de flux autophagique sous traitement par la doxorubicine et la vinblastine dans les cellules de LAGC NPM-ALK+.
Mesure du flux autophagique par cytométrie en flux dans le clone cellulaire Karpas-299-RFP-GFP-LC3 traité 48h par (A) 1,5nM de vinblastine (VLB) pendant 48h et (B) par 200nM de doxorubicine (Doxo) pendant 48h. (NT : non traité)
(Figure représentative de 3 expériences)

A l'aide de la technique de cytométrie en flux utilisant le clone cellulaire Karpas-299-RFP-GFP-LC3, nous avons ensuite montré que le brigatinib, l'alectinib, le ceritinib et le NVP-TAE induisaient tous un fort flux autophagique. En effet, le traitement du clone cellulaire Karpas-299-RFP-GFP-LC3 par 300nM de chacun de ces ITK pendant 48h, induit un flux autophagique maximal proche de 100% (Figure 45A). La confirmation de l'induction du flux autophagique par ces molécules a ensuite été effectuée par des expériences de western blotting permettant la détection de la protéine LC3. Ainsi, nous avons pu observer l'accumulation de la protéine LC3-II en condition de traitement combiné (ITK ciblant ALK + inhibiteurs de l'autophagie) (données non présentées dans ce manuscrit). Par la suite, des tests de viabilité cellulaire combinant ces différents ITK ciblant ALK avec un inhibiteur du flux autophagique (la chloroquine) nous ont permis de déterminer le rôle de l'autophagie induite en réponse à ces divers traitements. En effet, le double traitement chloroquine (15µM) + ITK ciblant ALK (40nM) induit systématiquement une perte de viabilité cellulaire plus importante que le traitement par ITK seul (Figure 45B). L'autophagie induite en réponse aux différents ITK ciblant ALK testés semble donc jouer un rôle cytoprotecteur car son inhibition permet de potentialiser l'effet des ITK de seconde génération, tout comme nous l'avons observé pour le crizotinib.

2.2 Chimiothérapies

De nombreuses études ont montré que l'autophagie est un mécanisme permettant aux cellules de faire face à différents stress, et en particulier aux stress thérapeutiques. Les ITK ciblant ALK font partie de ces stress thérapeutiques, tout comme les chimiothérapies. L'objectif suivant de mes travaux de thèse a donc été de déterminer si tous les stress thérapeutiques permettaient d'induire une réponse autophagique dans les LAGC NPM-ALK+.

Après les ITK ciblant ALK, de première et de seconde génération, nous nous sommes donc intéressés aux chimiothérapies. Nous avons choisi la doxorubicine (présente dans le cocktail CHOP), ainsi que la vinblastine (une molécule présentant des effets prometteurs en clinique). L'effet de ces deux molécules sur la viabilité cellulaire est très puissant : en effet dans les Karpas299, un traitement de 48h avec 250nM de doxorubicine (doxo) permet une inhibition de la viabilité cellulaire d'environ 80% par rapport à des cellules non traitées (Figure 46A). Les effets de la vinblastine (VLB) sont encore plus prononcés : il suffit de 48h de traitement avec 12.5nM de cette drogue pour atteindre les mêmes effets sur la viabilité cellulaire (Figure 46B).

Nous avons ensuite mesuré la capacité de ces traitements à induire le flux autophagique par cytométrie en flux à l'aide du clone cellulaire Karpas-299-RFP-GFP-LC3. Nos résultats montrent qu'en comparaison avec des cellules non traitées (NT), le traitement à la vinblastine (VLB) n'induit aucune augmentation du flux autophagique (Figure 47A), alors qu'à la même dose (1.5nM), il impacte la viabilité cellulaire

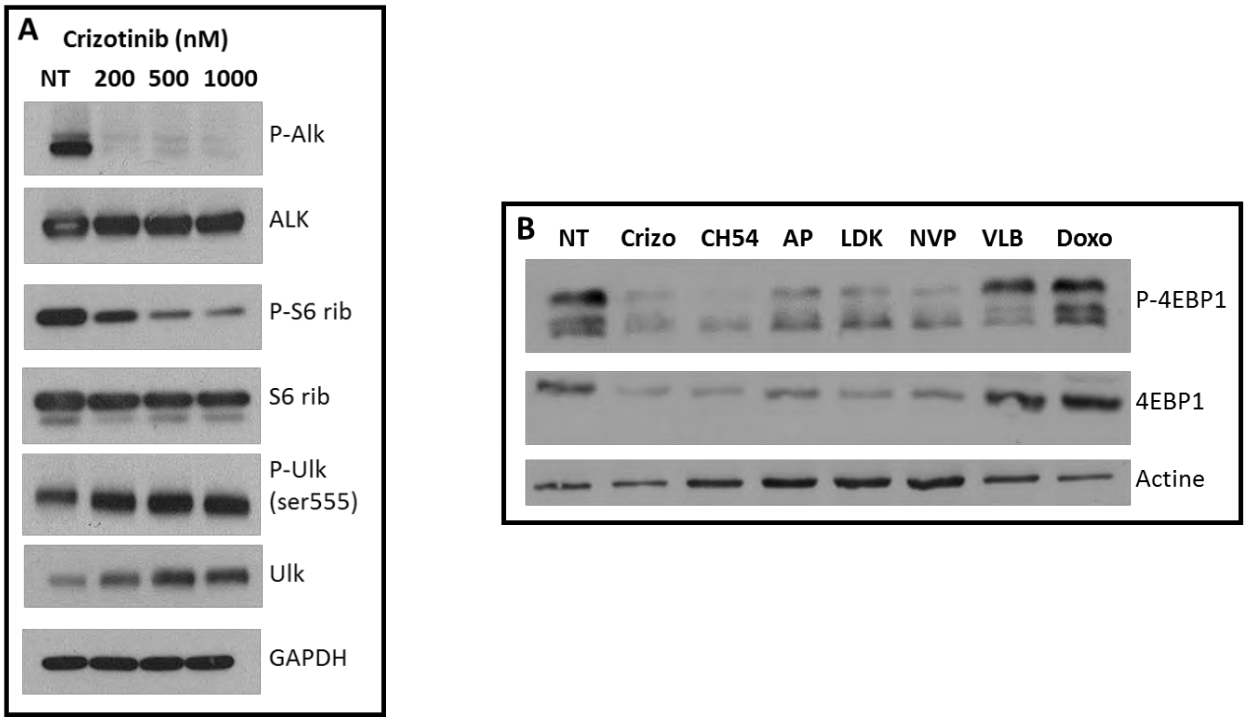


Figure 48 : Activation de la voie mTOR en réponse au traitement de cellules de LAGC NPM-ALK+ par différents ITK ciblant ALK, par la doxorubicine ou la vinblastine :

(A) Mesure du niveau d'expression de ALK phosphorylé (P-ALK), de ALK total (ALK), de la protéine ribosomale S6 phosphorylée (P-S6), de la protéine ribosomale S6 totale (S6), de ULK1 phosphorylé (P-ULK), de ULK1 total (ULK) ainsi que de la GAPDH (contrôle de charge) par western blotting dans les cellules Karpas-299 traitées par des doses croissantes de crizotinib (200, 500 et 1000 nM) pendant 24h. (B) Mesure de l'expression de la protéine 4EBP1 totale (4EBP1) et phosphorylée (P-4EPB1) ainsi que celle de l'actine (contrôle de charge) par western blotting dans les cellules Karpas-299 traitées par le crizotinib (500nM, 24h, Crizo), l'alectinib (300nM, 24h, CH54), le brigatinib (300nM, 24h, AP), le ceritinib (300nM, 24h, LDK), le NVP-TAE (300nM, 24h, NVP), la vinblastine (3.125nM, 24h, VLB) et la doxorubicine (400nM, 24h, Doxo). *(Figure représentative de 3 expériences)*

(Figure 46B). Le traitement à la doxorubicine quant à lui induit toujours en moyenne 10% de flux autophagique (Figure 47B), et ce flux n'augmente pas de façon proportionnelle à la dose utilisée (données non présentées dans ce manuscrit). Ces résultats sont totalement différents de ceux obtenus avec tous les ITK ciblant ALK, pour lesquels on peut observer une forte induction d'autophagie, qui augmente avec des doses croissantes de ces inhibiteurs (Figure 41). Tous les stress thérapeutiques n'entrainent donc pas systématiquement l'induction de l'autophagie dans les LAGC NPM-ALK+. Nous nous sommes alors intéressés à l'origine de cette différence.

2.3 Implication de la voie mTOR

Nous avons émis l'hypothèse que la capacité de différents stress thérapeutiques (ITK ou chimiothérapies) à induire ou non une réponse autophagique pouvait être due aux voies de signalisation activées en aval de ces thérapies. Or, il est désormais admis que le contrôle de l'autophagie est majoritairement médié par la voie mTOR au niveau cellulaire. L'activation différentielle de cette voie de signalisation après traitement par ITK ciblant ALK ou par chimiothérapie pourrait expliquer la différence d'induction d'autophagie observée en réponse aux thérapies étudiées.

Nous avons donc cherché à caractériser la voie mTOR dans les cellules de LAGC NPM-ALK+ Karpas-299 après traitement par des ITK (de première et de seconde génération) ou des chimiothérapies (doxorubicine, doxo et vinblastine, VLB). Nous avons ainsi observé que le traitement par des ITK ciblant ALK (représentés ici par le crizotinib, crizo), entrainait effectivement l'inhibition de la voie mTOR (Figure 48A), comme l'indique la diminution de la phosphorylation de la protéine ribosomale S6 (P-S6rib). Nous avons également observé la phosphorylation de ULK1 sur le résidu Serine 555, résidu caractéristique de son activation, ce qui confirme l'induction de l'autophagie en réponse au traitement par le crizotinib.

En revanche, les traitements par chimiothérapie (doxorubicine ou vinblastine) n'entrainent pas l'inhibition de la voie mTOR (Figure 48B). En effet, nous avons observé que contrairement au traitement par le crizotinib, ou par d'autres ITK ciblant ALK, les traitements à la doxorubicine ou à la vinblastine n'induisent pas de diminution de la phosphorylation de la protéine 4EBP1, un substrat indiquant l'activité de la voie mTOR.

La différence entre les thérapies ciblant ALK et les chimiothérapies sur l'induction du flux autophagique pourrait donc être expliquée par leurs effets sur la voie mTOR. En effet, les chimiothérapies semblent ne pas avoir d'effet sur cette voie, alors que les ITK ciblant ALK semblent entrainer son inhibition. Ces résultats doivent encore être confirmés, et complétés par l'étude de l'activation d'autres protéines caractéristiques de la voie mTOR.

PARTIE III : AUTRES VOIES DE REGULATION DE L'AUTOPHAGIE DANS LES LAGC NPM-ALK+ -TRAVAUX EN COURS

Régulation de l'autophagie par les microARNs

1 INTRODUCTION

1.1 Objectifs de l'étude

Le troisième aspect de mon travail de thèse a consisté en la recherche de voies de régulation de l'autophagie alternatives à la voie mTOR, dans les cellules de LAGC NPM-ALK+. Notre laboratoire disposant d'une expertise pour l'étude de différents types d'ARN non codants, en particulier pour les microARNs et leur contribution dans l'oncogenèse, je me suis donc attachée à l'étude de ces régulateurs post-transcriptionnels. En effet, ces petits ARNs sont connus pour réguler négativement leurs gènes cibles au niveau post-transcriptionnel et leur rôle dans la régulation de l'autophagie est très décrit. Plusieurs études ont également montré la dérégulation de ces microARNs dans les cellules de LAGC NPM-ALK+ et leur implication dans la lymphomagenèse de ces hémopathies.

L'objectif initial de mes travaux a donc été d'étudier si l'induction de l'autophagie en réponse au traitement par le crizotinib dans les LAGC NPM-ALK+ pouvait être due à la dérégulation de un ou plusieurs microARNs. Dans un second temps nous avons entrepris la caractérisation des cibles des microARNs candidats afin d'identifier un nouveau mécanisme de régulation potentiel de l'autophagie dans les cellules de LAGC NPM-ALK+.

1.2 Dérégulation de l'expression des microARNs lors de l'inhibition de NPM-ALK par le crizotinib

Dans l'article publié dans le journal Oncotarget, nous avons réalisé une analyse transcriptomique des cellules de LAGC NPM-ALK+ Karpas-299. Cette étude a permis de mettre en évidence la surexpression de nombreux gènes de la machinerie autophagique sous traitement au crizotinib (24h, 500nM). Afin d'évaluer si cette augmentation pouvait être reliée à la diminution de l'expression de certains microARNs, nous avons réalisé en parallèle, sur les mêmes cellules, un profil d'expression des microARNs ou « miRnome ». Pour cela, nous avons comparé l'expression de ces microARNs dans des cellules Karpas-299 traitées (500nM, 24h) ou non

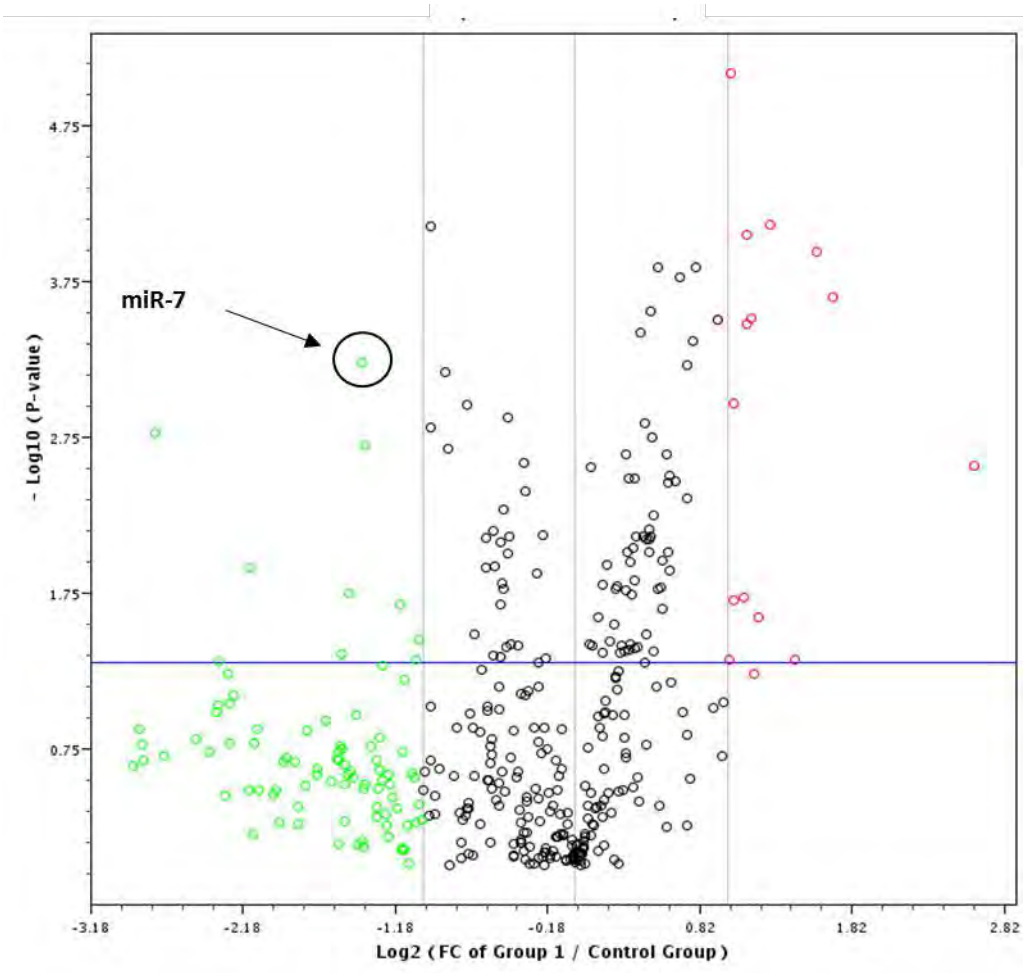


Figure 49 : Volcano plot présentant les microARNs dérégulés en réponse au traitement de cellules de LAGC NPM-ALK+ par le crizotinib

Analyse du niveau d'expression des microARNs dans les cellules Karpas-299 traitées ou non par 500nM de crizotinib pendant 24h. L'abscisse représente le Log2 du taux d'expression des miRNAs dans les cellules Karpas-299 traitées par le crizotinib par rapport aux cellules non traitées (Log2 FC). L'ordonnée représente le Log10 de la valeur statistique (-Log10 p-value). Les points noirs, verts et rouges représentent respectivement les microARNs dont l'expression n'est pas modifiée, est sous-exprimée ou surexprimée en réponse au traitement. Les points au-dessus de la ligne bleue correspondent aux mesures ayant une valeur statistique inférieure à 0.05 ($p<0,05$). Le miR-7 est sous exprimé après traitement par le crizotinib et présente une très bonne p-valeur ($p=0,0006$)

avec du crizotinib. Nous avons ainsi observé la sous-expression de 10 microARNs en réponse au traitement par le crizotinib en comparaison avec des cellules non traitées (Figure 49). Parmi eux, le miR-7 présente la meilleure valeur statistique (p=0.0006), ce qui suggère que cette diminution sous traitement au crizotinib est très reproductible. Nous nous sommes donc intéressés au rôle de ce microARN dans la réponse autophagique des LAGC NPM-ALK+ sous traitement par le crizotinib.

1.3 Le miR-7 : description et fonctions connues

a. Localisation et expression

Le miR-7 est un microARN très conservé entre les différentes espèces animales[579,580]. Il est exprimé de la drosophile à l'homme mais également chez la souris et le rat. Chez l'homme, son expression provient de trois loci différents : *MIR7-1* localisé sur le chromosome 9, au sein d'un intron du gène codant pour le gène *HNRNPK* (Heterogeneous Nuclear RiboNucleoProtein K) ; *MIR7-2*, localisé dans une région intergénique du chromosome 5, et *MIR7-3*, localisé sur le chromosome 19, dans un intron du gène codant pour *PGSF1a* (Pituitary Gland Specific Factor 1a). Chacun de ces gènes est transcrit en un transcrit primaire (pri-miR-7-1, pri-miR-7-2 et pri-miR-7-3). Ces pri-miR sont ensuite maturés en trois précurseurs, (pre-miR-7-1, pre-miR-7-2 et pre-miR-7-3) respectivement, qui à terme, donneront tous naissance au même microARN mature, miR-7[581]. MiR-7 est exprimé dans de nombreux tissus, mais son expression y est généralement faible. Il est cependant décrit pour être fortement exprimé dans le cerveau et le pancréas[582–584]. Sa régulation transcriptionnelle peut être médiée par de nombreux facteurs de transcription comme c-Myc[585], et il est également soumis à de nombreuses régulations post-transcriptionnelles impliquant la protéine HuR (Human Antigen R), une protéine de liaison aux ARNs[586,587]. Ces deux protéines sont connues pour être impliquées dans la lymphomagenèse liée à NPM-ALK dans les LAGC[588,589].

b. Rôle de miR-7 dans le cancer

De nombreuses publications rapportent les fonctions de miR-7 Ainsi, il est à la fois impliqué dans des processus de développement normaux, et dans de nombreuses pathologies, comme le cancer. Le plus souvent miR-7 est décrit comme un suppresseur de tumeur, notamment par sa capacité à cibler l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), ainsi que de nombreuses protéines participant aux voies de signalisation en aval de ce récepteur[581,590]. Son rôle en tant qu'oncogène a également été décrit, en particulier car son expression est augmentée dans divers cancers tels que le cancer colorectal[591] ou les NSCLC ALK-[592]. Son utilisation potentielle en tant que biomarqueur a été montrée dans différentes études. En effet, miR-7 est exprimé dans divers fluides corporels tels que le sérum, la salive, l'urine[593,594] et permet de prédire l'apparition de cancers colorectaux[595]. Différentes thérapies impliquant la modulation de

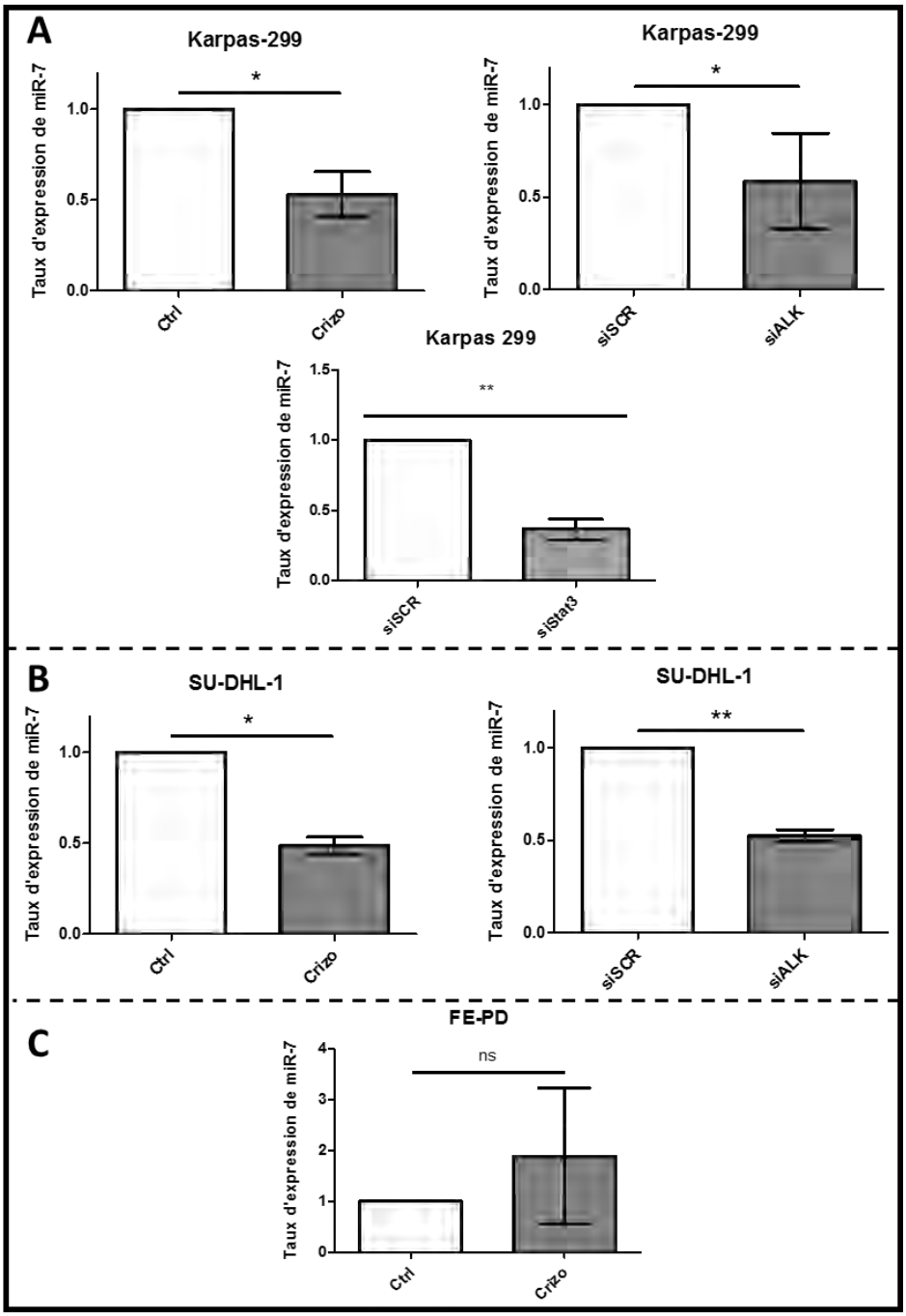


Figure 50 : Taux d'expression de miR-7 dans plusieurs lignées de LAGC NPM-ALK+

Mesure du niveau d'expression de miR-7 dans les cellules Karpas-299 (A) et dans les cellules SU-DHL-1 (B) (deux lignées cellulaires de LAGC NPM-ALK+,) ainsi que dans les cellules FE-PD (C) (lignée cellulaire de LAGC ALK-) sans traitement (Ctrl), après traitement par le Crizotinib (24h, 500nM), ou après transfection d'un siRNA contrôle (siSCR, 100nM) et d'un siRNA ciblant l'ARNm de ALK (siALK, 100nM) ou l'ARNm de STAT3 (siSTAT3, 100nM) pendant une durée de 72h. (Test statistique : T-test ; ns : non significatif, * : p<0,05, ** : p<0,01) *(Figure représentative de 3 expériences)*

l'expression de ce microARN sont actuellement envisagées : (1) une thérapie de remplacement de miR-7, durant laquelle ce microARN est administré de manière systémique, soit *via* des nanoparticules biodégradables[596], soit *via* une préparation liposomale[597] ou (2) l'activation de l'expression du microARN par de petites molécules comme la trichostatine A (TSA), une histone déacétylase qui permettrait l'augmentation de la transcription de ce microARN[598]. La combinaison thérapeutique de modulateurs de l'expression de miR-7 avec des inhibiteurs de tyrosine kinase a également déjà été proposée, car elle permettrait d'augmenter l'efficacité de ces thérapies ciblées. Ainsi plusieurs travaux ont montré que miR-7 permet notamment la potentialisation des effets de l'erlotinib, (un inhibiteur de la tyrosine kinase EGFR) dans les cancers de la tête et du cou[599], la potentialisation de l'apoptose induite par le paclitaxel (un poison des microtubules) dans les NSCLC ALK-[600] ainsi que la potentialisation des effets cytotoxiques du gefinitib (un inhibiteur de la tyrosine kinase EGFR) dans les NSCLC ALK-[601].

c. Cibles potentielles de miR-7

Les cibles de ce miR-7 sont très nombreuses et ont des fonctions très diverses. Parmi elles, certaines sont impliquées dans la machinerie de l'autophagie. Sur la base de données « Autophagy Regulation Network », six protéines participant à l'induction de l'autophagie sont proposées comme étant des cibles de miR-7. Il s'agit de l'EGFR, de HUWE1 (une E3 ubiquitine-ligase), de CDC5L (un régulateur du cycle cellulaire), de CIRH1A (impliquée dans la biogenèse des ribosomes), de CDC1 (une cycline) et de la protéine SMS (une spermine synthase impliquée dans la biosynthèse de polyamines). D'autres cibles ont déjà été validées dans la littérature telles que les protéines Bcl-2, RAF1 (ou c-Raf, une sérine thréonine kinase), PAK1 (ou p21, impliquée dans la reconnaissance du cytosquelette et dans la signalisation nucléaire), ABCC1 (une protéine impliquée dans la multi-résistance aux drogues), ou IRS1/2 (de la famille des récepteurs à l'insuline) (données provenant de la base de données miRTarBase : http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/).

Ces divers éléments de la littérature font de miR-7 un candidat idéal pour notre étude, c'est pourquoi nous avons décidé de nous intéresser à son rôle dans le phénotype cellulaire des LAGC NPM-ALK+ en réponse au crizotinib.

2 RESULTATS OBTENUS

2.1 Quel rôle pour le miR-7 dans le phénotype cellulaire ?

a. Dérégulation du miR-7 sous traitement au crizotinib

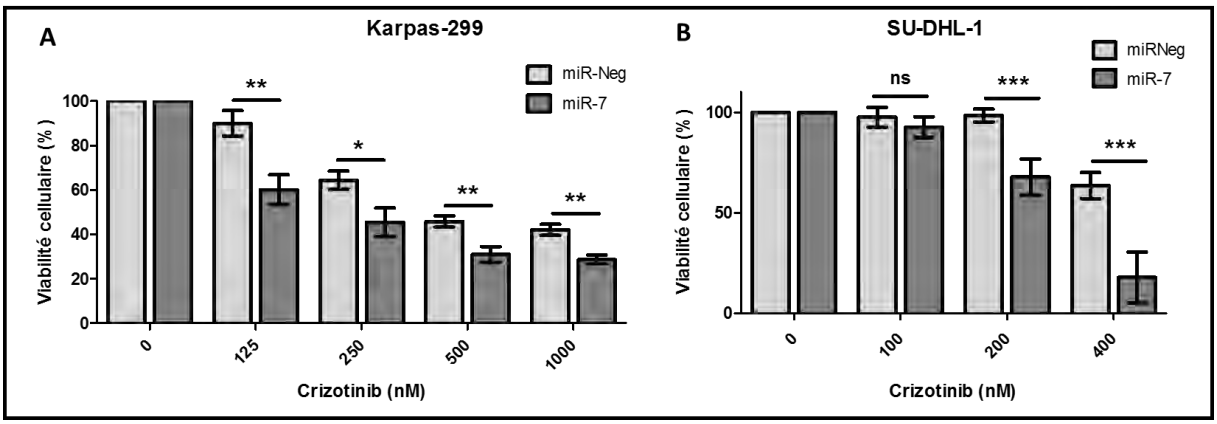


Figure 51 : Effet du traitement par le crizotinib combiné à la réexpression ectopique de miR-7 sur la viabilité de cellules de LAGC NPM-ALK+

Mesure de la viabilité cellulaire par test MTS dans les cellules Karpas-299 (A) et SU-DHL-1 (B) transfectées pendant 72h par un microARN contrôle (miR-Neg, 100nM) ou par miR-7 (100nM), et traitées pendant 48h par des doses croissantes de crizotinib (respectivement 125, 250 500 et 1000nM pour les Karpas-299, et 100, 200 et 400nM pour les SU-DHL-1). (Test statistique : T-test ; ns : non significatif, * : p<0,05, ** : p<0,01, *** : p<0.001) *(Figure représentative de 3 expériences).*

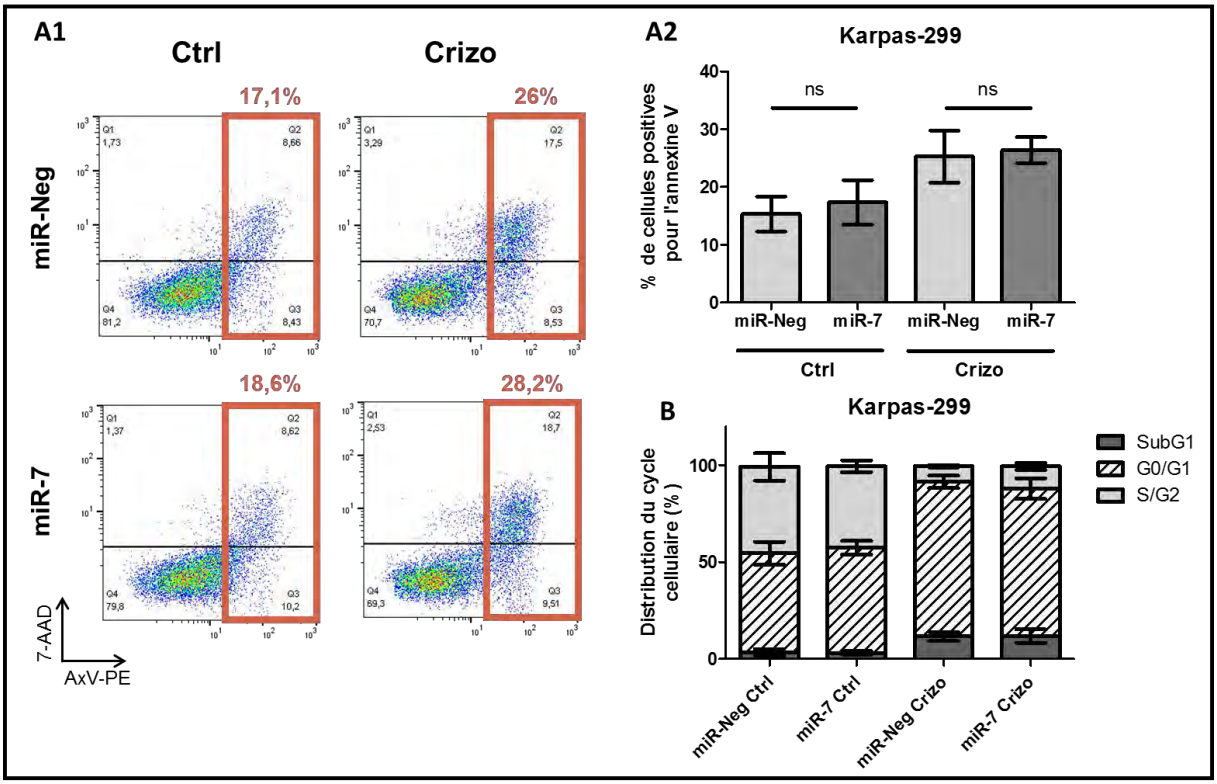


Figure 52 : Effet du traitement par le crizotinib combiné à la réexpression ectopique de miR-7 sur l'apoptose et sur le cycle de cellules de LAGC NPM-ALK+

Mesure de l'apoptose (A1 et A2) et du cycle cellulaire (B) par cytométrie en flux, de cellules Karpas-299 transfectées pendant 72h par un microARN contrôle (miR-Neg, 100nM) ou par miR-7 (100nM) et traitées ou non (Ctrl) par du crizotinib (500nM, 24h00, Crizo). (B) (Test statistique : T-test ; ns : non significatif) *(Figure représentative de 3 expériences)*

La diminution de miR-7 après inhibition de ALK à la fois pharmacologique (traitement par le crizotinib) et moléculaire (siARN ciblant l'ARNm de ALK) a été confirmée par qRT-PCR, dans deux lignées cellulaires différentes de LAGC NPM-ALK+ : les Karpas-299 (Figure 50A) et les SU-DHL-1 (Figure 50B). Le traitement de la lignée de LAGC ALK- (FE-PD), n'a quant à lui pas montré de diminution de miR-7 (Figure 50C).

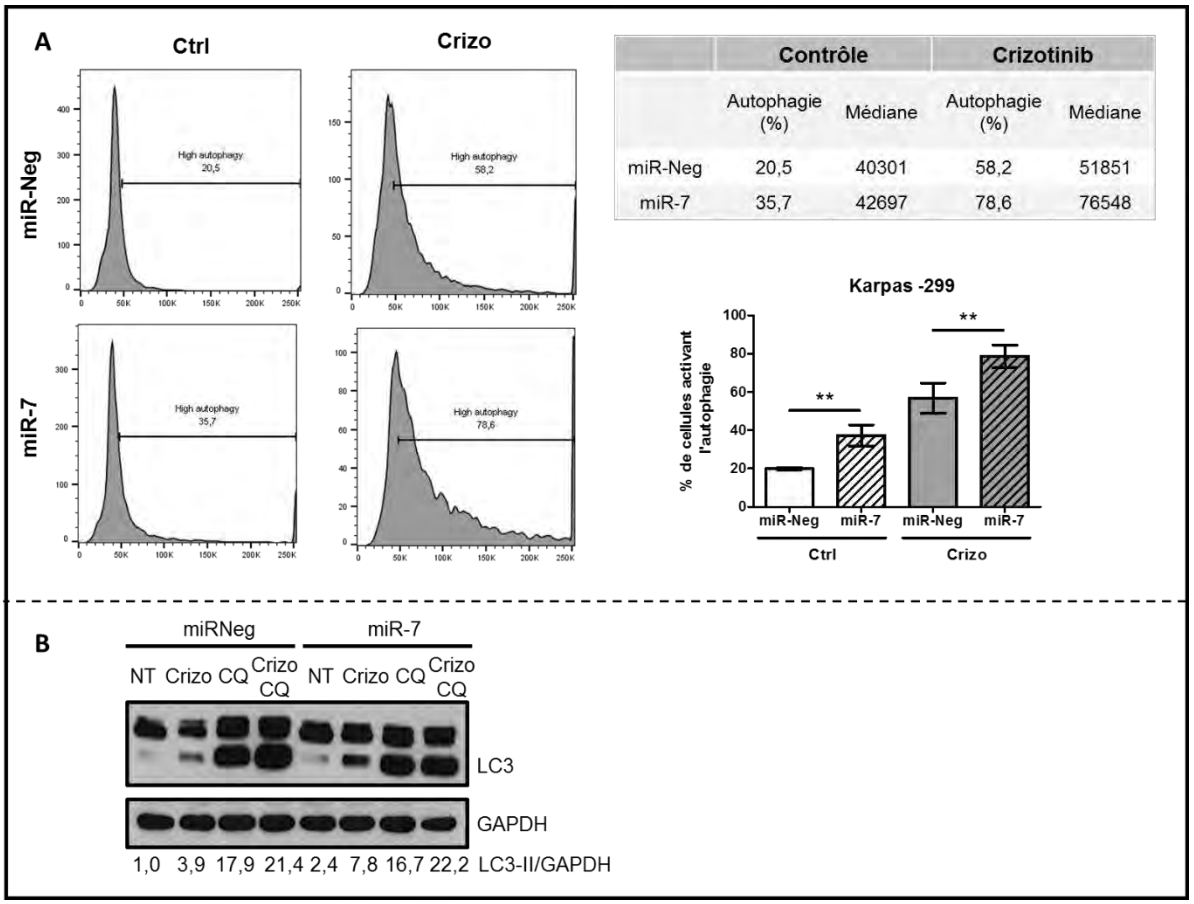
De façon intéressante, l'inhibition moléculaire du facteur de transcription STAT3 (siARN ciblant l'ARNm de STAT3) induit également la sous-expression du miR-7 dans la lignée cellulaire Karpas-299 (Figure 50A). La voie STAT3 est une des voies majeures activées en aval de l'oncogène NPM-ALK, et des sites de fixation pour ce facteur de transcription sur le promoteur du gène codant pour miR-7 ont été décrits (https://genome.ucsc.edu/). Ces éléments indiquent que la sous-expression de miR-7 dans les LAGC NPM-ALK+ pourrait être dépendante de l'inhibition du facteur de transcription STAT3. En effet, il est clairement établi que lors du traitement par le crizotinib, l'activité kinase de ALK est inhibée, ce qui empêcherait la phosphorylation de STAT3[98,602].

b. Effets de la réexpression ectopique du miR-7 dans les LAGC NPM-ALK+ :

Nous avons ensuite voulu évaluer les effets de la réexpression ectopique du miR-7 sur la viabilité des lignées cellulaires de LAGC NPM-ALK+. Les tests de viabilité cellulaire que nous avons réalisé ont montré que la réexpression de miR-7 dans des cellules Karpas-299 et SU-DHL-1 traitées par le crizotinib (48h, doses croissantes), permet de potentialiser les effets cytotoxiques de cet ITK (Figure 51). Ces résultats indiquent que le miR-7 joue un rôle suppresseur de tumeur dans les LAGC NPM-ALK+ en combinaison avec le traitement au crizotinib.

Afin de déterminer le mécanisme à l'origine de cette perte de viabilité, nous avons par la suite mesuré l'impact sur l'apoptose et sur le cycle cellulaire de la réexpression ectopique de miR-7 en combinaison ou non avec un traitement au crizotinib (500nM, 48h) (Figure 52). Par comparaison avec les cellules Karpas-299 transfectées par un miR-contrôle, nous avons observé que miR-7 seul n'induit pas d'augmentation de l'apoptose (on passe de 17 à 19% de cellules positives pour l'annexine V pour des cellules transfectées ou non par miR-7) (Figure 52 A1, et A2), ni d'arrêt du cycle cellulaire (marquage à l'iodure de propidium) (Figure 51B). Ces résultats sont semblables à ceux obtenus dans les conditions où la transfection de miR-7 est combinée à un traitement par le crizotinib. En effet, la réexpression ectopique de miR-7 ne potentialise pas les effets du crizotinib ni sur l'apoptose (26 versus 28% de cellules positives pour l'annexine V pour des cellules transfectées ou non par le miR-7) (Figure 52 A1 et A2), ni sur le blocage du cycle cellulaire (Figure 52B).

L'apoptose ou l'arrêt du cycle cellulaire ne permettant pas d'expliquer le phénotype observé en terme de viabilité cellulaire, nous nous sommes alors intéressés à d'autres mécanismes permettant l'induction de



	Contrôle		Crizotinib	
	Autophagie (%)	Médiane	Autophagie (%)	Médiane
miR-Neg	20,5	40301	58,2	51851
miR-7	35,7	42697	78,6	76548

Figure 53 : Effet de la réexpression ectopique de miR-7 avec ou sans traitement au crizotinib sur l'induction d'autophagie dans les cellules de LAGC NPM-ALK+

Mesure du flux autophagique par cytométrie en flux (A) et (B) par western blotting à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine LC3 et contre la GAPDH (contrôle de charge), en présence ou non de chloroquine (inhibiteur d'autophagie, CQ) (B) dans le clone cellulaire Karpas-299-RFP-GFP-LC3 transfecté par un microARN contrôle (miR-Neg, 100nM) ou par miR-7 (100nM) durant 72h et traité ou non (Ctrl) par le crizotinib (24h, 500nM, Crizo). (Test statistique : T-Test ; ** : p<0.01) *(Figure représentative de 3 expériences).*

la mort cellulaire, comme l'autophagie. Ainsi, à l'aide du clone Karpas-299-RFP-GFP-LC3, nous avons pu mesurer une induction d'autophagie d'environ 30% en moyenne (n=3) dans les cellules Karpas-299 transfectées avec le miR-7 et traitées au crizotinib par rapport à celles traitées et transfectées par un microARN contrôle (miR-Neg) (Figure 53A). Cette augmentation du flux autophagique est également observée dans les cellules transfectées avec le miR-7, en l'absence de tout traitement (Figure 53A). Ces observations ont été vérifiées par la détection de la protéine LC3 par western blotting, qui montre effectivement une induction du flux autophagique après transfection de miR-7 dans les cellules Karpas-299 traitées ou non par le crizotinib (500nM, 24h00) (accumulation de la protéine LC3-II en condition de blocage du flux autophagique et de transfection de miR-7) (Figure 53B).

c. Rôle potentiel de miR-7 dans le switch autophagique

La réexpression ectopique de miR-7 sous traitement au crizotinib permet donc une potentialisation du flux autophagique, associée à une potentialisation des effets cytotoxiques de l'ITK ciblant ALK. Ceci suggère l'induction d'une autophagie de type cytotoxique, dont l'existence a déjà été décrite dans de nombreux modèles tumoraux. Or, la première étude que nous avons menée indiquait, à l'inverse, l'induction d'une autophagie de type cytoprotectrice en réponse au traitement par le crizotinib. Nous avons donc émis l'hypothèse de l'existence d'un « switch » de fonction de l'autophagie, de la cytoprotection à la cytotoxicité, résultant de la réexpression du miR-7 dans les cellules de LAGC NPM-ALK+. Nous avons alors orienté notre étude sur la recherche d'ARNm cibles de miR-7, ce qui pourrait permettre d'éclaircir les mécanismes responsables de ce « switch ».

2.2 Recherche de cibles pour miR-7-5p

a. Le cas de Bcl-2 :

La protéine Bcl-2 est décrite comme étant une cible directe du miR-7 dans différents modèles tumoraux. Comme mentionné dans l'introduction, Bcl-2 peut se lier à Beclin 1 *via* son domaine BH3, et ainsi inhiber l'induction de l'autophagie. Certaines études ont montré son rôle de « frein moléculaire » de l'autophagie, car cette protéine permet de limiter l'intensité du flux induit en réponse à un stimulus, de par son contrôle de Beclin 1.

Des travaux antérieurs de notre équipe ont montré que dans les LAGC NPM-ALK+, l'expression de Bcl-2 était très faible comparée à des LAGC ALK- [603](Figure 54A). Cette observation est d'ailleurs surprenante, car Bcl-2 représente un oncogène majeur dans de nombreux types de cancers.

Nous avons également observé que le traitement des cellules de LAGC NPM-ALK+ par des doses croissantes de crizotinib (125, 250, 500, 1000 et 2000 nM) pendant 24h induisait la réexpression de Bcl-2 dans les lignées cellulaires de LAGC NPM-ALK+ Karpas-299 et SU-DHL-1 (Figure 54B),

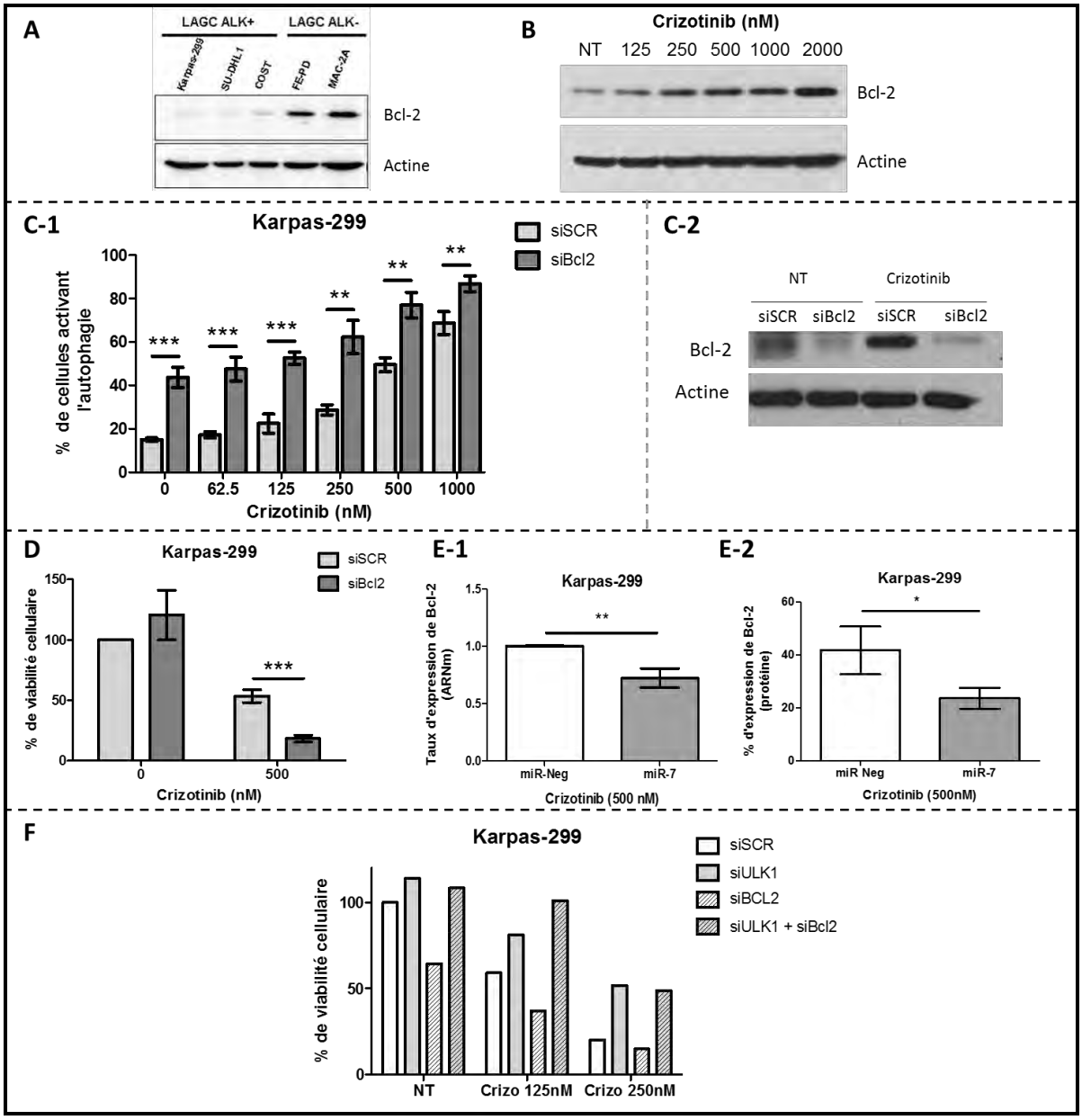


Figure 54 : Bcl-2 cible potentielle de miR-7-5p

(A) Mesure du niveau d'expression de la protéine Bcl-2 dans les lignées cellulaires de LAGC ALK+ (Karpas-299, SU-DHL-1 et COST) et ALK- (FE-PD et MAC2A). (B) Mesure du taux de d'expression de la protéine Bcl-2 par western blotting dans des cellules de LAGC NPM-ALK+ Karpas-299 traitées par le crizotinib (à 125, 250, 500, 1000 et 2000nM) pendant 24h (C-1) Mesure du flux autophagique dans le clone cellulaire Karpas-299-RFP-GFP-LC3 transfecté durant 72h par un contrôle (siSCR, 100nM) ou par un siRNA ciblant l'ARNm de Bcl-2 (siBcl2, 100nM) puis traitées ou non (NT) par des doses croissantes de crizotinib (62.5, 125, 250 ou 500 nM) pendant 24h. (efficacité d'inhibition présentée en C-2). (D) Mesure de la viabilité cellulaire par test MTS de cellules Karpas-299 transfectées ou non par un contrôle (siSCR, 100nM) ou un siARN ciblant l'ARNm de Bcl-2 (siBcl2, 100nM) durant 72h, et traitées ou non par 500nM de crizotinib pendant 48h. (E) Mesure du taux d'expression de l'ARNm codant pour la protéine Bcl-2 par RT-qPCR (E-1) et de la protéine Bcl-2 par marquage intracellulaire par cytométrie en flux (E-2) de cellules Karpas-299 transfectées par un contrôle (miR-Neg, 100nM) ou par miR-7 (100nM) pendant 72h puis traitées par le crizotinib (500nM, 24h). (F) Mesure de la viabilité cellulaire par test MTS de cellules Karpas-299 transfectées par un contrôle (siSCR, 100nM), par siARN ciblant l'ARNm de ULK1 (siULK1, 100nM), par siARN ciblant l'ARNm de Bcl-2 (siBcl-2, 100nM), ou par les deux (siULK1 + siBcl2) durant 72h et traitées ou non (NT) par le crizotinib (125 ou 250nM, 48h). (Test statistique : T-Test ; * : p<0.05 ; ** : p<0.01 ; *** : p<0.001) *(Les panels A, B, C, D et E sont représentatifs de 3 expériences, le panel F est un résultat préliminaire).*

accompagnée de l'induction d'autophagie cytoprotectrice décrite dans l'article publié dans Oncotarget. Cette réexpression de Bcl-2 pourrait servir de rhéostat, et empêcher l'induction massive de l'autophagie par séquestration de la protéine Beclin 1. Afin de tester cette hypothèse, nous avons inhibé l'expression de Bcl-2 dans le clone cellulaire Karpas-299-RFP-GFP-LC3 traité ou non par des doses croissantes de crizotinib (62.5, 125, 250, 500 et 1000 nM) pendant 24h, et nous avons mesuré le flux autophagique par cytométrie en flux. Nous avons ainsi observé que l'inhibition moléculaire de Bcl-2 seule (siARN ciblant l'ARNm de Bcl-2), entrainait une induction du flux autophagique, et qu'en combinaison avec un traitement au crizotinib, elle permettait une induction du flux autophagique plus forte que l'inhibiteur de ALK seul (Figure 54C). Bcl-2 permettrait donc de freiner l'intensité de l'autophagie induite en réponse à l'inhibition de NPM-ALK (par traitement au crizotinib). Cette régulation se ferait vraisemblablement par la régulation négative de la protéine Beclin 1 (données non présentées dans ce manuscrit).

Afin de vérifier si l'inhibition de la protéine Bcl-2 permettait de mimer le phénotype obtenu après réexpression ectopique de miR-7 dans les cellules de LAGC NM-ALK+ Karpas-299, nous avons effectué des tests de viabilité cellulaire (test MTS) combinant l'inhibition moléculaire de Bcl-2 par un siARN ciblant son ARNm (siBcl2), à un traitement par le crizotinib (500nM, 48h). Nous avons ainsi observé que le siBcl-2 entraine la potentialisation des effets cytotoxiques du crizotinib. En effet, la viabilité cellulaire passe de 50% après traitement au crizotinib à 10% après traitement au crizotinib combiné à l'inhibition de Bcl-2 (Figure 54D). Les résultats obtenus avec le siARN dirigé contre l'ARNm de Bcl2 semblent parfaitement superposables avec ceux obtenus après réexpression ectopique de miR-7 (Figure 51A). Nous avons donc émis l'hypothèse que miR-7 était un régulateur négatif de l'expression de Bcl-2 dans les cellules de LAGC NPM-ALK+. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons mesuré le niveau d'expression de la protéine Bcl-2 avant et après transfection de miR-7. Nous avons ainsi observé la diminution de l'expression de la protéine Bcl-2 lors de la transfection du miR-7 couplée à un traitement au crizotinib (Figure 54E).

Cependant, ces observations ne traduisent que des relations indirectes entre le miR-7 et Bcl-2. Pour montrer l'interaction directe entre miR-7 et l'ARNm codant pour la protéine Bcl-2, nous avons effecuté des expériences d'immunoprécipitation à la biotine (« biotin-pulldown assay ») utilisant un miR-7 biotinylé (miR-7-Bt). Nous avons ainsi transfecté des cellules de LAGC NPM-ALK+ Karpas-299 soit par une forme biotinylée de miR-7 humain, soit par une forme biotinylée de miR-39 de c.elegans (cel-miR-39, contrôle négatif non exprimé dans des lignées cellulaires humaines). Ces microARNs ont ensuite été précipités via la biotine sur des billes de streptavidine environ 18h après transfection. Les ARNm co-purifiés ont ensuite été extraits et analysés par RT-qPCR avec des amorces spécifiques pour la GAPDH (contrôle négatif) ou pour Bcl-2. Ces expériences ont révélé que l'ARNm codant pour Bcl-2 n'est pas co-purifié en présence de miR-7-Bt, tout comme l'ARNm codant pour la GAPDH (données non présentées dans le manuscrit).

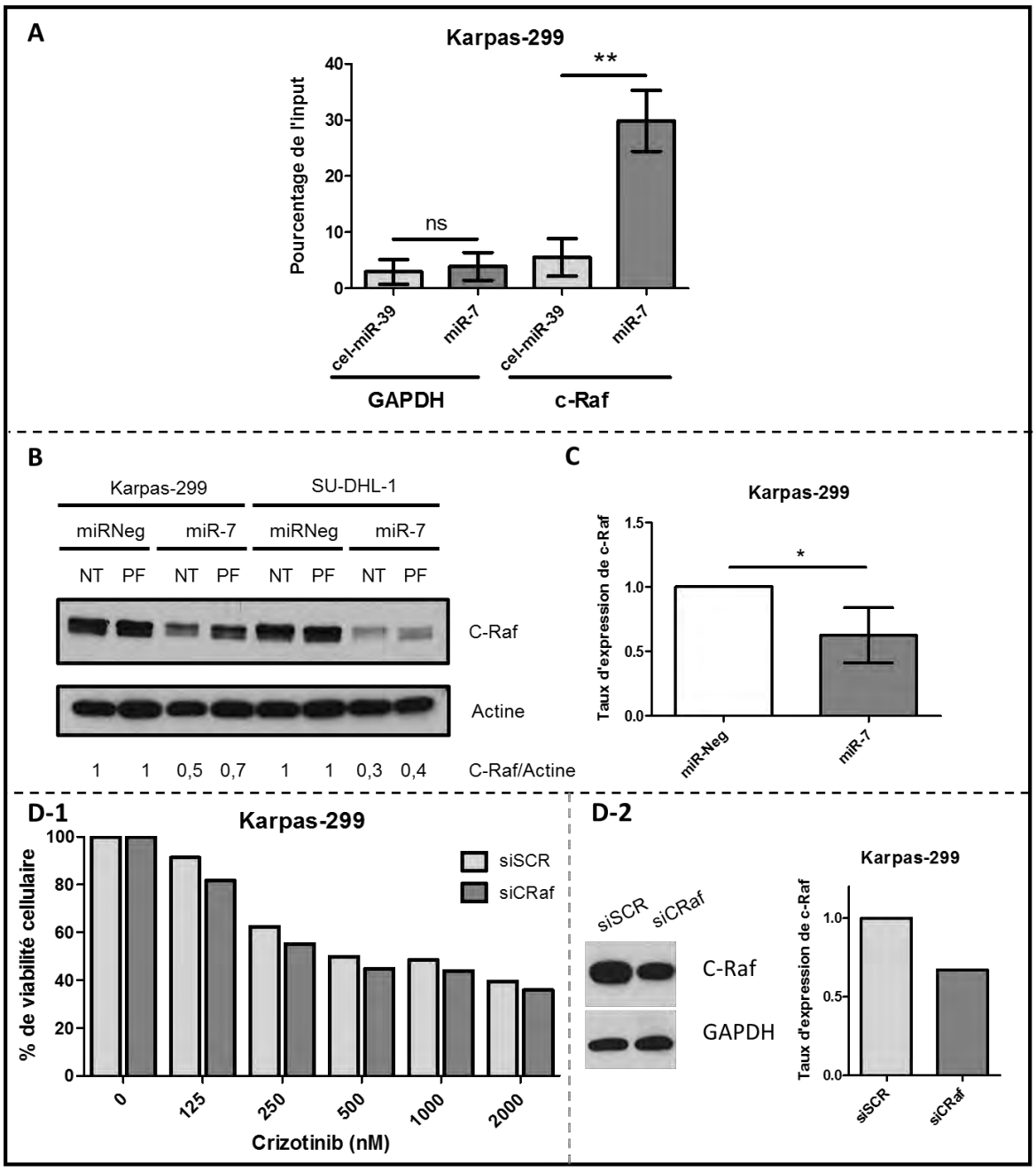


Figure 55 : c-Raf est une cible directe de miR-7 dans les LAGC NPM-ALK+

(A)Quantification par RT-qPCR des ARNm codants pour les protéines GAPDH et c-Raf par co-purifiées par précipitation avec un miR-7 biotinylé (miR-7-Bt) ou avec un miR-39 de c.elegans biotinylé (cel-miR-39, n'ayant pas de cible dans les lignées cellulaires humaines). Les cellules Karpas-299 ont été transfectées par un microARN contrôle biotinylé (cel-miR-39, 40nM) ou par le miR-7 biotinylé (miR-7, 40nM) pendant 18h. (B) Mesure du niveau d'expression des protéines c-Raf et GAPDH (contrôle de charge) par western blotting dans les cellules Karpas-299 et SU-DHL-1 transfectées par un microARN contrôle (miR-Neg, 100nM) ou par le miR-7 (100nM) pendant 72h et traitées ou non par le crizotinib (PF, 500nM, 24h). (C) Mesure du niveau d'expression de l'ARNm codant pour la protéine c-Raf par RT-qPCR dans des cellules Karpas-299 transfectées par un contrôle (miR-Neg, 100nM) ou par miR-7 (100nM) pendant 72h. (D-1) Mesure de la viabilité cellulaire par test MTS dans les cellules Karpas-299 transfectées à deux reprises, à 24h d'intervalle par un contrôle (siSCR, 100nM) et par un siARN ciblant l'ARNm de c-Raf (siCRaf, 100nM) pour une durée totale de 72h de transfection, et traitées ou non par des doses croissantes de crizotinib (125, 250, 500, 1000 et 2000nM pendant 48h). L'efficacité de transfection a été évaluée par western blotting ainsi que par RT-qPCR (D-2). (Test statistique : T-Test ; * : $p<0.05$; ** : $p<0.01$) *(Figure représentative de 3 expériences).*

Nos résultats n'ont donc pas permis de mettre en évidence une interaction directe entre l'ARNm de Bcl-2 et miR-7.

L'observation du « switch » entre une autophagie de survie et une autophagie de mort dans les LAGC NPM-ALK+ est un phénomène intriguant, que l'on ne peut donc pas expliquer par une interaction directe entre miR-7 et Bcl-2. Afin de confirmer que l'autophagie cytotoxique est bien le mécanisme responsable de la perte de viabilité des cellules, nous avons effectué des tests de viabilité cellulaire dans lesquels nous avons couplé l'inhibition de Bcl2 (siARN ciblant l'ARNm de Bcl-2) avec l'inhibition de l'autophagie (siARN ciblant l'ARNm de ULK1) et avec un traitement par le crizotinib (125 ou 250nM, 48h). Les résultats de ces tests révèlent que dans la lignée de LAGC NPM-ALK+ Karpas-299, l'inhibition de l'autophagie seule n'impacte pas sur la viabilité cellulaire, à l'inverse de l'inhibition de Bcl-2 (siARN ciblant l'ARNm de Bcl2) qui entraine une diminution de la viabilité cellulaire, plus importante encore en condition de traitement au crizotinib (Figure 54F). Nous avons également observé que l'inhibition conjointe de Bcl-2 et de l'autophagie permet d'inverser les effets de l'inhibition de Bcl2 seule, et ce en présence ou non du traitement par le crizotinib (Figure 54F). Nos résultats préliminaires laissent donc suggérer que l'inhibition de Bcl-2 combinée au traitement par le crizotinib entraine l'induction d'une autophagie cytotoxique, dont le blocage permet de préserver la viabilité cellulaire. L'ensemble des travaux impliquant la protéine Bcl-2 a été réalisé en collaboration avec Avédis Torossian et Estelle Espinos au sein de notre équipe, et sont l'objet d'un manuscrit en cours de rédaction.

b. Le cas de RAF1 :

Afin de déterminer quelles pourraient être les cibles directes de miR-7, nous avons effectué d'autres expériences d'immunoprécipitation utilisant une version biotinylée de miR-7 (miR-7-Bt). Pour cela, comme décrit précédemment, les cellules de LAGC NPM-ALK+ Karpas-299 ont été transfectées soit par une forme humaine biotinylée de miR-7, soit par un microARN biotinylé de c.elegans (cel-miR-39 , contrôle négatif non exprimé dans les lignées cellulaires humaines). Nous avons ensuite analysé les ARNm co-précipités RT-qPCR, par des amorces spécifiques de la GAPDH (contrôle négatif) et de c-Raf. Nous avons observé que l'ARNm codant pour la protéine c-Raf était significativement co-purifié avec le miR-7-Bt ($p<0.01$), mais pas avec le cel-miR-39-Bt (Figure 55A). A l'opposé, nous n'avons pas observé d'enrichissement de l'ARNm de la GAPDH dans la précipitation effectuée avec le miR-7-Bt par rapport à celle effectuée à l'aide du cel-miR-39 (Figure 55A). Nous avons confirmé ces résultats par des expériences de réexpression ectopiques du miR-7 dans les cellules de LAGC NPM-ALK+ Karpas-299. En effet, nous avons observé la sous-expression à la fois de l'ARNm et de la protéine c-Raf dans après transfection du miR-7 par rapport aux cellules transfectées par le microARN contrôle (Figure 55B et 55C).

Nous avons ensuite voulu vérifier que l'inhibition de c-Raf par un siARN permettait de reproduire les résultats obtenus après réexpression ectopique du miR-7. Pour cela, nous avons effectué des tests de viabilité cellulaire combinant l'inhibition moléculaire de c-Raf par un siARN (deux transfections successives, 72h d'inhibition au total), au traitement par le crizotinib à plusieurs doses (125, 250, 500, 1000 et 2000nM) pendant 48h. Nous avons observé une très faible potentialisation des effets cytotoxiques du crizotinib par l'inhibition de c-Raf : la différence maximale en termes de viabilité cellulaire entre ces deux conditions est seulement de 10% (Figure 55D). Ces résultats pourraient néanmoins être expliqués par l'inhibition moléculaire incomplète de c-Raf aussi bien au niveau protéique qu'au niveau de l'ARNm (Figure 55D, panels de droite), et ce même après deux transfections successives du siARN ciblant l'ARNm de c-Raf, dans le but de maximiser son inhibition. Ce résultat doit bien sûr être reproduit et confirmé, notamment avec une meilleure inhibition de c-Raf (inhibiteur pharmacologique, sh-ARN).

DISCUSSION GENERALE PERSPECTIVES

L'étude du rôle de l'autophagie dans l'oncogenèse ainsi que dans la résistance des cellules tumorales à divers traitements est en plein essor, comme en témoignent le nombre grandissant de publications portant sur ce sujet et d'équipes traitant de cette thématique. L'autophagie a été initialement décrite comme un processus de dégradation cellulaire. Cependant, par la suite, son implication dans de nombreux processus cellulaires clefs ainsi que dans plusieurs pathologies (dont le cancer) a été démontrée, ce qui en fait une bonne cible thérapeutique potentielle.

L'intérêt de notre équipe pour les Lymphomes Anaplasiques à Grandes Cellules exprimant l'oncogène ALK (LAGC ALK+) est historique, car notre groupe associe depuis toujours des chercheurs et des hospitalo-universitaires impliqués dans le diagnostic des hémopathies.

Les LAGC représentent environ 1 à 2 % des lymphomes non hodgkiniens chez l'adulte et 10 à 20% des lymphomes de l'enfant ce qui en fait le lymphome pédiatrique le plus fréquent. C'est un lymphome de type T, rare et agressif et fréquemment associé à la translocation réciproque t(2;5)(p23;q35) (70 à 80% des cas). Cette anomalie chromosomique implique le gène de la nucléophosmine (*NPM1*) situé en 5q35 et le gène *ALK* (*Anaplastic Lymphoma Kinase*), en 2p23 qui code un récepteur à activité tyrosine kinase[39]. Cette translocation conduit à l'expression d'une protéine chimérique, NPM-ALK, constituée du domaine de dimérisation de NPM et de la partie intracellulaire de ALK contenant son domaine tyrosine kinase. Dans les LAGC, l'activation constitutive de la protéine de fusion NPM-ALK (LAGC NPM-ALK+) représente un événement majeur dans l'oncogenèse.

Le traitement de première intention de cette pathologie repose sur une polychimiothérapie de type CHOP (cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine et prednisone) permettant la rémission d'environ 75% des patients. A l'opposé, les rechutes le plus souvent très agressives, laissent les cliniciens dans une impasse thérapeutique. C'est dans ce contexte que l'étude du rôle de l'autophagie dans la réponse aux drogues nous a donc semblé ouvrir de nouvelles pistes thérapeutiques dans le but de diminuer l'incidence des rechutes ou de mieux traiter les patients. Ainsi au cours de ma thèse j'ai pu montrer que :

1. Le traitement de cellules de LAGC NPM-ALK+ par le crizotinib, un inhibiteur ciblant la tyrosine kinase (ITK) ALK, entraine l'induction d'autophagie cytoprotectrice
2. Cette autophagie cytoprotectrice est également induite en réponse à des traitements par des ITK de ALK de seconde génération (brigatinib, alectinib, ceritinib, NVP-TAE)
3. A l'opposé, la doxorubicine et la vinblastine (deux molécules faisant partie des chimiothérapies) n'entrainent pas d'induction d'autophagie.

Ces observations nous ont ensuite poussées à nous intéresser aux mécanismes moléculaires de régulation du flux autophagique dans les cellules de LAGC NPM-ALK+. Notre laboratoire disposant

d'une expertise dans l'étude de différents types d'ARN non codants, en particulier pour les microARNs, nous avons porté notre attention sur ces nouveaux régulateurs négatifs de l'expression de gènes cibles, très souvent dérégulés dans de nombreux cancers. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que :

4. Le microARN miR-7 est sous-exprimé après inhibition de ALK par traitement au crizotinib dans des lignées cellulaires de LAGC NPM-ALK+
5. La réexpression ectopique de miR-7 induit la transition entre une autophagie de type cytoprotectrice vers une autophagie de type cytotoxique, phénomène appelé « switch autophagique »
6. Ce switch autophagique dans les LAGC NPM-ALK+ peut être médié par la régulation de deux cibles principales qui sont les protéines Bcl-2 (un régulateur majeur de l'apoptose et de l'autophagie) et c-Raf (une protéine impliquée dans la voie des MAPK).

Traitements des LAGC NPM-ALK+ et induction d'autophagie

Le rôle cytoprotecteur de l'autophagie en réponse à l'inhibition de ALK a été confirmé dans différents autres modèles de tumeurs solides comprenant soit des translocations impliquant le gène ALK, soit la protéine ALK pleine taille (mutée ou surexprimée dans les neuroblastomes). On peut notamment citer l'étude menée par le groupe du Dr Ren qui a démontré que l'induction de l'autophagie contribue à la résistance de cellules de NSCLC EML4-ALK+ au crizotinib[604]. Cependant, dans cette étude, on constate que les cellules traitées par de très fortes doses de crizotinib (1 à 8 μM) n'expriment plus l'oncogène EML4-ALK. Ceci sous-entend que l'effet du crizotinib sur l'autophagie dans ce modèle n'est pas dû à l'inhibition de EML4-ALK mais à une action sur d'autres cibles potentielles telles que c-Met (Hepatocyte Growth Factor Receptor), une kinase fortement exprimée dans les cellules de NSCLC. Deux autres études ont également décrit l'induction de l'autophagie en réponse à l'inhibition de l'activité kinase de ALK pleine taille par l'entrectinib ou l'AZD3463, deux ITK de seconde génération ciblant ALK[605,606]. Cependant seule l'étude utilisant l'entrectinib a mis en évidence le caractère cytoprotecteur de cette autophagie et le potentiel bénéfice thérapeutique de l'utilisation d'inhibiteurs d'autophagie dans les neuroblastomes.

Contrairement aux ITK ciblant ALK, nous avons montré que les traitements par chimiothérapies ne semblent pas induire d'autophagie dans les LAGC NPM-ALK+. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la doxorubicine (incluse dans le traitement CHOP) et à la vinblastine (une molécule prometteuse dans le traitement des LAGC NPM-ALK+).

Dans la littérature, le rôle de la doxorubicine sur l'autophagie est décrit comme ambivalent. Cette molécule est connue pour présenter de forts effets cytotoxiques sur les cardiomyocytes notamment

par l'induction d'autophagie cytotoxique dans ces cellules[607]. De nombreuses autres études décrivent également l'induction de flux autophagique en réponse à ce traitement[608,609]. Cependant, les travaux du groupe du Dr Yokochi montrent que la doxorubicine n'induit pas d'autophagie dans le lymphome de Hodgkin, même si la méthode de mesure de l'autophagie dans cette étude reste peu convaincante, car elle ne consiste qu'en l'observation de « punctas LC3 » par microscopie de fluorescence[609]. Dans les lignées cellulaires de LAGC NPM-ALK+, nous avons montré que le traitement à la doxorubicine induit environ 10% de flux autophagique quels que soient les doses utilisées ou le temps de traitement, ce qui n'est en aucun cas comparable au flux autophagique induit par les ITK ciblant ALK sur ces mêmes cellules et qui correspondrait à cette dernière étude. Ce résultat reste toutefois à confirmer par d'autres techniques de mesure du flux autophagique.

La vinblastine est un poison du fuseau mitotique et empêche la polymérisation de la tubuline en microtubules. Une des fonctions principale de ces derniers est de faciliter le trafic vésiculaire au sein des cellules : ils jouent ainsi un rôle important dans le processus d'autophagie[610]. Ainsi, classiquement, la vinblastine est décrite pour induire l'accumulation d'autophagosomes car son action sur les microtubules empêche la fusion entre ces vésicules et les lysosomes[611,612]. D'autres études contradictoires ont cependant montré que le traitement à la vinblastine n'empêchait pas les hydrolases d'entrer dans les autophagosomes mais permettait d'accélérer leur formation[613]. Le rôle de la vinblastine sur la régulation de l'autophagie dans les hémopathies n'est à ce jour pas documenté, nos résultats ne peuvent donc pas être comparés à des résultats préexistants dans d'autres lymphomes ou leucémies et restent encore à confirmer par des techniques complémentaires permettant la mesure du flux autophagique.

La comparaison de l'effet des ITK ciblant ALK (de première et de seconde génération) et des chimiothérapies sur le flux autophagique est intéressante car elle permet de mettre en évidence que la réponse autophagique n'est pas enclenchée de la même manière pour tous les stress thérapeutiques. Ces résultats ont été obtenus sur des lignées cellulaires de LAGC NPM-ALK+ et il serait intéressant de les reproduire dans le modèle de lymphome murin conditionnel exprimant NPM-ALK dont nous disposons au laboratoire[75]. Au niveau de la signalisation cellulaire, la grande différence entre ces deux types de traitement est, comme nous l'avons montré, que les ITK ciblant ALK entrainent l'inhibition de la voie mTOR, un régulateur négatif de l'autophagie, alors que les chimiothérapies (notamment la doxorubicine), n'ont aucun effet sur cette voie. Il faut garder à l'esprit que les cellules cancéreuses développent un métabolisme particulier et sont la plupart du temps insensibles aux signaux de croissance extracellulaires. En effet, l'activation constitutive de kinases oncogéniques permet l'activation de signaux de croissance intrinsèques (voies de signalisation) qui miment l'entrée de facteurs de croissance dans les cellules[614]. Ce phénomène est plus connu sous le nom d'addiction

oncogénique[615]. Dans les LAGC NPM-ALK+, la tyrosine kinase NPM-ALK est constitutivement activée et représente un oncogène fort, activant de nombreuses voies de signalisation permettant la croissance cellulaire (voir introduction, chapitre 1, partie 4.3). Ainsi, l'inactivation de cet oncogène par des thérapies ciblées spécifiques, mime une déprivation des cellules en énergie, qui est un signal connu pour activer l'autophagie en particulier *via* l'inhibition de la voie mTOR[614]. Cette hypothèse permettrait d'expliquer la différence de flux autophagique induit en réponse aux ITK ou aux chimiothérapies dans les cellules de LAGC NPM-ALK+. Elle est confortée par le fait que l'induction d'autophagie en réponse à l'inhibition d'oncogènes forts est retrouvée dans plusieurs types de cancers, tels que dans les leucémies myéloïdes chroniques exprimant la tyrosine kinase oncogénique Bcr-Abl[616] ou dans les NSCLC ALK- exprimant l'oncogène c-Met[617].

Ainsi, l'intensité du flux autophagique peut varier en fonction du stress thérapeutique auquel la cellule tumorale est confrontée, variation ayant pour but ultime l'adaptation de la cellule à ces stress. L'autophagie est donc un phénomène dynamique et très sensible, ce qui la rend difficile à évaluer avec précision. Le développement d'outils permettant une analyse fiable et reproductible du flux autophagique dans les cellules de LAGC NPM-ALK+ était donc une priorité. C'est dans ce but que nous nous sommes attachés à l'adaptation d'un outil de mesure du flux autophagique par cytométrie en flux développé par le groupe du Dr Thorburn[343] dans les lignées cellulaires de LAGC NPM-ALK+ (le clone Karpas-299-RFP-GFP-LC3). La caractérisation de cet outil a révélé qu'il permettait une analyse reproductible et quantitative du flux autophagique ainsi que la réduction des biais de mesure dus à la technique du western blotting (« LC3 turnover assay »). De plus, cet outil est particulièrement adapté aux modèles cellulaires de LAGC-NPM-ALK+ qui sont des lymphocytes T cultivés en suspension et donc faciles à analyser par cytométrie en flux[618]. Cependant, malgré son utilité au laboratoire, cette technique de mesure du flux autophagique n'est pas applicable chez les patients, car elle implique l'apport exogène d'une protéine de fusion.

La mise au point de techniques permettant la détection et la quantification du flux autophagique chez les patients de façon fiable et reproductible est actuellement un point d'intérêt principal dans le domaine. Le développement de telles techniques s'inscrit d'ailleurs dans les nombreux objectifs d'un projet européen COST (European Cooperation in Science and Technology) appelé TRANSAUTOPHAGY qui inclut des patients atteints d'hémopathies malignes parmi d'autres pathologies[619].

Actuellement, les possibilités de détection de l'autophagie chez les patients se limitent à l'analyse microscopique et/ou biochimique de biopsies provenant de tissus tumoraux (principalement sous forme de blocs fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE)), ou alors à l'analyse du sang périphérique de ces patients (ces deux types de prélèvements étant majoritairement disponibles dans les collections

des centres de ressources biologiques). La technique de référence de visualisation de l'autophagie est la microscopie électronique, qui permet la visualisation et la quantification des autophagosomes. Cependant, cette technique n'est pas applicable en routine car elle est coûteuse, peu rapide à mettre en place et qu'elle ne permet pas d'analyser les échantillons FFPE[620,621]. L'équipe du Pr Tschan a récemment mis en place une technique d'immunohistochimie (IHC), combinant la visualisation des protéines LC3 et p62 sur coupe FFPE[353]. Cette méthode standardisée permet une quantification reproductible et fiable de l'autophagie, applicable à de larges collections d'échantillons et qui pourrait donc être utilisée en clinique et en particulier pour les LAGC ALK+, pour lesquels nous disposons de prélèvements ganglionnaires FFPE au diagnostic. Une autre étude a montré que la présence de cytokines ou chimiokines sécrétées dans le sang périphérique telles que l'IL1β (Interleukine 1 β), la CXCL8 (chemokine (C-X-C motif) ligand 8, ou interleukine 8), le LIF (leukemia inhibitory factor), le DKK3 (dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 3) et la FAM3C (family with sequence similarity 3, member C) pouvait varier en fonction du statut autophagique chez les patients atteints de mélanomes[354]. Une étude de notre groupe publiée en 2012 a montré que les lignées cellulaires de LAGC NPM-ALK+ sécrètent la protéine HMGB1 (high-mobility-group Box-1), une protéine, qui entraine à son tour la sécrétion d'interleukine 8 par des kératinocytes environnants[622]. Le taux d'IL8 sérique a d'ailleurs été associé à une dissémination leucémique du lymphome[622]. L'étude de l'expression de l'IL8 dans des échantillons sanguins de patients atteints de LAGC NPM-ALK+ pourrait donc également permettre de proposer cette interleukine comme biomarqueur potentiel, permettant d'évaluer l'induction de l'autophagie dans les LAGC NPM-ALK+.

Rôle de l'autophagie en réponse à différents traitements

La mesure de l'intensité du flux autophagique chez les patients n'apporte cependant pas toutes les informations utiles au développement de thérapies personnalisées ciblant l'autophagie. En effet, en plus du niveau d'intensité du flux autophagique, il est nécessaire de déterminer le rôle de cette autophagie chez les patients, afin de pouvoir établir une stratégie d'inhibition de ce flux (s'il est cytoprotecteur) ou au contraire d'activation (s'il est cytotoxique).

Les mécanismes permettant d'expliquer la fonction cytoprotectrice de l'autophagie dans les LAGC NPM-ALK+ sont encore inconnus. Dans la littérature, il est proposé que ce mécanisme passe majoritairement par une diminution de la sensibilité des cellules à l'apoptose[623–629].

Certaines études montrent que l'autophagie permet d'inhiber l'apoptose en réduisant la quantité de protéines pro-apoptotiques dans le cytosol. Par exemple, dans le cancer du côlon, l'équipe du Dr Rabinowich a montré que l'autophagie induite en réponse à TRAIL (tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand), un récepteur de mort, contrebalance l'apoptose induite simultanément,

car elle entraine la séquestration de la caspase 8 dans les autophagosomes, empêchant ainsi son effet pro-apoptotique[627]. Il est intéressant de noter qu'une étude publiée par le groupe du Dr Vitale en 2004 démontre que les cellules NK et les lymphocytes T CD8+ activés prélevés sur des donneurs sains, expriment TRAIL et son récepteur, mais que celui-ci ne présente aucune activité cytotoxique dans ces cellules[630]. Il pourrait donc être intéressant de déterminer si la caspase 8 est présente dans les autophagosomes dans les lignées cellulaires de LAGC NPM-ALK+.

Une autre des fonctions majeures de l'autophagie est la régulation de la dégradation de divers organites cellulaires et en particulier des mitochondries (mitophagie, voir introduction chapitre 3 partie 1.3.b). Il a notamment été montré que l'induction d'autophagie par un traitement à la rapamycine permettait de réduire la masse mitochondriale cellulaire de près de 60%[545]. Indirectement, ce phénomène entraine la diminution de molécules pro-apoptotiques contenues dans ces organites, telles que le cytochrome C[631] ainsi que la réduction de la formation d'Espèces Réactives de l'Oxygène (EROs)[632]. Une forte augmentation d'autophagie permettrait donc de mieux évacuer de potentiels inducteurs de l'apoptose et ainsi de protéger les cellules. Cependant, il faut noter que le traitement de cellules de LAGC NPM-ALK+ par la rapamycine, entraine un arrêt du cycle cellulaire ainsi qu'une induction d'apoptose massive[633] et que le ciblage de la voie mTOR par cette thérapie est sérieusement envisagé en clinique[634]. Cet effet cytotoxique de la rapamycine sur les lignées cellulaires de LAGC NPM-ALK+ peut être expliqué par le fait que la voie mTOR est très fortement activée en aval de l'oncogène ALK, ce qui en fait une voie essentielle au développement et à la croissance tumorale. Son inhibition est certainement délétère dans ce cas à cause du phénomène d'addiction oncogénique déjà évoqué précédemment. Le rôle de l'autophagie en réponse au traitement de cellules de LAGC NPM-ALK+ par la rapamycine reste donc encore à déterminer.

Enfin, il est intéressant de mentionner une nouvelle fonction émergente attribuée aux autophagosomes, qui ont été décrits comme constituant une véritable plateforme de signalisation cellulaire dans plusieurs études[629,635–637]. Les travaux du groupe du Dr Singh publiés en 2013 décrivent le rôle de l'autophagie dans l'activation de la voie ERK, une voie généralement impliquée dans la promotion de la croissance cellulaire, et activée en aval de nombreux oncogènes, dont NPM-ALK (voir introduction, chapitre 1, partie 4.3). Ce groupe a notamment démontré que les protéines MEK et ERK participant à cette cascade de signalisation pouvaient interagir avec les protéines Atg au niveau des autophagosomes, et que cette interaction était nécessaire pour leur activation. L'inhibition de la formation de ces structures autophagiques entrainerait donc la diminution de la phosphorylation de ERK[629]. L'induction de la formation d'autophagosomes pourrait ainsi permettre d'augmenter l'activation de voies de signalisation entrainant la promotion de la croissance tumorale, ce qui pourrait contribuer au rôle cytoprotecteur de l'autophagie. Afin de tester cette hypothèse, il serait intéressant

de visualiser la colocalisation de protéines de la voie ERK avec celles impliquées dans la formation de l'autophagosome dans les cellules de LAGC NPM-ALK+.

Une autre étude indépendante a décrit ce même rôle de plateforme de signalisation pour l'autophagosome. Le groupe du Dr Wang a ainsi démontré que l'activation des caspases 8 après traitement de fibroblastes embryonnaires murins par un inhibiteur pan-sphingosine kinase nécessitait la présence d'une autophagie fonctionnelle, et que l'inhibition moléculaire de la formation de ces autophagosomes résultait en une suppression de l'activité apoptotique médiée par les caspases 8[637]. Les auteurs ont également pu mettre en avant la colocalisation de la caspase 8 ainsi que de sa protéine adaptatrice FADD au niveau des autophagosomes (colocalisation de la caspase 8 avec LC3 et p62).

L'exploration de cette nouvelle fonction de l'autophagie en tant que plateforme de signalisation est actuellement en plein essor et il serait très intéressant d'étudier ce nouveau rôle de l'autophagosome dans les LAGC ALK+. En effet, nous avons pu mettre en évidence une potentialisation de l'apoptose induite par le crizotinib en présence d'un bloqueur de dégradation des autophagosomes, la chloroquine. Il faut également noter que le traitement des lignées cellulaires de LAGC NPM-ALK+ par la vinblastine (qui permet de bloquer la fusion entre l'autophagosome et le lysosome), induit également un fort pourcentage d'apoptose (données personnelles non présentées dans le manuscrit). Dans ce contexte, il est possible d'envisager l'étude du rôle des autophagosomes en tant que plateforme de signalisation cellulaire par des techniques permettant de visualiser la colocalisation de la caspase 8 avec des protéines marqueurs de l'autophagosome, comme la protéine Atg5 par exemple. Ce mécanisme nous permettrait ainsi d'expliquer pourquoi le blocage du flux autophagique entraine la potentialisation de l'apoptose dans les LAGC NPM-ALK+.

Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires responsables du rôle cytoprotecteur de l'autophagie induite en réponse au traitement par le crizotinib dans les LAGC NPM-ALK+ permettrait à terme, d'identifier des biomarqueurs pouvant potentiellement être utilisés en clinique. La combinaison de marqueurs permettant de déterminer l'intensité de la réponse autophagique ainsi que son rôle pourrait servir à orienter les thérapies administrées aux patients atteints de LAGC ALK+.

Régulation de l'autophagie par les microARNs dans les LAGC NPM-ALK+

C'est également dans l'optique de mieux comprendre les mécanismes responsables de l'induction d'autophagie cytoprotectrice en réponse au traitement par le crizotinib dans les LAGC NPM-ALK+ que nous nous sommes intéressés aux microARNs. Le point de départ de ce projet a été l'analyse de l'expression de divers microARNs dans les cellules Karpas-299 traitées ou non par le crizotinib (puce

commerciale Qiagen, voir résultats partie III-2). Parmi les dix microARNs sous-exprimées en réponse au traitement par le crizotinib, trois ont attiré notre attention (miR-363-5p, miR-106a-3p et miR-7-5p) car tous trois ont pour cible prédite la sérine-thréonine kinase ULK1 (base de données MEDIANTE http://www.genomique.info:8080/merge/index?action=MITAP). Cette protéine est impliquée dans l'initiation du processus autophagique (voir Introduction, Chapitre 3 partie III - 2) et est considérée comme une bonne cible thérapeutique, en particulier dans les cancers[638]. Cependant, seuls les résultats obtenus avec miR-7 nous ont permis de relier la régulation de l'autophagie à un effet sur la viabilité cellulaire dans les lignées de LAGC NPM-ALK+. Il serait toutefois intéressant de poursuivre la caractérisation de la fonction des deux autres microARNs, qui semblent jouer un rôle important dans la lymphomagenèse liée à NPM-ALK, d'autant plus qu'ils font partie du cluster miR-17-92, fréquemment dérégulé dans les LAGC NPM-ALK+ (voir introduction chapitre 1, partie 5.2.a)

Nos résultats montrent que la réintroduction du miR-7 dans les cellules de LAGC NPM-ALK+ traitées par le crizotinib entraine l'induction d'autophagie de type cytotoxique, ce qui est en accord avec la littérature. En effet, une étude du groupe du Dr Fujiwara parue en 2005 montre que la sur-expression de miR-7 induit la mort par autophagie dans un modèle de cellules de NSCLC EML4-ALK+ et ALK-, *via* l'inhibition de l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)[415]. Plusieurs études ont ainsi décrit le rôle de miR-7 dans la régulation de l'expression de l'EGFR lui-même, mais aussi dans celle des protéines AKT, ERK1/2, c-Raf, p21, PI3K, p70S6K ou encore mTOR[639–641] toutes impliquées dans la voie de ce récepteur aux facteurs de croissance. Il est important de noter que l'expression de l'EGFR est très réduite dans les LAGC NPM-ALK+ (données personnelles, non présentées dans ce manuscrit). Nous nous sommes donc intéressés à la caractérisation d'autres cibles de miR-7, qui pourraient expliquer les effets phénotypiques observés après réexpression ectopique de ce microARN.

En premier lieu, nous nous sommes intéressés à la protéine Bcl-2, un régulateur majeur de l'apoptose et de l'autophagie[642,643]. En 2011, le groupe du Dr Chu a montré que cette protéine était la cible directe de miR-7, grâce à une technique de gène rapporteur luciférase dans les NSCLC ALK-[644]. De manière générale, Bcl-2 est une protéine anti-apoptotique, ce qui en fait un oncogène majeur dans de nombreux cancers[645]. Ce n'est cependant pas le cas dans les LAGC NPM-ALK+, où l'expression de cette protéine est très faible en conditions normales. Le traitement des lignées cellulaires de LAGC NPM-ALK+ par le crizotinib induit toutefois la réexpression de Bcl-2 dans ce modèle. Ce phénomène pourrait être expliqué par des mécanismes de régulation post-transcriptionnels, faisant intervenir miR-7 en particulier. Ainsi nous avons supposé que la sous-expression de ce miR sous traitement au crizotinib pourrait permettre d'expliquer la réexpression de Bcl-2 dans les mêmes conditions. Cependant bien que la quantité d'ARNm et de protéine Bcl2 diminue systématiquement suite à la transfection du miR-7 dans les cellules de LAGC NPM-ALK+, nos résultats montrent que l'interaction entre ce microARN et

l'ARNm de Bcl-2 n'est pas directe. Il est possible que le faible niveau d'expression de Bcl-2 dans les lignées de LAGC NPM-ALK+ rende la détection de l'interaction directe entre ces deux partenaires très difficile. Il serait intéressant de confronter nos résultats avec ceux obtenus par d'autres techniques permettant d'identifier les interactions microARN/ARNm, comme par exemple l'utilisation d'un gène rapporteur luciférase, ou l'utilisation d'un « Target Site Blocker » qui nous permettrait d'empêcher la fixation de miR-7 spécifiquement sur sa séquence cible (seed region) présente sur l'extrémité 3'UTR de l'ARNm codant pour Bcl-2 et de comparer les résultats obtenus avec ces différentes techniques.

Même si nous n'avons pas pu démontrer le lien direct entre Bcl-2 et miR-7, des travaux s'intéressant au rôle de Bcl-2 dans le « switch autophagique » sont actuellement en cours dans l'équipe. Ils sont basés sur plusieurs études déjà publiées dans la littérature qui démontrent cette fonction de Bcl-2[323,518,646,647]. En effet, le rôle de Bcl-2 dans le « switch autophagique » a été avancé pour la première fois en 2005 par le groupe du Dr Levine qui a proposé que l'autophagie serait nécessaire à la réponse des cellules cancéreuses à divers stress. Cependant, si l'induction d'autophagie est trop forte, elle peut alors contribuer à la mort cellulaire. La protéine Bcl-2, de par sa capacité à interagir avec Beclin 1 servirait ainsi de « rhéostat » et permettrait de maintenir le niveau d'autophagie cellulaire à un niveau physiologique, empêchant ainsi la mort par autophagie[648]. Deux études ont depuis démontré ce rôle de Bcl-2. Dans un modèle de neuroblastome, le groupe du Dr Qin a montré que l'inhibition moléculaire de Bcl-2 en condition de déprivation en sérum induisait une mort cellulaire massive, accompagnée d'une augmentation d'autophagie. L'ajout d'inhibiteurs d'autophagie permet de diminuer la mort cellulaire induite par la carence et l'inhibition de Bcl-2[548]. Ces résultats ont été confirmés par une étude récente qui montre que le fait de promouvoir l'interaction Bcl-2/Beclin 1 dans un modèle de neuroblastome *via* des inhibiteurs d'Akt, permet de freiner l'autophagie induite en réponse à un pré-conditionnement ischémique, ce qui induit dans ce cas la mort cellulaire par dommages mitochondriaux[647].

Dans les LAGC NPM-ALK+, nous avons pu montrer que le traitement par le crizotinib combiné à l'inhibition moléculaire de Bcl-2 induisait un fort flux autophagique, ainsi qu'une très forte inhibition de la viabilité cellulaire. Nos résultats préliminaires indiquent que lorsque ce flux autophagique est inhibé (siULK1), on observe une diminution de la viabilité cellulaire moins importante, ce qui semble confirmer le rôle cytotoxique de l'autophagie induite après inhibition de Bcl-2. Ces expériences sont actuellement en cours et le rôle de « rhéostat » de la protéine Bcl-2 dans les LAGC NPM-ALK+ reste encore à confirmer.

Afin de pouvoir caractériser la fonction de miR-7 dans les LAGC NPM-ALK+, nous avons poursuivi nos investigations afin de caractériser une cible directe de ce microARN. Nous avons ainsi testé une

douzaine d'ARNm cibles possibles de miR-7 (par précipitation avec une version biotinylée de miR-7). Parmi eux, seul le messager codant pour la protéine RAF1 (c-RAF) semble pouvoir se lier directement à miR-7.

La protéine c-Raf fait partie de la voie ERK1/2, où elle joue le rôle de MAP3K, en aval de la famille des protéines Ras et de récepteurs aux facteurs de croissance tels que l'EGFR. Il faut cependant noter que dans les LAGC NPM-ALK+, c-Raf ne semble pas être responsable de la phosphorylation et donc de l'activation des MAPK, car son inhibition (pharmacologique ou moléculaire) n'empêche pas la phosphorylation de MEK1/2 et de ERK1/2[649]. La fonction de c-Raf dans les LAGC NPM-ALK+ est donc encore à ce jour peu caractérisée. La poursuite de la caractérisation du rôle de c-Raf dans les cellules de LAGC NPM-ALK+ pourrait montrer que cette protéine participe au « switch autophagique » et que son inhibition permettrait de faire basculer l'autophagie du côté cytotoxique.

Dans la littérature, le rôle de c-Raf dans l'induction d'autophagie a déjà été abondamment décrit. Ainsi dans un modèle de cancers du côlon, l'inhibition de l'activation de c-Raf par les acides aminés entraine une diminution de l'autophagie[650]. Une autre étude a montré que le traitement de cellules HeLa à l'oridonine (une molécule inhibitrice du facteur de transcription NFκB) induisait de l'apoptose ainsi que de l'autophagie, supprimée par l'inhibition de c-Raf[651]. Certaines études ont même proposé une relation entre c-Raf et l'induction d'autophagie cytotoxique. C'est le cas du groupe du Dr Lee, qui a démontré que l'inhibition de c-Raf dans un modèle de fibroblastes humains traités au paclitaxel (un stabilisateur des microtubules), permet de prévenir la mort cellulaire et l'autophagie induites par ce traitement[652]. Cependant, l'inhibition de l'autophagie seule, ou de l'apoptose seule n'a aucun effet sur la mort cellulaire, suggérant que lorsque l'apoptose est inhibée, l'autophagie seule peut être responsable de la mort cellulaire. Cette observation a été confirmée par le groupe du Dr Rapp, qui a montré que l'extinction de c-Raf dans un modèle murin de NSCLC ALK- entraine la mort des cellules tumorales par autophagie[653].

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons effectué des inhibitions directes de c-Raf, par interférence à l'ARN, afin de comparer les résultats obtenus aux effets du miR-7 sur la viabilité cellulaire ainsi que sur le flux autophagique. Nos résultats préliminaires montrent une très faible potentialisation des effets du crizotinib sur la viabilité cellulaire. Il faut cependant noter que l'inhibition de c-Raf dans ces conditions n'est pas optimale (faible pourcentage d'inhibition après deux transfections successives par un siARN ciblant l'ARNm de c-Raf). Il serait donc intéressant de construire des vecteurs lentiviraux permettant une extinction totale de cette protéine. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques est également envisagée. Comme décrit précédemment, le miR-7 peut potentiellement cibler de nombreuses protéines dans la voie de signalisation en aval de l'EGFR, dont c-Raf fait partie. Il est donc

possible que l'inhibition de c-Raf seule ne soit pas suffisante, et ne permette pas de reproduire les effets observés suite à la transfection du miR-7 dans les cellules de LAGC-NPM-ALK+. Il faut également noter que la protéine c-Raf possède deux isoformes chez les mammifères : a-Raf et b-Raf. Ces isoformes présentent de nombreuses structures conservées, ce qui suggère que l'inhibition de l'une d'entre elle pourrait être compensée par l'activation de l'autre[654]. Il faut noter qu'on trouve un site potentiel de fixation de miR-7 sur le l'extrémité 3'UTR de l'ARNm de b-Raf. Il semble donc nécessaire de réaliser des inhibitions conjointes de b- et de c-Raf, afin de voir si l'effet sur la viabilité cellulaire serait plus important.

Il faut aussi mentionner qu'une étude parue en 2011, montre que la protéine p21 (PAK1), une cible prédite de miR-7 peut induire de l'autophagie *via* la voie c-Raf – ERK. La protéine BNIP3 (Bcl-2/adenovirus E1B-19-kDa-interacting protein 3) participerait à ce processus[655]. Cette protéine a une fonction pro-apoptotique, et peut se lier à Bcl-2. Il serait donc très intéressant de quantifier cette protéine après transfection du miR-7 ou du siRNA ciblant l'ARNm de c-Raf. Ceci pourrait éventuellement nous permettre de caractériser plus en détail la voie moléculaire responsable de l'induction d'autophagie dans les cellules de LAGC NPM-ALK+ et peut-être également de relier nos résultats obtenus pour la protéine Bcl-2 avec ceux obtenus pour la protéine c-Raf et pour le miR-7. Enfin il est important de mentionner que l'effet cytotoxique du miR-7 pourrait passer par d'autres mécanismes que nous n'avons pas testés ici, tels que la sénescence, la nécrose ou la nécroptose, etc. Bien que l'implication de miR-7 dans les processus de nécrose ou de nécroptose n'ait jusqu'à présent pas été décrite dans la littérature, il apparait comme nécessaire de réaliser des tests complémentaires afin d'écarter toute possibilité de l'implication d'autres processus de mort cellulaire dans les lignées de LAGC NPM-ALK+ après réexpression ectopique du miR-7 combinée au traitement par le crizotinib. Plusieurs points restent donc encore à éclaircir avant de pouvoir conclure sur cette étude.

Perspectives d'applications thérapeutiques chez les patients atteints de LAGC NPM-ALK+

La modulation de l'autophagie en clinique n'est encore qu'à ses débuts. Même si la majorité des exemples dans la littérature rapportent l'induction d'autophagie cytoprotectrice en réponse à des traitements anti-cancéreux, certaines études décrivent également l'induction d'une autophagie cytotoxique qui potentialise l'effet du traitement. L'administration d'inhibiteurs de l'autophagie en clinique ne doit donc pas être systématique, et requiert :

- L'identification de biomarqueurs permettant de déterminer le rôle précis (cytoportecteur ou cytotoxique) de l'autophagie en réponse à chaque traitement des LAGC ALK+

- Le développement de modulateurs de l'autophagie utilisables en clinique car comme mentionné précédemment, la chloroquine présente de nombreux effets indésirables (voir introduction chapitre 4, partie 4.1.a).

Le ciblage de l'autophagie dans les LAGC NPM-ALK+ est particulièrement intéressant dans le cadre de l'utilisation en clinique du crizotinib. En effet, le Pr Gambacorti a reporté le traitement des premiers patients atteints de LAGC ALK+, en rechute et/ou réfractaires à tout traitement par cet ITK, ce qui a permis pour la première fois de démontrer son efficacité dans le traitement de patients atteints de lymphomes associés à ALK[205]. Cependant les premières données obtenues montrent aussi que l'arrêt du traitement engendre systématiquement une rechute chez ces patients. Le crizotinib ne semble donc pas totalement éradiquer les cellules cancéreuses, mais bel et bien les mettre « en pause ». Ce phénomène correspond au processus de dormance cellulaire décrit précédemment (Introduction, chapitre 4 partie 1.2.b) et observé *in vitro*. De manière intéressante, l'autophagie a été décrite comme jouant un rôle essentiel dans l'entrée en dormance des cellules cancéreuses (voir Introduction, Chapitre 4, partie 1.2.b). La relation entre le crizotinib, l'autophagie et la dormance est donc un point à éclaircir pour mieux comprendre l'évolution de la pathologie après arrêt du traitement. La reprise de la croissance tumorale après arrêt du traitement au crizotinib (régression tumorale confirmée par palpation) a également été observée par notre équipe dans le modèle murin conditionnel de lymphomes exprimant NPM-ALK dont nous disposons au laboratoire. Ces souris pourraient donc être un modèle adéquat nous permettant l'étude de l'implication de l'autophagie dans la rechute de la maladie après arrêt du traitement.

Nous avons mis au jour, dans nos modèles cellulaires de LAGC ALK+, la régulation de l'autophagie par miR-7. Ce microARN est considéré comme un bon outil thérapeutique et de nombreuses études ont montré qu'il pourrait être utilisé comme un biomarqueur dans de nombreux cancers où son expression est diminuée dans des tissus tumoraux par rapport à des tissus sains, par exemple dans les NSCLC ALK-[656], ou dans les cancers colorectaux[595]. Ce microARN pourrait également être un bon outil de prédiction des rechutes tumorales. En effet, son expression est plus faible chez des patients atteints de cancers du poumon ayant rechuté que chez des patients n'ayant pas rechuté[657]. Cependant il n'apparait pas comme différentiellement exprimé entre des patients de LAGC ALK+ ayant rechuté ou non (données non publiées de l'équipe).

Actuellement l'utilisation des microARNs en tant que thérapie semble prometteuse, mais est encore très limitée. Quelques entreprises ont développé des microARNs « médicaments » (voir introduction, chapitre 4, partie 4.2) permettant de cibler des oncogènes notamment dans le cancer du pancréas ou de la prostate[576]. Comme la majorité des études décrivent le rôle oncosuppresseur du miR-7, des

« thérapies de remplacement » sont envisagées afin de restaurer un niveau suffisant de ce microARN. Deux méthodes permettant de délivrer miR-7 *in vivo* ont été décrites soit *via* encapsulation dans des liposomes cationiques[597], soit par l'utilisation de nanoparticules constituées d'un châssis de peptides RGD (Arg-Gly-Asp)[596]. Ces particules sont biodégradables et leur application en clinique est potentiellement envisageable. Le principal défi est de permettre une distribution spécifique du microARN au niveau des cellules tumorales, car les LAGC NPM-ALK+ sont une pathologie systémique et une injection intratumorale de ces vésicules n'est pas envisageable.

Il serait intéressant d'envisager le couplage de ce miR-7 avec le brentuximab, un anticorps humanisé dirigé contre l'antigène CD30, permettant un adressage spécifique de la thérapie aux cellules cancéreuses (voir introduction, Chapitre 2, partie 3.3.b). Une étude récente, publiée en 2015 a rapporté un couplage similaire entre un anticorps dirigé contre l'EGFR et un siARN dirigé contre l'ARNm de KRAS, ouvrant la porte à une nouvelle catégorie potentielle de thérapies anti-cancéreuses[658,659].

Enfin, l'identification de nouvelles cibles potentielles permettant la potentialisation des effets du crizotinib telles que c-Raf (qui reste à ce jour encore à confirmer), permettrait d'inclure de nouvelles molécules dans l'arsenal thérapeutique utilisé dans le traitement des LAGC NPM-ALK+ et ainsi de cibler la pathologie sur plusieurs fronts, dans le but de diminuer l'incidence des rechutes.

CONCLUSION

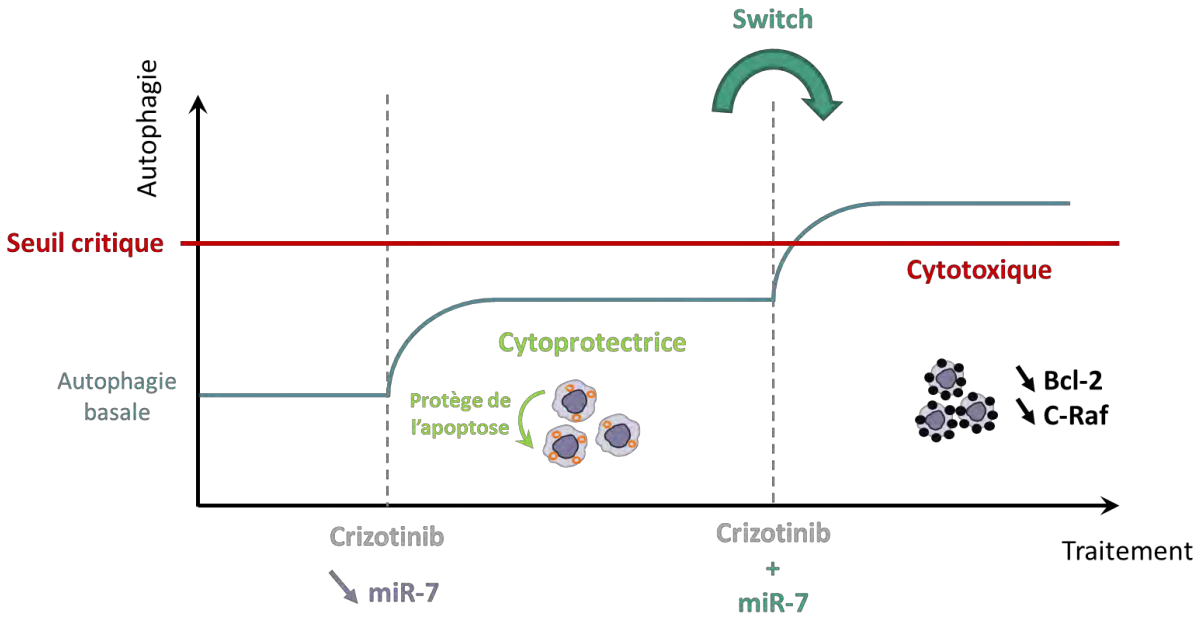


Figure 56 : Modèle présentant le rôle de l'autophagie en réponse au traitement par le crizotinib des LAGC NPM-ALK+

Au cours de mon travail de thèse, j'ai pu montrer que le traitement des cellules de LAGC NPM-ALK+ par différents inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de ALK de première (crizotinib) ou de deuxième génération (alectinib, ceritinib, brigatinib, NVP-TAE), entrainaient l'induction d'autophagie cytoprotectrice (Figure 56). En effet, l'inhibition de l'autophagie associée à ces traitements permet la potentialisation de la mort cellulaire par apoptose. De façon intéressante, le traitement de ces mêmes cellules par des chimiothérapies ne semble pas induire une réponse autophagique identique. Ces résultats suggèrent qu'en fonction des thérapies utilisées, l'inhibition de l'autophagie chez les patients atteints de LAGC NPM-ALK+ pourrait être une bonne cible thérapeutique. Cependant, le développement de modulateurs de l'autophagie adaptés à une utilisation en clinique, ainsi qu'une meilleure compréhension des facteurs déterminant le rôle de cette autophagie en réponse aux traitements sont encore nécessaires. C'est ce que j'ai entrepris dans la deuxième partie de ma thèse.

En effet, nous avons pu déterminer que la régulation de cette autophagie induite en réponse à l'inhibition de ALK pouvait être médiée par des régulateurs transcriptionnels bien connus : les microARNs, et en particulier par le miR-7-5p. Ce microARN est sous-exprimé en réponse au traitement par le crizotinib, et sa réexpression ectopique permet de potentialiser les effets cytotoxiques du traitement par l'induction d'autophagie de mort (Figure 56). Nous avons également pu mettre en évidence l'existence d'un « switch autophagique » dans les LAGC NPM-ALK+, médiée principalement par la protéine Bcl-2, un régulateur majeur de l'apoptose et de l'autophagie. Ce switch autophagique pourrait également impliquer la protéine c-Raf, dont la fonction dans les LAGC n'est à ce jour pas caractérisée avec précision.

Nos travaux ont donc permis d'approfondir notre connaissance sur la mécanistique d'induction de l'autophagie dans les LAGC NPM-ALK+, et ont souligné l'importance de ce processus dans les thérapies proposées aux patients atteints par cette pathologie. Ces résultats permettent l'ouverture de nouvelles perspectives quant à la modulation thérapeutique de l'autophagie par des modulateurs pharmacologiques ou moléculaires (ARNs non codants), afin d'optimiser les traitements actuels des LAGC NPM-ALK+.

BIBLIOGRAPHIE

1. Salles Gilles. LES LYMPHOMES MALINS, HODGKINIENS ET NON HODGKINIENS. *Cours Univ. Lyon* (2011).
2. Stein, H. *et al.* The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood* **66,** 848–58 (1985).
3. Delsol, G. Classification OMS 2008 des lymphomes. *Ann. Pathol.* **28,** S20–S24 (2008).
4. Campo, E. *et al.* The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood* **117,** 5019–32 (2011).
5. Lamant, L. *et al.* Gene-expression profiling of systemic anaplastic large-cell lymphoma reveals differences based on ALK status and two distinct morphologic ALK+ subtypes. *Blood* **109,** 2156–64 (2007).
6. Carbone, P. P., Kaplan, H. S., Musshoff, K., Smithers, D. W. & Tubiana, M. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer Res.* **31,** 1860–1 (1971).
7. Murphy, S. B. Classification, staging and end results of treatment of childhood non-Hodgkin's lymphomas: dissimilarities from lymphomas in adults. *Semin. Oncol.* **7,** 332–9 (1980).
8. Cairo, M. S., Raetz, E. & Perkins, S. Clinical Presentation and Staging. (2003).
9. Savage, K. J. *et al.* ALK- anaplastic large-cell lymphoma is clinically and immunophenotypically different from both ALK+ ALCL and peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified: report from the International Peripheral T-Cell Lymphoma Project. *Blood* **111,** 5496–504 (2008).
10. Wright, D., McKeever, P. & Carter, R. Childhood non-Hodgkin lymphomas in the United Kingdom: findings from the UK Children's Cancer Study Group. *J. Clin. Pathol.* **50,** 128–34 (1997).
11. Hochberg, J., Waxman, I. M., Kelly, K. M., Morris, E. & Cairo, M. S. Adolescent non-Hodgkin lymphoma and Hodgkin lymphoma: state of the science. *Br. J. Haematol.* **144,** 24–40 (2009).
12. Le Deley, M.-C. *et al.* Prognostic factors in childhood anaplastic large cell lymphoma: results of a large European intergroup study. *Blood* **111,** 1560–6 (2008).
13. Falini, B. *et al.* ALK+ lymphoma: clinico-pathological findings and outcome. *Blood* **93,** 2697–706 (1999).
14. Lamant, L. *et al.* Cutaneous presentation of ALK-positive anaplastic large cell lymphoma following insect bites: evidence for an association in five cases. *Haematologica* **95,** 449–55 (2010).
15. La Vecchia, C., Negri, E., D'Avanzo, B. & Franceschi, S. Occupation and lymphoid neoplasms. *Br. J. Cancer* **60,** 385–8 (1989).
16. Fraga, M. *et al.* Bone marrow involvement in anaplastic large cell lymphoma. Immunohistochemical detection of minimal disease and its prognostic significance. *Am. J. Clin. Pathol.* **103,** 82–9 (1995).
17. Bonzheim, I., Steinhilber, J., Fend, F., Lamant, L. & Quintanilla-Martinez, L. ALK-positive anaplastic large cell lymphoma: an evolving story. *Front. Biosci. (Schol. Ed).* **7,** 248–59 (2015).
18. Bonzheim, I., Steinhilber, J., Fend, F., Lamant, L. & Quintanilla-Martinez, L. ALK-positive anaplastic large cell lymphoma: an evolving story. *Front. Biosci. (Schol. Ed).* **7,** 248–59 (2015).
19. Stein, H. *et al.* CD30(+) anaplastic large cell lymphoma: a review of its histopathologic, genetic, and clinical features. *Blood* **96,** 3681–95 (2000).
20. Benharroch, D. *et al.* ALK-positive lymphoma: a single disease with a broad spectrum of morphology. *Blood* **91,** 2076–84 (1998).
21. Serdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J., Vardiman, J. . *WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lympoid Tissues, Fourth Edition*. (IARC, 2008).
22. Lamant, L. *et al.* Prognostic impact of morphologic and phenotypic features of childhood ALK-positive anaplastic large-cell lymphoma: results of the ALCL99 study. *J. Clin. Oncol.* **29,** 4669–76 (2011).
23. Pileri, S. *et al.* Lymphohistiocytic T-cell lymphoma (anaplastic large cell lymphoma CD30+/Ki-1

+ with a high content of reactive histiocytes). *Histopathology* **16,** 383–91 (1990).
24. Vassallo, J. *et al.* ALK-positive anaplastic large cell lymphoma mimicking nodular sclerosis Hodgkin's lymphoma: report of 10 cases. *Am. J. Surg. Pathol.* **30,** 223–9 (2006).
25. Kinney, M. C. *et al.* A small-cell-predominant variant of primary Ki-1 (CD30)+ T-cell lymphoma. *Am. J. Surg. Pathol.* **17,** 859–68 (1993).
26. Matsuyama, H. *et al.* miR-135b mediates NPM-ALK-driven oncogenicity and renders IL-17-producing immunophenotype to anaplastic large cell lymphoma. *Blood* **118,** 6881–92 (2011).
27. Turner, S. D., Lamant, L., Kenner, L. & Brugières, L. Anaplastic large cell lymphoma in paediatric and young adult patients. *Br. J. Haematol.* **173,** 560–72 (2016).
28. Foss, H. D. *et al.* Anaplastic large-cell lymphomas of T-cell and null-cell phenotype express cytotoxic molecules. *Blood* **88,** 4005–11 (1996).
29. Abramov, D. *et al.* Intratumoral heterogeneity in anaplastic large cell lymphoma of non-common subtype. *J. Hematop.* **5,** 109–116 (2012).
30. ten Berge, R. L. *et al.* MUC1 (EMA) is preferentially expressed by ALK positive anaplastic large cell lymphoma, in the normally glycosylated or only partly hypoglycosylated form. *J. Clin. Pathol.* **54,** 933–9 (2001).
31. Wellmann, A. *et al.* Detection of differentially expressed genes in lymphomas using cDNA arrays: identification of clusterin as a new diagnostic marker for anaplastic large-cell lymphomas. *Blood* **96,** 398–404 (2000).
32. Quintanilla-Martinez, L. *et al.* NPM-ALK-dependent expression of the transcription factor CCAAT/enhancer binding protein beta in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Blood* **108,** 2029–36 (2006).
33. Zhang, Q. *et al.* The potent oncogene NPM-ALK mediates malignant transformation of normal human CD4(+) T lymphocytes. *Am. J. Pathol.* **183,** 1971–80 (2013).
34. Newrzela, S. *et al.* T-cell receptor diversity prevents T-cell lymphoma development. *Leukemia* **26,** 2499–507 (2012).
35. Moti, N. *et al.* Anaplastic large cell lymphoma-propagating cells are detectable by side population analysis and possess an expression profile reflective of a primitive origin. *Oncogene* **34,** 1843–52 (2015).
36. Laurent, C. *et al.* Circulating t(2;5)-positive cells can be detected in cord blood of healthy newborns. *Leukemia* **26,** 188–190 (2012).
37. Trümper, L., Pfreundschuh, M., Bonin, F. V & Daus, H. Detection of the t(2;5)-associated NPM/ALK fusion cDNA in peripheral blood cells of healthy individuals. *Br. J. Haematol.* **103,** 1138–44 (1998).
38. Malcolm, T. I. M. *et al.* Anaplastic large cell lymphoma arises in thymocytes and requires transient TCR expression for thymic egress. *Nat. Commun.* **7,** 10087 (2016).
39. Morris, S. W. *et al.* Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* **263,** 1281–4 (1994).
40. Iwahara, T. *et al.* Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene* **14,** 439–49 (1997).
41. Morris, S. W. *et al.* ALK, the chromosome 2 gene locus altered by the t(2;5) in non-Hodgkin's lymphoma, encodes a novel neural receptor tyrosine kinase that is highly related to leukocyte tyrosine kinase (LTK). *Oncogene* **14,** 2175–88 (1997).
42. Liao, E. H., Hung, W., Abrams, B. & Zhen, M. An SCF-like ubiquitin ligase complex that controls presynaptic differentiation. *Nature* **430,** 345–50 (2004).
43. Shen, L.-L., Wang, Y. & Wang, D.-Y. Involvement of genes required for synaptic function in aging control in C. elegans. *Neurosci. Bull.* **23,** 21–9 (2007).
44. Weiss, J. B., Suyama, K. L., Lee, H. H. & Scott, M. P. Jelly belly: a Drosophila LDL receptor repeat-containing signal required for mesoderm migration and differentiation. *Cell* **107,** 387–98 (2001).
45. Cheng, L. Y. *et al.* Anaplastic lymphoma kinase spares organ growth during nutrient restriction in Drosophila. *Cell* **146,** 435–47 (2011).

46. Lopes, S. S. *et al.* Leukocyte tyrosine kinase functions in pigment cell development. *PLoS Genet.* **4,** e1000026 (2008).
47. Roskoski, R. Anaplastic lymphoma kinase (ALK): structure, oncogenic activation, and pharmacological inhibition. *Pharmacol. Res.* **68,** 68–94 (2013).
48. Hallberg, B. & Palmer, R. H. Mechanistic insight into ALK receptor tyrosine kinase in human cancer biology. *Nat. Rev. Cancer* **13,** 685–700 (2013).
49. Bilsland, J. G. *et al.* Behavioral and neurochemical alterations in mice deficient in anaplastic lymphoma kinase suggest therapeutic potential for psychiatric indications. *Neuropsychopharmacology* **33,** 685–700 (2008).
50. Beckmann, G. & Bork, P. An adhesive domain detected in functionally diverse receptors. *Trends Biochem. Sci.* **18,** 40–1 (1993).
51. Guan, J. *et al.* FAM150A and FAM150B are activating ligands for anaplastic lymphoma kinase. *Elife* **4,** e09811 (2015).
52. Wang, Q., Zorn, J. A. & Kuriyan, J. in *Methods Enzymol.* **548,** 23–67 (2014).
53. Tartari, C. J. *et al.* Characterization of some molecular mechanisms governing autoactivation of the catalytic domain of the anaplastic lymphoma kinase. *J. Biol. Chem.* **283,** 3743–50 (2008).
54. Donella-Deana, A. *et al.* Unique substrate specificity of anaplastic lymphoma kinase (ALK): development of phosphoacceptor peptides for the assay of ALK activity. *Biochemistry* **44,** 8533–42 (2005).
55. Duyster, J., Bai, R. Y. & Morris, S. W. Translocations involving anaplastic lymphoma kinase (ALK). *Oncogene* **20,** 5623–37 (2001).
56. Karabencheva, T. G., Lee, C. C., Black, G. W., Donev, R. & Christov, C. Z. How does conformational flexibility influence key structural features involved in activation of anaplastic lymphoma kinase? *Mol. Biosyst.* **10,** 1490–5 (2014).
57. Webb, T. R. *et al.* Anaplastic lymphoma kinase: role in cancer pathogenesis and small-molecule inhibitor development for therapy. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **9,** 331–56 (2009).
58. Lee, H.-H., Norris, A., Weiss, J. B. & Frasch, M. Jelly belly protein activates the receptor tyrosine kinase Alk to specify visceral muscle pioneers. *Nature* **425,** 507–512 (2003).
59. Ishihara, T. *et al.* HEN-1, a secretory protein with an LDL receptor motif, regulates sensory integration and learning in Caenorhabditis elegans. *Cell* **109,** 639–49 (2002).
60. Zhang, H. *et al.* Deorphanization of the human leukocyte tyrosine kinase (LTK) receptor by a signaling screen of the extracellular proteome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111,** 15741–5 (2014).
61. Palmer, R. H., Vernersson, E., Grabbe, C. & Hallberg, B. Anaplastic lymphoma kinase: signalling in development and disease. *Biochem. J.* **420,** 345–61 (2009).
62. Murray, P. B. *et al.* Heparin is an activating ligand of the orphan receptor tyrosine kinase ALK. *Sci. Signal.* **8,** ra6 (2015).
63. Lemke, G. & Lew, E. D. A ligand for ALK. *Sci. Signal.* **8,** fs2 (2015).
64. Allouche, M. ALK is a novel dependence receptor: potential implications in development and cancer. *Cell Cycle* **6,** 1533–8 (2007).
65. Mourali, J. *et al.* Anaplastic lymphoma kinase is a dependence receptor whose proapoptotic functions are activated by caspase cleavage. *Mol. Cell. Biol.* **26,** 6209–22 (2006).
66. Fujimoto, J. *et al.* Characterization of the transforming activity of p80, a hyperphosphorylated protein in a Ki-1 lymphoma cell line with chromosomal translocation t(2;5). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93,** 4181–6 (1996).
67. Okuwaki, M. The structure and functions of NPM1/Nucleophsmin/B23, a multifunctional nucleolar acidic protein. *J. Biochem.* **143,** 441–8 (2008).
68. Grisendi, S. *et al.* Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis. *Nature* **437,** 147–53 (2005).
69. Sportoletti, P. *et al.* Npm1 is a haploinsufficient suppressor of myeloid and lymphoid malignancies in the mouse. *Blood* **111,** 3859–62 (2008).

70. McDuff, F. K. E. *et al.* Determining the contribution of NPM1 heterozygosity to NPM-ALK-induced lymphomagenesis. *Lab. Investig.* **91,** 1298–1303 (2011).
71. Bischof, D., Pulford, K., Mason, D. Y. & Morris, S. W. Role of the nucleophosmin (NPM) portion of the non-Hodgkin's lymphoma-associated NPM-anaplastic lymphoma kinase fusion protein in oncogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **17,** 2312–25 (1997).
72. Ceccon, M. *et al.* Excess of NPM-ALK oncogenic signaling promotes cellular apoptosis and drug dependency. *Oncogene* **35,** 3854–65 (2016).
73. Armstrong, F. *et al.* TPM3-ALK expression induces changes in cytoskeleton organisation and confers higher metastatic capacities than other ALK fusion proteins. *Eur. J. Cancer* **43,** 640–646 (2007).
74. Armstrong, F. *et al.* Differential effects of X-ALK fusion proteins on proliferation, transformation, and invasion properties of NIH3T3 cells. *Oncogene* **23,** 6071–82 (2004).
75. Giuriato, S. *et al.* Conditional TPM3-ALK and NPM-ALK transgenic mice develop reversible ALK-positive early B-cell lymphoma / leukemia. **115,** 4061–4070 (2010).
76. Roukos, V. & Mathas, S. The origins of ALK translocations. *Front. Biosci. (Schol. Ed).* **7,** 260–8 (2015).
77. Roukos, V., Burman, B. & Misteli, T. The cellular etiology of chromosome translocations. *Curr. Opin. Cell Biol.* **25,** 357–64 (2013).
78. Mathas, S. *et al.* Gene deregulation and spatial genome reorganization near breakpoints prior to formation of translocations in anaplastic large cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106,** 5831–5836 (2009).
79. Shiota, M. *et al.* Hyperphosphorylation of a novel 80 kDa protein-tyrosine kinase similar to Ltk in a human Ki-1 lymphoma cell line, AMS3. *Oncogene* **9,** 1567–74 (1994).
80. Wei, L., Hubbard, S. R., Hendrickson, W. A. & Ellis, L. Expression, Characterization, and Crystallization of the Catalytic Core of the Human Insulin Receptor Protein-tyrosine Kinase Domain. *J. Biol. Chem.* **270,** 8122–8130 (1995).
81. Daugrois, C. Lymphomes Anaplasiques à Grandes Cellules ALK positifs : signature pronostique des rechutes précoces. *These Dr.* **1,** (2015).
82. Pearson, J. D., Lee, J. K. H., Bacani, J. T. C., Lai, R. & Ingham, R. J. NPM-ALK: The Prototypic Member of a Family of Oncogenic Fusion Tyrosine Kinases. *J. Signal Transduct.* **2012,** 123253 (2012).
83. Chiarle, R., Voena, C., Ambrogio, C., Piva, R. & Inghirami, G. The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **8,** 11–23 (2008).
84. Chiarle, R. *et al.* NPM-ALK transgenic mice spontaneously develop T-cell lymphomas and plasma cell tumors. *Blood* **101,** 1919–27 (2003).
85. Zhang, Q. *et al.* Multilevel dysregulation of STAT3 activation in anaplastic lymphoma kinase-positive T/null-cell lymphoma. *J. Immunol.* **168,** 466–74 (2002).
86. Zamo, A. *et al.* Anaplastic lymphoma kinase (ALK) activates Stat3 and protects hematopoietic cells from cell death. *Oncogene* **21,** 1038–47 (2002).
87. Khoury, J. D. *et al.* Differential expression and clinical significance of tyrosine-phosphorylated STAT3 in ALK+ and ALK- anaplastic large cell lymphoma. *Clin. Cancer Res.* **9,** 3692–9 (2003).
88. Marzec, M. *et al.* Inhibition of ALK enzymatic activity in T-cell lymphoma cells induces apoptosis and suppresses proliferation and STAT3 phosphorylation independently of Jak3. *Lab. Invest.* **85,** 1544–54 (2005).
89. Amin, H. M. *et al.* Inhibition of JAK3 induces apoptosis and decreases anaplastic lymphoma kinase activity in anaplastic large cell lymphoma. *Oncogene* **22,** 5399–407 (2003).
90. Wu, C. *et al.* STAT1 is phosphorylated and downregulated by the oncogenic tyrosine kinase NPM-ALK in ALK-positive anaplastic large-cell lymphoma. *Blood* **126,** 336–45 (2015).
91. Lai, R. *et al.* Jak3 activation is significantly associated with ALK expression in anaplastic large cell lymphoma. *Hum. Pathol.* **36,** 939–44 (2005).
92. Groner, B., Lucks, P. & Borghouts, C. The function of Stat3 in tumor cells and their microenvironment. *Semin. Cell Dev. Biol.* **19,** 341–350 (2008).

93. Chiarle, R. *et al.* Stat3 is required for ALK-mediated lymphomagenesis and provides a possible therapeutic target. *Nat. Med.* **11,** 623–9 (2005).
94. Amin, H. M. *et al.* Selective inhibition of STAT3 induces apoptosis and G(1) cell cycle arrest in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Oncogene* **23,** 5426–34 (2004).
95. Zhang, Q. *et al.* STAT3 induces transcription of the DNA methyltransferase 1 gene (DNMT1) in malignant T lymphocytes. *Blood* **108,** 1058–64 (2006).
96. Lee, H. *et al.* Acetylated STAT3 is crucial for methylation of tumor-suppressor gene promoters and inhibition by resveratrol results in demethylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109,** 7765–9 (2012).
97. Zhang, Q., Wang, H. Y., Liu, X. & Wasik, M. A. STAT5A is epigenetically silenced by the tyrosine kinase NPM1-ALK and acts as a tumor suppressor by reciprocally inhibiting NPM1-ALK expression. *Nat. Med.* **13,** 1341–8 (2007).
98. Hoareau-Aveilla, C. *et al.* Reversal of microRNA-150 silencing disadvantages crizotinib-resistant NPM-ALK(+) cell growth. *J. Clin. Invest.* **125,** 3505–18 (2015).
99. Watanabe, M. *et al.* JunB induced by constitutive CD30-extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase signaling activates the CD30 promoter in anaplastic large cell lymphoma and reed-sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Cancer Res.* **65,** 7628–34 (2005).
100. Staber, P. B. *et al.* The oncoprotein NPM-ALK of anaplastic large-cell lymphoma induces JUNB transcription via ERK1/2 and JunB translation via mTOR signaling. *Blood* **110,** 3374–83 (2007).
101. Marzec, M. *et al.* Oncogenic tyrosine kinase NPM/ALK induces activation of the MEK/ERK signaling pathway independently of c-Raf. *Oncogene* **26,** 813–21 (2007).
102. Kinney, M. C., Higgins, R. A. & Medina, E. A. Anaplastic large cell lymphoma: twenty-five years of discovery. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **135,** 19–43 (2011).
103. Leventaki, V. *et al.* NPM-ALK oncogenic kinase promotes cell-cycle progression through activation of JNK/cJun signaling in anaplastic large-cell lymphoma. *Blood* **110,** 1621–30 (2007).
104. Pearson, J. D., Lee, J. K. H., Bacani, J. T. C., Lai, R. & Ingham, R. J. NPM-ALK and the JunB transcription factor regulate the expression of cytotoxic molecules in ALK-positive, anaplastic large cell lymphoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **4,** 124–33 (2011).
105. Noh, D.-Y., Shin, S. H. & Rhee, S. G. Phosphoinositide-specific phospholipase C and mitogenic signaling. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1242,** 99–113 (1995).
106. Bai, R. Y., Dieter, P., Peschel, C., Morris, S. W. & Duyster, J. Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase of large-cell anaplastic lymphoma is a constitutively active tyrosine kinase that utilizes phospholipase C-gamma to mediate its mitogenicity. *Mol. Cell. Biol.* **18,** 6951–61 (1998).
107. Cussac, D. *et al.* Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase of anaplastic large-cell lymphoma recruits, activates, and uses pp60c-src to mediate its mitogenicity. *Blood* **103,** 1464–71 (2004).
108. Hirsch, D. S., Shen, Y., Dokmanovic, M. & Wu, W. J. pp60c-Src phosphorylates and activates vacuolar protein sorting 34 to mediate cellular transformation. *Cancer Res.* **70,** 5974–83 (2010).
109. Bai, R. Y. *et al.* Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase associated with anaplastic large-cell lymphoma activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt antiapoptotic signaling pathway. *Blood* **96,** 4319–27. (2000).
110. Slupianek, A. *et al.* Role of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in nucleophosmin/anaplastic lymphoma kinase-mediated lymphomagenesis. *Cancer Res.* **61,** 2194–9 (2001).
111. Khwaja, A. Apoptosis: Akt is more than just a Bad kinase. *Nature* **401,** 33–34 (1999).
112. McDonnell, S. R. P. *et al.* NPM-ALK signals through glycogen synthase kinase 3β to promote oncogenesis. *Oncogene* **31,** 3733–40 (2012).
113. Gu, T.-L. *et al.* NPM-ALK fusion kinase of anaplastic large-cell lymphoma regulates survival and proliferative signaling through modulation of FOXO3a. *Blood* **103,** 4622–9 (2004).

114. Hsu, F. Y.-Y., Johnston, P. B., Burke, K. A. & Zhao, Y. The expression of CD30 in anaplastic large cell lymphoma is regulated by nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase-mediated JunB level in a cell type-specific manner. *Cancer Res.* **66,** 9002–8 (2006).
115. Gruss, H. J. & Dower, S. K. Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood* **85,** 3378–404 (1995).
116. Wright, C. W., Rumble, J. M. & Duckett, C. S. CD30 activates both the canonical and alternative NF-kappaB pathways in anaplastic large cell lymphoma cells. *J. Biol. Chem.* **282,** 10252–62 (2007).
117. Ohno, H., Nishikori, M., Maesako, Y. & Haga, H. Reappraisal of BCL3 as a molecular marker of anaplastic large cell lymphoma. *Int. J. Hematol.* **82,** 397–405 (2005).
118. Atsaves, V. *et al.* The oncogenic JUNB/CD30 axis contributes to cell cycle deregulation in ALK+ anaplastic large cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* **167,** 514–23 (2014).
119. Macalalad, A. R. *et al.* The epidemiology and targeted therapies for relapsed and refractory CD30+ lymphomas. *Curr. Med. Res. Opin.* **31,** 537–45 (2015).
120. Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* **75,** 843–54 (1993).
121. Li, Z. & Rana, T. M. Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* **13,** 622–38 (2014).
122. Vasudevan, S., Tong, Y. & Steitz, J. A. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* **318,** 1931–4 (2007).
123. Vasudevan, S., Tong, Y. & Steitz, J. A. Cell-cycle control of microRNA-mediated translation regulation. *Cell Cycle* **7,** 1545–9 (2008).
124. Ørom, U. A., Nielsen, F. C. & Lund, A. H. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol. Cell* **30,** 460–71 (2008).
125. Lee, Y. *et al.* MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* **23,** 4051–60 (2004).
126. Cai, X., Hagedorn, C. H. & Cullen, B. R. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* **10,** 1957–66 (2004).
127. BARTEL, D. MicroRNAsGenomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* **116,** 281–297 (2004).
128. Kim, V. N., Han, J. & Siomi, M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10,** 126–39 (2009).
129. Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G. & Cullen, B. R. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* **17,** 3011–6 (2003).
130. Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. & Hannon, G. J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409,** 363–6 (2001).
131. Braun, J. E., Huntzinger, E. & Izaurralde, E. The role of GW182 proteins in miRNA-mediated gene silencing. *Adv. Exp. Med. Biol.* **768,** 147–63 (2013).
132. Czech, B. & Hannon, G. J. Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nat. Rev. Genet.* **12,** 19–31 (2011).
133. Wang, X. Composition of seed sequence is a major determinant of microRNA targeting patterns. *Bioinformatics* **30,** 1377–83 (2014).
134. Brodersen, P. & Voinnet, O. Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10,** 141–8 (2009).
135. Lewis, B. P., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* **120,** 15–20 (2005).
136. Valinezhad Orang, A., Safaralizadeh, R. & Kazemzadeh-Bavili, M. Mechanisms of miRNA-Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation. *Int. J. Genomics* **2014,** 970607 (2014).
137. Lee, I. *et al.* New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites. *Genome Res.* **19,** 1175–83 (2009).
138. Brümmer, A. & Hausser, J. MicroRNA binding sites in the coding region of mRNAs: extending

the repertoire of post-transcriptional gene regulation. *Bioessays* **36,** 617–26 (2014).
139. Finnegan, E. J. & Matzke, M. A. The small RNA world. *J. Cell Sci.* **116,** 4689–93 (2003).
140. Grewal, S. I. S. & Elgin, S. C. R. Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. *Nature* **447,** 399–406 (2007).
141. Valencia-Sanchez, M. A., Liu, J., Hannon, G. J. & Parker, R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev.* **20,** 515–24 (2006).
142. Wakiyama, M., Takimoto, K., Ohara, O. & Yokoyama, S. Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. *Genes & Dev.* **21,** 1857–1862 (2007).
143. Chendrimada, T. P. *et al.* MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature* **447,** 823–8 (2007).
144. Mathonnet, G. *et al.* MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* **317,** 1764–7 (2007).
145. Olsen, P. H. & Ambros, V. The lin-4 Regulatory RNA Controls Developmental Timing in Caenorhabditis elegans by Blocking LIN-14 Protein Synthesis after the Initiation of Translation. *Dev. Biol.* **216,** 671–680 (1999).
146. Eystathioy, T. *et al.* The GW182 protein colocalizes with mRNA degradation associated proteins hDcp1 and hLSm4 in cytoplasmic GW bodies. *RNA* **9,** 1171–3 (2003).
147. Sen, G. L. & Blau, H. M. Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat. Cell Biol.* **7,** 633–6 (2005).
148. Vasilatou, D., Papageorgiou, S., Pappa, V., Papageorgiou, E. & Dervenoulas, J. The role of microRNAs in normal and malignant hematopoiesis. *Eur. J. Haematol.* **84,** 1–16 (2010).
149. Dejean, E. *et al.* Hypoxia-microRNA-16 downregulation induces VEGF expression in anaplastic lymphoma kinase (ALK)-positive anaplastic large-cell lymphomas. *Leukemia* **25,** 1882–90 (2011).
150. Desjobert, C. *et al.* MiR-29a down-regulation in ALK-positive anaplastic large cell lymphomas contributes to apoptosis blockade through MCL-1 overexpression. *Blood* **117,** 6627–37 (2011).
151. Liu, C. *et al.* MicroRNA expression profiling identifies molecular signatures associated with anaplastic large cell lymphoma. *Blood* **122,** 2083–92 (2013).
152. Merkel, O. *et al.* Identification of differential and functionally active miRNAs in both anaplastic lymphoma kinase (ALK)+ and ALK- anaplastic large-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107,** 16228–33 (2010).
153. Spaccarotella, E. *et al.* STAT3-mediated activation of microRNA cluster 17~92 promotes proliferation and survival of ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Haematologica* **99,** 116–24 (2014).
154. Vishwamitra, D. *et al.* MicroRNA 96 is a post-transcriptional suppressor of anaplastic lymphoma kinase expression. *Am. J. Pathol.* **180,** 1772–80 (2012).
155. De Tullio, G. *et al.* Challenges and opportunities of microRNAs in lymphomas. *Molecules* **19,** 14723–81 (2014).
156. Merkel, O. *et al.* Identification of differential and functionally active miRNAs in both anaplastic lymphoma kinase (ALK) + and ALK − anaplastic large-cell lymphoma. (2010). doi:10.1073/pnas.1009719107/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1009719107
157. Liu, C. *et al.* MicroRNA expression profiling identifies molecular signatures associated with anaplastic large cell lymphoma. *Blood* **122,** 2083–92 (2013).
158. Steinhilber, J. *et al.* Next-Generation Sequencing Identifies Deregulation of MicroRNAs Involved in Both Innate and Adaptive Immune Response in ALK+ ALCL. *PLoS One* **10,** e0117780 (2015).
159. Khuu, C. *et al.* The Three Paralogous MicroRNA Clusters in Development and Disease, miR-17-92, miR-106a-363, and miR-106b-25. *Scientifica (Cairo).* **2016,** 1–10 (2016).
160. Steinhilber, J. *et al.* Next-Generation Sequencing Identifies Deregulation of MicroRNAs Involved in Both Innate and Adaptive Immune Response in ALK+ ALCL. *PLoS One* **10,** e0117780

(2015).
161. He, L. *et al.* A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* **435,** 828–33 (2005).
162. Mendell, J. T. miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease. *Cell* **133,** 217–22 (2008).
163. Brock, M. *et al.* Interleukin-6 modulates the expression of the bone morphogenic protein receptor type II through a novel STAT3-microRNA cluster 17/92 pathway. *Circ. Res.* **104,** 1184–91 (2009).
164. Ambrogio, C. *et al.* NPM-ALK oncogenic tyrosine kinase controls T-cell identity by transcriptional regulation and epigenetic silencing in lymphoma cells. *Cancer Res.* **69,** 8611–9 (2009).
165. Rothschild, S. I. *et al.* MicroRNA-106a targets autophagy and enhances sensitivity of lung cancer cells to Src inhibitors. *Lung Cancer* (2016). doi:10.1016/j.lungcan.2016.06.004
166. Wu, H. *et al.* MiR-20a and miR-106b negatively regulate autophagy induced by leucine deprivation via suppression of ULK1 expression in C2C12 myoblasts. *Cell. Signal.* **24,** 2179–86 (2012).
167. Hoareau-Aveilla, C., Merkel, O. & Meggetto, F. MicroRNA and ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Front. Biosci. (Schol. Ed).* **7,** 217–25 (2015).
168. Merkel, O. *et al.* Oncogenic role of miR-155 in anaplastic large cell lymphoma lacking the t(2;5) translocation. *J. Pathol.* **236,** 445–456 (2015).
169. Lawrie, C. H. *et al.* MicroRNA expression in lymphocyte development and malignancy. *Leukemia* **22,** 1440–6 (2008).
170. Gao, J. *et al.* MiR-26a Inhibits Proliferation and Migration of Breast Cancer through Repression of MCL-1. *PLoS One* **8,** e65138 (2013).
171. Zhu, H. *et al.* NPM-ALK up-regulates iNOS expression through a STAT3/microRNA-26a-dependent mechanism. *J. Pathol.* **230,** 82–94 (2013).
172. Ito, M. *et al.* MicroRNA-150 inhibits tumor invasion and metastasis by targeting the chemokine receptor CCR6, in advanced cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* **123,** 1499–511 (2014).
173. Hassler, M. R. *et al.* Antineoplastic activity of the DNA methyltransferase inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine in anaplastic large cell lymphoma. *Biochimie* **94,** 2297–307 (2012).
174. Thomas, N. S. B. The STAT3-DNMT1 connection. *JAK-STAT* **1,** 257–60 (2012).
175. Zhang, Q. *et al.* IL-2R common gamma-chain is epigenetically silenced by nucleophosphin-anaplastic lymphoma kinase (NPM-ALK) and acts as a tumor suppressor by targeting NPM-ALK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108,** 11977–82 (2011).
176. Zhang, Q. *et al.* Oncogenic tyrosine kinase NPM-ALK induces expression of the growth-promoting receptor ICOS. *Blood* **118,** 3062–71 (2011).
177. Gambacorti-Passerini, C., Messa, C. & Pogliani, E. M. Crizotinib in Anaplastic Large-Cell Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **364,** 775–776 (2011).
178. Cachin, F., Kelly, A. & Maublant, J. [Evaluation of the therapeutic response: role of isotopic imaging]. *Bull. Cancer* **93,** 1191–9 (2006).
179. Fisher, R. I. *et al.* Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **328,** 1002–6 (1993).
180. CHUPS Jussieu. Antinéoplasiques Immunomodulateurs. (2007). at <http://www.chups.jussieu.fr/polys/pharmaco/poly/POLY.Chp.20.2.3.html>
181. Schmitz, N. *et al.* Treatment and prognosis of mature T-cell and NK-cell lymphoma: an analysis of patients with T-cell lymphoma treated in studies of the German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group. *Blood* **116,** 3418–25 (2010).
182. Sibon, D. *et al.* Long-term outcome of adults with systemic anaplastic large-cell lymphoma treated within the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte trials. *J. Clin. Oncol.* **30,** 3939–46 (2012).

183. Parrilla Castellar, E. R. *et al.* ALK-negative anaplastic large cell lymphoma is a genetically heterogeneous disease with widely disparate clinical outcomes. *Blood* **124,** 1473–80 (2014).
184. Simon, A. *et al.* Upfront VIP-reinforced-ABVD (VIP-rABVD) is not superior to CHOP/21 in newly diagnosed peripheral T cell lymphoma. Results of the randomized phase III trial GOELAMS-LTP95. *Br. J. Haematol.* **151,** 159–66 (2010).
185. Corradini, P. *et al.* Long-term follow-up of patients with peripheral T-cell lymphomas treated up-front with high-dose chemotherapy followed by autologous stem cell transplantation. *Leukemia* **20,** 1533–8 (2006).
186. Brugières, L. *et al.* Impact of the methotrexate administration dose on the need for intrathecal treatment in children and adolescents with anaplastic large-cell lymphoma: results of a randomized trial of the EICNHL Group. *J. Clin. Oncol.* **27,** 897–903 (2009).
187. Le Deley, M.-C. *et al.* Vinblastine in children and adolescents with high-risk anaplastic large-cell lymphoma: results of the randomized ALCL99-vinblastine trial. *J. Clin. Oncol.* **28,** 3987–93 (2010).
188. Woessmann, W. *et al.* Relapsed or refractory anaplastic large-cell lymphoma in children and adolescents after Berlin-Frankfurt-Muenster (BFM)-type first-line therapy: a BFM-group study. *J. Clin. Oncol.* **29,** 3065–71 (2011).
189. Gkotzamanidou, M. *et al.* Peripheral T-cell lymphoma: the role of hematopoietic stem cell transplantation. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **89,** 248–61 (2014).
190. Smith, S. M. *et al.* Hematopoietic cell transplantation for systemic mature T-cell non-Hodgkin lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **31,** 3100–9 (2013).
191. Song, K. W., Mollee, P., Keating, A. & Crump, M. Autologous stem cell transplant for relapsed and refractory peripheral T-cell lymphoma: variable outcome according to pathological subtype. *Br. J. Haematol.* **120,** 978–85 (2003).
192. Corradini, P. *et al.* Graft-versus-lymphoma effect in relapsed peripheral T-cell non-Hodgkin's lymphomas after reduced-intensity conditioning followed by allogeneic transplantation of hematopoietic cells. *J. Clin. Oncol.* **22,** 2172–6 (2004).
193. Mak, V. *et al.* Survival of patients with peripheral T-cell lymphoma after first relapse or progression: spectrum of disease and rare long-term survivors. *J. Clin. Oncol.* **31,** 1970–6 (2013).
194. Brugières, L. *et al.* Single-drug vinblastine as salvage treatment for refractory or relapsed anaplastic large-cell lymphoma: a report from the French Society of Pediatric Oncology. *J. Clin. Oncol.* **27,** 5056–61 (2009).
195. Strullu, M. *et al.* Hematopoietic stem cell transplantation in relapsed ALK+ anaplastic large cell lymphoma in children and adolescents: a study on behalf of the SFCE and SFGM-TC. *Bone Marrow Transplant.* **50,** 795–801 (2015).
196. Cui, J. J. *et al.* Structure Based Drug Design of Crizotinib (PF-02341066), a Potent and Selective Dual Inhibitor of Mesenchymal–Epithelial Transition Factor (c-MET) Kinase and Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK). (2011).
197. Karabencheva, T. G., Lee, C. C., Black, G. W., Donev, R. & Christov, C. Z. How does conformational flexibility influence key structural features involved in activation of anaplastic lymphoma kinase? *Mol. BioSyst. Mol. BioSyst* **10,** 1490–1495 (2014).
198. Christensen, J. G. *et al.* Cytoreductive antitumor activity of PF-2341066, a novel inhibitor of anaplastic lymphoma kinase and c-Met, in experimental models of anaplastic large-cell lymphoma. *Mol. Cancer Ther.* **6,** 3314–22 (2007).
199. McDermott, U. *et al.* Genomic alterations of anaplastic lymphoma kinase may sensitize tumors to anaplastic lymphoma kinase inhibitors. *Cancer Res.* **68,** 3389–95 (2008).
200. Peters, S. *et al.* Metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **23 Suppl 7,** vii56–64 (2012).
201. Solomon, B. J. *et al.* First-Line Crizotinib versus Chemotherapy in ALK -Positive Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **371,** 2167–2177 (2014).
202. Gambacorti-Passerini, C. B. *et al.* Clinical Activity of Crizotinib In Advanced, Chemoresistant

ALK+ Lymphoma Patients. *Blood* **116,** 2877–2877 (2010).
203. Cleary, J. M. *et al.* Crizotinib as salvage and maintenance with allogeneic stem cell transplantation for refractory anaplastic large cell lymphoma. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* **12,** 323–6; quiz 326 (2014).
204. Conyers, R., Rao, A., Solomon, B. & Seymour, J. F. Editor in Chief: Response to Eyre et al. "ALK-positive anaplastic large cell lymphoma: current and future perspectives in adult and paediatric disease". *Eur. J. Haematol.* **94,** 86–7 (2015).
205. Gambacorti Passerini, C. *et al.* Crizotinib in advanced, chemoresistant anaplastic lymphoma kinase-positive lymphoma patients. *J. Natl. Cancer Inst.* **106,** djt378 (2014).
206. Mossé, Y. P. *et al.* Safety and activity of crizotinib for paediatric patients with refractory solid tumours or anaplastic large-cell lymphoma: a Children's Oncology Group phase 1 consortium study. *Lancet. Oncol.* **14,** 472–80 (2013).
207. Gambacorti-Passerini, Carlo B, Mussolin, L. & Brugieres, L. Abrupt Relapse of ALK-Positive Lymphoma after Discontinuation of Crizotinib. *n engl j med Proc Natl Acad Sci U S A* **3741,** 2657–64 (2016).
208. Doebele, R. C. *et al.* Mechanisms of resistance to crizotinib in patients with ALK gene rearranged non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **18,** 1472–82 (2012).
209. Shaw, A. & Solomon, B. Anaplastic lymphoma kinase (ALK) fusion oncogene positive non-small cell lung cancer. (2016). at <http://www.uptodate.com/contents/anaplastic-lymphoma-kinase-alk-fusion-oncogene-positive-non-small-cell-lung-cancer#H12>
210. Wu, J., Savooji, J. & Liu, D. Second- and third-generation ALK inhibitors for non-small cell lung cancer. *J. Hematol. Oncol.* **9,** 19 (2016).
211. Sullivan, I. & Planchard, D. ALK inhibitors in non-small cell lung cancer: the latest evidence and developments. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **8,** 32–47 (2016).
212. Amin, A. D. *et al.* Evidence Suggesting That Discontinuous Dosing of ALK Kinase Inhibitors May Prolong Control of ALK+ Tumors. *Cancer Res.* **75,** 2916–27 (2015).
213. Sahu, A., Prabhash, K., Noronha, V., Joshi, A. & Desai, S. Crizotinib: A comprehensive review. *South Asian J. cancer* **2,** 91–7 (2013).
214. Katayama, R. *et al.* Mechanisms of acquired crizotinib resistance in ALK-rearranged lung Cancers. *Sci. Transl. Med.* **4,** 120ra17 (2012).
215. Sasaki, T. *et al.* A novel ALK secondary mutation and EGFR signaling cause resistance to ALK kinase inhibitors. *Cancer Res.* **71,** 6051–60 (2011).
216. Choi, Y. L. *et al.* EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. *N. Engl. J. Med.* **363,** 1734–9 (2010).
217. Kim, S. *et al.* Heterogeneity of Genetic Changes Associated with Acquired Crizotinib Resistance in ALK-Rearranged Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol.* **8,** 415–422 (2013).
218. Ceccon, M., Mologni, L., Bisson, W., Scapozza, L. & Gambacorti-Passerini, C. Crizotinib-resistant NPM-ALK mutants confer differential sensitivity to unrelated Alk inhibitors. *Mol. Cancer Res.* **11,** 122–32 (2013).
219. Zdzalik, D. *et al.* Activating mutations in ALK kinase domain confer resistance to structurally unrelated ALK inhibitors in NPM-ALK-positive anaplastic large-cell lymphoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **140,** 589–98 (2014).
220. Iwama, E., Okamoto, I., Harada, T., Takayama, K. & Nakanishi, Y. Development of anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitors and molecular diagnosis in ALK rearrangement-positive lung cancer. *Onco. Targets. Ther.* **7,** 375–85 (2014).
221. Shah, N. P. *et al.* Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell* **2,** 117–125 (2002).
222. Kobayashi, S. *et al.* EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N. Engl. J. Med.* **352,** 786–92 (2005).
223. Lovisa, F. *et al.* ALK Kinase Domain Mutations in Primary Anaplastic Large Cell Lymphoma: Consequences on NPM-ALK Activity and Sensitivity to Tyrosine Kinase Inhibitors. *PLoS One* **10,**

(2015).
224. Camidge, D. R. & Doebele, R. C. Treating ALK-positive lung cancer—early successes and future challenges. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **9,** 268–277 (2012).
225. Ceccon, M. *et al.* Treatment Efficacy and Resistance Mechanisms Using the Second-Generation ALK Inhibitor AP26113 in Human NPM-ALK-Positive Anaplastic Large Cell Lymphoma. *Mol. Cancer Res.* **13,** 775–83 (2015).
226. Wangari-Talbot, J. & Hopper-Borge, E. Drug Resistance Mechanisms in Non-Small Cell Lung Carcinoma. *J. Can. Res. Updates* **2,** 265–282 (2013).
227. Kinoshita, K. *et al.* Design and synthesis of a highly selective, orally active and potent anaplastic lymphoma kinase inhibitor (CH5424802). *Bioorg. Med. Chem.* **20,** 1271–1280 (2012).
228. Sakamoto, H. *et al.* CH5424802, a Selective ALK Inhibitor Capable of Blocking the Resistant Gatekeeper Mutant. *Cancer Cell* **19,** 679–690 (2011).
229. Seto, T. *et al.* CH5424802 (RO5424802) for patients with ALK-rearranged advanced non-small-cell lung cancer (AF-001JP study): a single-arm, open-label, phase 1–2 study. *Lancet Oncol.* **14,** 590–598 (2013).
230. Toyokawa, G., Seto, T., Takenoyama, M. & Ichinose, Y. Insights into brain metastasis in patients with ALK+ lung cancer: is the brain truly a sanctuary? *Cancer Metastasis Rev.* **34,** 797–805 (2015).
231. Dhillon, S. & Clark, M. Ceritinib: first global approval. *Drugs* **74,** 1285–91 (2014).
232. Friboulet, L. *et al.* The ALK inhibitor ceritinib overcomes crizotinib resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer Discov.* **4,** 662–73 (2014).
233. Marsilje, T. H. *et al.* Synthesis, Structure-Activity Relationships, and in Vivo Efficacy of the Novel Potent and Selective Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) Inhibitor 5-Chloro-N2-(2-isopropoxy-5-methyl-4-(piperidin-4-yl)phenyl)-N4-(2-(isopropylsulf onyl)phenyl)pyrimidine-2,4-dia. *J Med Chem* **56,** 5675–5690 (2013).
234. Shaw, A. *et al.* CERITINIB (LDK378) FOR TREATMENT OF PATIENTS WITH ALK-REARRANGED (ALK+) NON-SMALL CELL LUNG CANCER (NSCLC) AND BRAIN METASTASES (BM) IN THE ASCEND-1 TRIAL. *Neuro. Oncol.* **16,** v39–v39 (2014).
235. Zhang, S. *et al.* AP26113, a potent ALK inhibitor, overcomes mutations in EML4-ALK that confer resistance to PF-02341066 (PF1066): *Cancer Res.* **70,** LB–298–LB–298 (2010).
236. Squillace, R. M. *et al.* AP26113 possesses pan-inhibitory activity versus crizotinib-resistant ALK mutants and oncogenic ROS1 fusions. *Cancer Res.* **73,** 5655–5655 (2013).
237. Rivera, V. M. *et al.* AP26113 is a dual ALK/EGFR inhibitor: Characterization against EGFR T790M in cell and mouse models of NSCLC. *Cancer Res.* **72,** 1794–1794 (2012).
238. Camidge, D. R. *et al.* Safety and efficacy of brigatinib (AP26113) in advanced malignancies, including ALK+ non-small cell lung cancer (NSCLC). *ASCO Meet. Abstr.* **33,** 8062 (2015).
239. Shaw, A. T. *et al.* Resensitization to Crizotinib by the Lorlatinib ALK Resistance Mutation L1198F. *http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1508887* (2016).
240. George, S. K., Vishwamitra, D., Manshouri, R., Shi, P. & Amin, H. M. The ALK inhibitor ASP3026 eradicates NPM-ALK$^+$ T-cell anaplastic large-cell lymphoma in vitro and in a systemic xenograft lymphoma model. *Oncotarget* **5,** 5750–63 (2014).
241. Ait-Tahar, K., Barnardo, M. C. N. & Pulford, K. CD4 T-helper responses to the anaplastic lymphoma kinase (ALK) protein in patients with ALK-positive anaplastic large-cell lymphoma. *Cancer Res.* **67,** 1898–901 (2007).
242. Ait-Tahar, K. *et al.* B and CTL responses to the ALK protein in patients with ALK-positive ALCL. *Int. J. cancer* **118,** 688–95 (2006).
243. Pulford, K. *et al.* Immune response to the ALK oncogenic tyrosine kinase in patients with anaplastic large-cell lymphoma. *Blood* **96,** 1605–7 (2000).
244. Ait-Tahar, K. *et al.* Correlation of the autoantibody response to the ALK oncoantigen in pediatric anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large cell lymphoma with tumor dissemination and relapse risk. *Blood* **115,** 3314–9 (2010).

245. Mussolin, L. *et al.* Use of minimal disseminated disease and immunity to NPM-ALK antigen to stratify ALK-positive ALCL patients with different prognosis. *Leukemia* **27,** 416–22 (2013).
246. Mussolin, L. *et al.* Kinetics of humoral response to ALK and its relationship with minimal residual disease in pediatric ALCL. *Leukemia* **23,** 400–2 (2009).
247. Passoni, L. *et al.* ALK as a novel lymphoma-associated tumor antigen: identification of 2 HLA-A2.1-restricted CD8+ T-cell epitopes. *Blood* **99,** 2100–6 (2002).
248. Chiarle, R. *et al.* The anaplastic lymphoma kinase is an effective oncoantigen for lymphoma vaccination. *Nat. Med.* **14,** 676–680 (2008).
249. Ansell, S. M. *et al.* Phase I/II study of an anti-CD30 monoclonal antibody (MDX-060) in Hodgkin's lymphoma and anaplastic large-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **25,** 2764–9 (2007).
250. Forero-Torres, A. *et al.* A Phase II study of SGN-30 (anti-CD30 mAb) in Hodgkin lymphoma or systemic anaplastic large cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* **146,** 171–9 (2009).
251. Katz, J., Janik, J. E. & Younes, A. Brentuximab Vedotin (SGN-35). *Clin. Cancer Res.* **17,** 6428–36 (2011).
252. Senter, P. D. & Sievers, E. L. The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma. *Nat. Biotechnol.* **30,** 631–637 (2012).
253. Francisco, J. A. *et al.* cAC10-vcMMAE, an anti-CD30-monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity. *Blood* **102,** 1458–65 (2003).
254. Hamblett, K. J. *et al.* Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate. *Clin. Cancer Res.* **10,** 7063–70 (2004).
255. Younes, A. *et al.* Brentuximab Vedotin (SGN-35) for Relapsed CD30-Positive Lymphomas. *http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1002965* (2010).
256. Pro, B. *et al.* Brentuximab vedotin (SGN-35) in patients with relapsed or refractory systemic anaplastic large-cell lymphoma: results of a phase II study. *J. Clin. Oncol.* **30,** 2190–6 (2012).
257. Jackson, S. E. Hsp90: structure and function. *Top. Curr. Chem.* **328,** 155–240 (2013).
258. Bonvini, P., Gastaldi, T., Falini, B. & Rosolen, A. Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase (NPM-ALK), a novel Hsp90-client tyrosine kinase: down-regulation of NPM-ALK expression and tyrosine phosphorylation in ALK(+) CD30(+) lymphoma cells by the Hsp90 antagonist 17-allylamino,17-demethoxygeldanamycin. *Cancer Res.* **62,** 1559–66 (2002).
259. Bonvini, P., Dalla Rosa, H., Vignes, N. & Rosolen, A. Ubiquitination and proteasomal degradation of nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase induced by 17-allylamino-demethoxygeldanamycin: role of the co-chaperone carboxyl heat shock protein 70-interacting protein. *Cancer Res.* **64,** 3256–64 (2004).
260. Georgakis, G. V, Li, Y., Rassidakis, G. Z., Medeiros, L. J. & Younes, A. The HSP90 inhibitor 17-AAG synergizes with doxorubicin and U0126 in anaplastic large cell lymphoma irrespective of ALK expression. *Exp. Hematol.* **34,** 1670–9 (2006).
261. Sang, J. *et al.* Targeted inhibition of the molecular chaperone Hsp90 overcomes ALK inhibitor resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer Discov.* **3,** 430–43 (2013).
262. Bennani-Baiti, N., Ansell, S. & Feldman, A. L. Adult systemic anaplastic large-cell lymphoma: recommendations for diagnosis and management. *Expert Rev. Hematol.* **9,** 137–50 (2016).
263. Boya, P., Reggiori, F. & Codogno, P. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat. Cell Biol.* **15,** 713–720 (2013).
264. Deter, R. L., Baudhuin, P. & De Duve, C. Participation of lysosomes in cellular autophagy induced in rat liver by glucagon. *J. Cell Biol.* **35,** C11–6 (1967).
265. Deter, R. L. & De Duve, C. Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *J. Cell Biol.* **33,** 437–49 (1967).
266. Mizushima, N. Autophagy: process and function. *Genes Dev.* **21,** 2861–2873 (2007).
267. Badadani, M. & Badadani, M. Autophagy Mechanism, Regulation, Functions, and Disorders. *ISRN Cell Biol.* **2012,** 1–11 (2012).
268. Choi, A. M. K., Ryter, S. W. & Levine, B. Autophagy in Human Health and Disease. *N. Engl. J. Med.* **368,** 651–662 (2013).

269. Jiang, P. & Mizushima, N. Autophagy and human diseases. *Cell Res.* **24,** 69–79 (2014).
270. Li, W., Li, J. & Bao, J. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell. Mol. Life Sci.* **69,** 1125–36 (2012).
271. Mortimore, G. E., Hutson, N. J. & Surmacz, C. A. Quantitative correlation between proteolysis and macro- and microautophagy in mouse hepatocytes during starvation and refeeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80,** 2179–83 (1983).
272. Mijaljica, D., Prescott, M. & Devenish, R. J. Microautophagy in mammalian cells: Revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy* **7,** 673–682 (2011).
273. Kaushik, S. & Cuervo, A. M. Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol.* **22,** 407–17 (2012).
274. Bejarano, E. & Cuervo, A. M. Chaperone-mediated autophagy. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **7,** 29–39 (2010).
275. Dice, J. F. Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* **15,** 305–9 (1990).
276. Cuervo, A. M. & Dice, J. F. A Receptor for the Selective Uptake and Degradation of Proteins by Lysosomes. *Science (80-.).* **273,** 501–503 (1996).
277. Cuervo, A. M., Knecht, E., Terlecky, S. R. & Dice, J. F. Activation of a selective pathway of lysosomal proteolysis in rat liver by prolonged starvation. *Am. J. Physiol.* **269,** C1200–8 (1995).
278. Kiffin, R., Christian, C., Knecht, E. & Cuervo, A. M. Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. *Mol. Biol. Cell* **15,** 4829–40 (2004).
279. Wang, F. & Muller, S. Manipulating autophagic processes in autoimmune diseases: a special focus on modulating chaperone-mediated autophagy, an emerging therapeutic target. *Front. Immunol.* **6,** 252 (2015).
280. Zhou, J. *et al.* Chaperone-mediated autophagy regulates proliferation by targeting RND3 in gastric cancer. *Autophagy* **12,** 515–28 (2016).
281. Kon, M. *et al.* Chaperone-mediated autophagy is required for tumor growth. *Sci. Transl. Med.* **3,** 109ra117 (2011).
282. Lv, L. *et al.* Acetylation targets the M2 isoform of pyruvate kinase for degradation through chaperone-mediated autophagy and promotes tumor growth. *Mol. Cell* **42,** 719–30 (2011).
283. Saha, T. LAMP2A overexpression in breast tumors promotes cancer cell survival via chaperone-mediated autophagy. *Autophagy* **8,** 1643–56 (2012).
284. Knodler, L. A. & Celli, J. Eating the strangers within: host control of intracellular bacteria via xenophagy. *Cell. Microbiol.* **13,** 1319–27 (2011).
285. Mizushima, N., Yoshimori, T. & Levine, B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* **140,** 313–326 (2010).
286. Chen, Y. & Yu, L. Autophagic lysosome reformation. *Exp. Cell Res.* **319,** 142–146 (2013).
287. Yu, L. *et al.* Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature* **465,** 942–946 (2010).
288. Bjørkøy, G. *et al.* p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J. Cell Biol.* **171,** 603–14 (2005).
289. Trocoli, A. Etude de la régulation de l ' autophagie au cours de la différenciation des cellules de leucémie aiguë promyélocytaire : rôles dans la survie et la différenciation cellulaire ? (2013).
290. Okamoto, K. Organellophagy: eliminating cellular building blocks via selective autophagy. *J. Cell Biol.* **205,** 435–45 (2014).
291. Svenning, S. & Johansen, T. Selective autophagy. *Essays Biochem.* **55,** 79–92 (2013).
292. Roberts, R. *et al.* Omegasomes: PI3P platforms that manufacture autophagosomes. *Essays Biochem.* **55,** 17–27 (2013).
293. Bjørkøy, G., Lamark, T. & Johansen, T. p62/SQSTM1: a missing link between protein aggregates and the autophagy machinery. *Autophagy* **2,** 138–9
294. Lippai, M. & Lőw, P. The role of the selective adaptor p62 and ubiquitin-like proteins in autophagy. *Biomed Res. Int.* **2014,** 832704 (2014).

295. Goussetis, D. J. *et al.* Autophagic degradation of the BCR-ABL oncoprotein and generation of antileukemic responses by arsenic trioxide. *Blood* **120,** 3555–62 (2012).
296. Orhon, I., Dupont, N., Pampliega, O., Cuervo, A. M. & Codogno, P. Autophagy and regulation of cilia function and assembly. *Cell Death Differ.* **22,** 389–397 (2015).
297. Hasegawa, J., Maejima, I., Iwamoto, R. & Yoshimori, T. Selective autophagy: Lysophagy. *Methods* **75,** 128–132 (2015).
298. Tsukada, M. & Ohsumi, Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of Saccharomyces cerevisiae. *FEBS Lett.* **333,** 169–74 (1993).
299. Lamb, C. A., Yoshimori, T. & Tooze, S. A. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14,** 759–774 (2013).
300. Proikas-Cezanne, T. *et al.* WIPI proteins: essential PtdIns3P effectors at the nascent autophagosome. *J. Cell Sci.* **128,** 207–17 (2015).
301. Carlsson, S. R. & Simonsen, A. Membrane dynamics in autophagosome biogenesis. *J. Cell Sci.* **128,** 193–205 (2015).
302. Böckler, S. & Westermann, B. ER-mitochondria contacts as sites of mitophagosome formation. *Autophagy* **10,** 1346–7 (2014).
303. Graef, M., Friedman, J. R., Graham, C., Babu, M. & Nunnari, J. ER exit sites are physical and functional core autophagosome biogenesis components. *Mol. Biol. Cell* **24,** 2918–31 (2013).
304. Appenzeller-Herzog, C. *et al.* The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function. *J. Cell Sci.* **119,** 2173–2183 (2006).
305. van der Vaart, A., Griffith, J. & Reggiori, F. Exit from the Golgi Is Required for the Expansion of the Autophagosomal Phagophore in Yeast Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Biol. Cell* **21,** 2270–2284 (2010).
306. Ravikumar, B., Moreau, K., Jahreiss, L., Puri, C. & Rubinsztein, D. C. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat. Cell Biol.* **12,** 747–57 (2010).
307. Puri, C., Renna, M., Bento, C. F., Moreau, K. & Rubinsztein, D. C. Diverse autophagosome membrane sources coalesce in recycling endosomes. *Cell* **154,** 1285–99 (2013).
308. Biazik, J., Ylä-Anttila, P., Vihinen, H., Jokitalo, E. & Eskelinen, E.-L. Ultrastructural relationship of the phagophore with surrounding organelles. *Autophagy* **11,** 439–51 (2015).
309. Karanasios, E. *et al.* Autophagy initiation by ULK complex assembly on ER tubulovesicular regions marked by ATG9 vesicles. *Nat. Commun.* **7,** 12420 (2016).
310. Lee, E.-J. & Tournier, C. The requirement of uncoordinated 51-like kinase 1 (ULK1) and ULK2 in the regulation of autophagy. *Autophagy* **7,** 689–95 (2011).
311. Wong, P.-M., Puente, C., Ganley, I. G. & Jiang, X. The ULK1 complex: sensing nutrient signals for autophagy activation. *Autophagy* **9,** 124–37 (2013).
312. Ganley, I. G. *et al.* ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J. Biol. Chem.* **284,** 12297–305 (2009).
313. Kim, J., Kundu, M., Viollet, B. & Guan, K.-L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* **13,** 132–41 (2011).
314. Funderburk, S. F., Wang, Q. J. & Yue, Z. The Beclin 1-VPS34 complex--at the crossroads of autophagy and beyond. *Trends Cell Biol.* **20,** 355–62 (2010).
315. Noda, N. N. & Fujioka, Y. Atg1 family kinases in autophagy initiation. *Cell. Mol. Life Sci.* **72,** 3083–96 (2015).
316. Russell, R. C. *et al.* ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat. Cell Biol.* **15,** 741–750 (2013).
317. Burman, C. & Ktistakis, N. T. Regulation of autophagy by phosphatidylinositol 3-phosphate. *FEBS Lett.* **584,** 1302–12 (2010).
318. Sun, Q. *et al.* Identification of Barkor as a mammalian autophagy-specific factor for Beclin 1 and class III phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105,** 19211–6 (2008).
319. Matsunaga, K. *et al.* Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat. Cell Biol.* **11,** 385–396 (2009).

320. Itakura, E., Kishi, C., Inoue, K. & Mizushima, N. Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol. Biol. Cell* **19,** 5360–72 (2008).
321. Takahashi, Y. *et al.* Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat. Cell Biol.* **9,** 1142–51 (2007).
322. Morris, D. H., Yip, C. K., Shi, Y., Chait, B. T. & Wang, Q. J. BECLIN 1-VPS34 COMPLEX ARCHITECTURE: UNDERSTANDING THE NUTS AND BOLTS OF THERAPEUTIC TARGETS. *Front. Biol. (Beijing).* **10,** 398–426 (2015).
323. Pattingre, S. *et al.* Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* **122,** 927–39 (2005).
324. Mizushima, N., Yoshimori, T. & Ohsumi, Y. Role of the Apg12 conjugation system in mammalian autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **35,** 553–61 (2003).
325. Geng, J. & Klionsky, D. J. The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep.* **9,** 859–64 (2008).
326. Tanida, I., Ueno, T. & Kominami, E. Human light chain 3/MAP1LC3B is cleaved at its carboxyl-terminal Met121 to expose Gly120 for lipidation and targeting to autophagosomal membranes. *J. Biol. Chem.* **279,** 47704–10 (2004).
327. Tanida, I., Ueno, T. & Kominami, E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36,** 2503–18 (2004).
328. Kabeya, Y. *et al.* LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* **19,** 5720–8 (2000).
329. Klionsky, D. J. *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* **12,** 1–222 (2016).
330. Jahreiss, L., Menzies, F. M. & Rubinsztein, D. C. The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. *Traffic* **9,** 574–87 (2008).
331. Hyttinen, J. M. T., Niittykoski, M., Salminen, A. & Kaarniranta, K. Maturation of autophagosomes and endosomes: A key role for Rab7. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1833,** 503–510 (2013).
332. Metcalf, D. & Isaacs, A. M. The role of ESCRT proteins in fusion events involving lysosomes, endosomes and autophagosomes. *Biochem. Soc. Trans.* **38,** 1469–73 (2010).
333. Moreau, K., Renna, M. & Rubinsztein, D. C. Connections between SNAREs and autophagy. *Trends Biochem. Sci.* **38,** 57–63 (2013).
334. Eskelinen, E.-L. *et al.* Role of LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol. Biol. Cell* **13,** 3355–68 (2002).
335. Yu, Z.-Q. *et al.* Dual roles of Atg8-PE deconjugation by Atg4 in autophagy. *Autophagy* **8,** 883–92 (2012).
336. Chen, Y. & Yu, L. Autophagic lysosome reformation. *Exp. Cell Res.* **319,** 142–6 (2013).
337. Codogno, P., Mehrpour, M. & Proikas-Cezanne, T. Canonical and non-canonical autophagy: variations on a common theme of self-eating? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13,** 7–12 (2012).
338. Scarlatti, F., Maffei, R., Beau, I., Codogno, P. & Ghidoni, R. Role of non-canonical Beclin 1-independent autophagy in cell death induced by resveratrol in human breast cancer cells. *Cell Death Differ.* **15,** 1318–29 (2008).
339. De Duve, C. & Wattiaux, R. Functions of lysosomes. *Annu. Rev. Physiol.* **28,** 435–92 (1966).
340. Torisu, T. *et al.* Autophagy regulates endothelial cell processing, maturation and secretion of von Willebrand factor. *Nat. Med.* **19,** 1281–7 (2013).
341. Ylä-Anttila, P., Vihinen, H., Jokitalo, E. & Eskelinen, E.-L. Monitoring autophagy by electron microscopy in Mammalian cells. *Methods Enzymol.* **452,** 143–64 (2009).
342. Bauvy, C., Meijer, A. J. & Codogno, P. *Chapter 4 Assaying of Autophagic Protein Degradation*. *Methods Enzymol.* **451,** (Elsevier Inc., 2009).
343. Gump, J. M. & Thorburn, A. Sorting cells for basal and induced autophagic flux by quantitative ratiometric flow cytometry. *Autophagy* **10,** 1327–34 (2014).
344. Pankiv, S. *et al.* p62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of

Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy. *J. Biol. Chem.* **282,** 24131–24145 (2007).
345. Ni, H.-M. *et al.* Dissecting the dynamic turnover of GFP-LC3 in the autolysosome. *Autophagy* **7,** 188–204 (2011).
346. Biederbick, A., Kern, H. F. & Elsässer, H. P. Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. *Eur. J. Cell Biol.* **66,** 3–14 (1995).
347. Paglin, S. *et al.* A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res.* **61,** 439–44 (2001).
348. Scott, R. C., Schuldiner, O. & Neufeld, T. P. Role and regulation of starvation-induced autophagy in the Drosophila fat body. *Dev. Cell* **7,** 167–78 (2004).
349. Füllgrabe, J., Klionsky, D. J. & Joseph, B. The return of the nucleus: transcriptional and epigenetic control of autophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15,** 65–74 (2014).
350. Li, H., Qiu, S., Li, X., Li, M. & Peng, Y. Autophagy biomarkers in CSF correlates with infarct size, clinical severity and neurological outcome in AIS patients. *J. Transl. Med.* **13,** 359 (2015).
351. Rothe, K. *et al.* The core autophagy protein ATG4B is a potential biomarker and therapeutic target in CML stem/progenitor cells. *Blood* **123,** 3622–34 (2014).
352. Ladoire, S. *et al.* Immunohistochemical detection of cytoplasmic LC3 puncta in human cancer specimens. *Autophagy* **8,** 1175–84 (2012).
353. Schläfli, A. M., Berezowska, S., Adams, O., Langer, R. & Tschan, M. P. Reliable LC3 and p62 autophagy marker detection in formalin fixed paraffin embedded human tissue by immunohistochemistry. *Eur. J. Histochem.* **59,** 2481 (2015).
354. Kraya, A. A. *et al.* Identification of secreted proteins that reflect autophagy dynamics within tumor cells. *Autophagy* **11,** 60–74 (2015).
355. Lin, W. & Kuang, H. Oxidative stress induces autophagy in response to multiple noxious stimuli in retinal ganglion cells. *Autophagy* **10,** 1692–701 (2014).
356. Kroemer, G., Mariño, G. & Levine, B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol. Cell* **40,** 280–93 (2010).
357. Huang, Z., Zhou, L., Chen, Z., Nice, E. C. & Huang, C. Stress management by autophagy: Implications for chemoresistance. *Int. J. Cancer* **139,** 23–32 (2016).
358. Frankel, L. B. & Lund, A. H. MicroRNA regulation of autophagy. *Carcinogenesis* **33,** 2018–25 (2012).
359. Kim, C. *et al.* The RNA-binding protein HuD regulates autophagosome formation in pancreatic β cells by promoting autophagy-related gene 5 expression. *J. Biol. Chem.* **289,** 112–21 (2014).
360. Su, Z. *et al.* Overexpression of RBM5 induces autophagy in human lung adenocarcinoma cells. *World J. Surg. Oncol.* **14,** 57 (2016).
361. Laplante, M. & Sabatini, D. M. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* **149,** 274–93 (2012).
362. Jung, C. H., Ro, S.-H., Cao, J., Otto, N. M. & Kim, D.-H. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett.* **584,** 1287–95 (2010).
363. Kim, Y. C. & Guan, K.-L. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. *J. Clin. Invest.* **125,** 25–32 (2015).
364. Sabatini, D. M. mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat. Rev. Cancer* **6,** 729–734 (2006).
365. Laplante, M. & Sabatini, D. M. mTOR signaling at a glance. *J. Cell Sci.* **122,** 3589–94 (2009).
366. Sengupta, S., Peterson, T. R. & Sabatini, D. M. Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol. Cell* **40,** 310–22 (2010).
367. Giaccia, A. J., Simon, M. C. & Johnson, R. The biology of hypoxia: the role of oxygen sensing in development, normal function, and disease. *Genes Dev.* **18,** 2183–2194 (2004).
368. Dennis, P. B. *et al.* Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science* **294,** 1102–5 (2001).
369. Kim, E. Mechanisms of amino acid sensing in mTOR signaling pathway. *Nutr. Res. Pract.* **3,** 64–71 (2009).
370. Orlova, K. A. & Crino, P. B. The tuberous sclerosis complex. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1184,** 87–105 (2010).

371. Long, X., Lin, Y., Ortiz-Vega, S., Yonezawa, K. & Avruch, J. Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Curr. Biol.* **15,** 702–13 (2005).
372. Sancak, Y. *et al.* PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol. Cell* **25,** 903–15 (2007).
373. Inoki, K., Zhu, T. & Guan, K.-L. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* **115,** 577–90 (2003).
374. Tee, A. R., Manning, B. D., Roux, P. P., Cantley, L. C. & Blenis, J. Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Curr. Biol.* **13,** 1259–68 (2003).
375. Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J. & Guan, K.-L. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat. Cell Biol.* **4,** 648–57 (2002).
376. Ma, X. M. & Blenis, J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10,** 307–18 (2009).
377. Wang, L., Harris, T. E., Roth, R. A. & Lawrence, J. C. PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding. *J. Biol. Chem.* **282,** 20036–44 (2007).
378. Hardie, D. G. AMPK--sensing energy while talking to other signaling pathways. *Cell Metab.* **20,** 939–52 (2014).
379. Gwinn, D. M. *et al.* AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol. Cell* **30,** 214–26 (2008).
380. Brugarolas, J. *et al.* Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev.* **18,** 2893–904 (2004).
381. Nobukuni, T. *et al.* Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102,** 14238–43 (2005).
382. Smith, E. M., Finn, S. G., Tee, A. R., Browne, G. J. & Proud, C. G. The Tuberous Sclerosis Protein TSC2 Is Not Required for the Regulation of the Mammalian Target of Rapamycin by Amino Acids and Certain Cellular Stresses. *J. Biol. Chem.* **280,** 18717–18727 (2005).
383. Sancak, Y. *et al.* Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* **141,** 290–303 (2010).
384. Sancak, Y. *et al.* The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* **320,** 1496–501 (2008).
385. Hosokawa, N. *et al.* Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol. Biol. Cell* **20,** 1981–91 (2009).
386. Kim, J., Kundu, M., Viollet, B. & Guan, K.-L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* **13,** 132–41 (2011).
387. Jung, C. H. *et al.* ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol. Biol. Cell* **20,** 1992–2003 (2009).
388. Yuan, H.-X., Russell, R. C. & Guan, K.-L. Regulation of PIK3C3/VPS34 complexes by MTOR in nutrient stress-induced autophagy. *Autophagy* **9,** 1983–95 (2013).
389. Martina, J. A., Chen, Y., Gucek, M. & Puertollano, R. MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB. *Autophagy* **8,** 903–14 (2012).
390. Enpeng Zhao, M. J. C. TFEB: A Central Regulator of both the Autophagosome and Lysosome. *Hepatology* **55,** 1632 (2012).
391. Roczniak-Ferguson, A. *et al.* The transcription factor TFEB links mTORC1 signaling to transcriptional control of lysosome homeostasis. *Sci. Signal.* **5,** ra42 (2012).
392. Puertollano, R. mTOR and lysosome regulation. *F1000Prime Rep.* **6,** 52 (2014).
393. Richter, J. D. & Sonenberg, N. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* **433,** 477–480 (2005).
394. Lamming, D. W. & Sabatini, D. M. A Central role for mTOR in lipid homeostasis. *Cell Metab.* **18,** 465–9 (2013).
395. Sun, Q. *et al.* Mammalian target of rapamycin up-regulation of pyruvate kinase isoenzyme type M2 is critical for aerobic glycolysis and tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108,** 4129–4134 (2011).

396. Morita, M. *et al.* mTORC1 Controls Mitochondrial Activity and Biogenesis through 4E-BP-Dependent Translational Regulation. *Cell Metab.* **18,** 698–711 (2013).
397. Zhu, H. *et al.* Regulation of autophagy by a beclin 1-targeted microRNA, miR-30a, in cancer cells. *Autophagy* **5,** 816–23 (2009).
398. Zou, Z. *et al.* MicroRNA-30a sensitizes tumor cells to cis-platinum via suppressing beclin 1-mediated autophagy. *J. Biol. Chem.* **287,** 4148–56 (2012).
399. Yu, Y. *et al.* Targeting microRNA-30a-mediated autophagy enhances imatinib activity against human chronic myeloid leukemia cells. *Leukemia* **26,** 1752–60 (2012).
400. Zheng, B. *et al.* MiRNA-30a-mediated autophagy inhibition sensitizes renal cell carcinoma cells to sorafenib. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **459,** 234–9 (2015).
401. Huang, J., Huang, C., Luo, Y., Liu, S. & Chen, X. Role of MiR-30a in cardiomyocyte autophagy induced by Angiotensin II. *J. Renin. Angiotensin. Aldosterone. Syst.* **16,** 1–5 (2015).
402. Wang, P. *et al.* Down-regulation of miRNA-30a alleviates cerebral ischemic injury through enhancing beclin 1-mediated autophagy. *Neurochem. Res.* **39,** 1279–91 (2014).
403. Chen, Z. *et al.* Inhibition of Autophagy by MiR-30A Induced by Mycobacteria tuberculosis as a Possible Mechanism of Immune Escape in Human Macrophages. *Jpn. J. Infect. Dis.* **68,** 420–4 (2015).
404. Frankel, L. B. & Lund, A. H. MicroRNA regulation of autophagy. *Carcinogenesis* **33,** 2018–25 (2012).
405. Chen, Y. *et al.* Oncogenic and tumor suppressive roles of microRNAs in apoptosis and autophagy. *Apoptosis* **19,** 1177–89 (2014).
406. Zhai, H., Fesler, A. & Ju, J. MicroRNA: a third dimension in autophagy. *Cell Cycle* **12,** 246–50 (2013).
407. Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y. & Yu, Q. MicroRNAs in apoptosis, autophagy and necroptosis. *Oncotarget* (2015).
408. Frankel, L. B. *et al.* microRNA-101 is a potent inhibitor of autophagy. *EMBO J.* **30,** 4628–41 (2011).
409. Xu, Y. *et al.* miR-101 inhibits autophagy and enhances cisplatin-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Oncol. Rep.* **29,** 2019–24 (2013).
410. Lin, S. *et al.* Effect of microRNA-101 on proliferation and apoptosis of human osteosarcoma cells by targeting mTOR. *J. Huazhong Univ. Sci. Technolog. Med. Sci.* **34,** 889–95 (2014).
411. Riquelme, I. *et al.* miR-101-2, miR-125b-2 and miR-451a act as potential tumor suppressors in gastric cancer through regulation of the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Cell. Oncol. (Dordr).* **39,** 23–33 (2016).
412. Kojima, K., Fujita, Y., Nozawa, Y., Deguchi, T. & Ito, M. MiR-34a attenuates paclitaxel-resistance of hormone-refractory prostate cancer PC3 cells through direct and indirect mechanisms. *Prostate* **70,** 1501–12 (2010).
413. Huang, J. *et al.* miR-34a modulates angiotensin II-induced myocardial hypertrophy by direct inhibition of ATG9A expression and autophagic activity. *PLoS One* **9,** e94382 (2014).
414. Misso, G. *et al.* Mir-34: a new weapon against cancer? *Mol. Ther. Nucleic Acids* **3,** e194 (2014).
415. Tazawa, H. *et al.* Genetically engineered oncolytic adenovirus induces autophagic cell death through an E2F1-microRNA-7-epidermal growth factor receptor axis. *Int. J. cancer* **131,** 2939–50 (2012).
416. Kefas, B. *et al.* microRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the Akt pathway and is down-regulated in glioblastoma. *Cancer Res.* **68,** 3566–72 (2008).
417. Wei, Y. *et al.* EGFR-mediated Beclin 1 phosphorylation in autophagy suppression, tumor progression, and tumor chemoresistance. *Cell* **154,** 1269–84 (2013).
418. Scaltriti, M. & Baselga, J. The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin. Cancer Res.* **12,** 5268–72 (2006).
419. Kozomara, A. & Griffiths-Jones, S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* **42,** D68–73 (2014).
420. Türei, D. *et al.* Autophagy Regulatory Network - a systems-level bioinformatics resource for

studying the mechanism and regulation of autophagy. *Autophagy* **11,** 155–65 (2015).
421. Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M. & Klionsky, D. J. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* **451,** 1069–75 (2008).
422. White, E. & DiPaola, R. S. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin. Cancer Res.* **15,** 5308–16 (2009).
423. Liang, X. H. *et al.* Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* **402,** 672–6 (1999).
424. Aita, V. M. *et al.* Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics* **59,** 59–65 (1999).
425. Qu, X. *et al.* Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J. Clin. Invest.* **112,** 1809–20 (2003).
426. Takamura, A. *et al.* Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev.* **25,** 795–800 (2011).
427. Mariño, G. *et al.* Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/autophagin-3. *J. Biol. Chem.* **282,** 18573–83 (2007).
428. Mortensen, M. *et al.* The autophagy protein Atg7 is essential for hematopoietic stem cell maintenance. *J. Exp. Med.* **208,** 455–67 (2011).
429. Park, S. M. *et al.* U2AF35(S34F) Promotes Transformation by Directing Aberrant ATG7 Pre-mRNA 3′ End Formation. *Mol. Cell* **62,** 479–490 (2016).
430. Galluzzi, L. *et al.* Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *EMBO J.* **34,** 856–880 (2015).
431. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144,** 646–674 (2011).
432. Yip, K. W. & Reed, J. C. Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene* **27,** 6398–6406 (2008).
433. Shen, Z. Genomic instability and cancer: an introduction. *J. Mol. Cell Biol.* **3,** 1–3 (2011).
434. Mathew, R. *et al.* Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev.* **21,** 1367–1381 (2007).
435. Duran, A. *et al.* The signaling adaptor p62 is an important NF-kappaB mediator in tumorigenesis. *Cancer Cell* **13,** 343–54 (2008).
436. Murphy, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* **417,** 1–13 (2009).
437. Grivennikov, S. I., Greten, F. R. & Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140,** 883–99 (2010).
438. Deretic, V., Saitoh, T. & Akira, S. Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **13,** 722–737 (2013).
439. Degenhardt, K. *et al.* Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* **10,** 51–64 (2006).
440. Kono, H. & Rock, K. L. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat. Rev. Immunol.* **8,** 279–89 (2008).
441. Zitvogel, L., Kepp, O., Galluzzi, L. & Kroemer, G. Inflammasomes in carcinogenesis and anticancer immune responses. *Nat. Immunol.* **13,** 343–51 (2012).
442. Nakahira, K. *et al.* Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat. Immunol.* **12,** 222–30 (2011).
443. de Luca, A. *et al.* IL-1 receptor blockade restores autophagy and reduces inflammation in chronic granulomatous disease in mice and in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111,** 3526–31 (2014).
444. Levine, B., Mizushima, N. & Virgin, H. W. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* **469,** 323–35 (2011).
445. Zhang, L. *et al.* Xenophagy in Helicobacter pylori- and Epstein-Barr virus-induced gastric cancer. *J. Pathol.* **233,** 103–12 (2014).
446. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the Warburg effect: the

metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **324,** 1029–33 (2009).
447. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144,** 646–674 (2011).
448. Galluzzi, L., Kepp, O., Heiden, M. G. Vander & Kroemer, G. Metabolic targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **12,** 829–846 (2013).
449. Green, D. R., Galluzzi, L. & Kroemer, G. Cell biology. Metabolic control of cell death. *Science* **345,** 1250256 (2014).
450. Tsujimoto, Y. & Shimizu, S. Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death Differ.* **12,** 1528–1534 (2005).
451. Shen, H.-M. & Codogno, P. Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species? *Autophagy* **7,** 457–65 (2011).
452. Kroemer, G. & Levine, B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9,** 1004–10 (2008).
453. Fulda, S. & Kögel, D. Cell death by autophagy: emerging molecular mechanisms and implications for cancer therapy. *Oncogene* **34,** 5105–5113 (2015).
454. Shen, S., Kepp, O. & Kroemer, G. The end of autophagic cell death? *Autophagy* **8,** 1–3 (2012).
455. Belaid, A. *et al.* Autophagy and SQSTM1 on the RHOA(d) again. *http://dx.doi.org/10.4161/auto.27198* (2013).
456. Dou, Z. *et al.* Autophagy mediates degradation of nuclear lamina. *Nature* **527,** 105–109 (2015).
457. Courtois-Cox, S., Jones, S. L. & Cichowski, K. Many roads lead to oncogene-induced senescence. *Oncogene* **27,** 2801–2809 (2008).
458. Mathew, R. & White, E. Autophagy in tumorigenesis and energy metabolism: friend by day, foe by night. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **21,** 113–119 (2011).
459. White, E. & Lowe, S. W. Eating to exit: autophagy-enabled senescence revealed. doi:10.1101/gad.1795309
460. Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M. & Kroemer, G. Autophagy Mediates Tumor Suppression via Cellular Senescence. *Trends Cell Biol.* **26,** 1–3 (2016).
461. Gewirtz, D. A. Autophagy and senescence in cancer therapy. *J. Cell. Physiol.* **229,** 6–9 (2014).
462. García-Prat, L. *et al.* Autophagy maintains stemness by preventing senescence. *Nature* **529,** 37–42 (2016).
463. Inoue, D. *et al.* Accumulation of p62/SQSTM1 is associated with poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma. *Cancer Sci.* **103,** 760–6 (2012).
464. Thompson, H. G. R., Harris, J. W., Wold, B. J., Lin, F. & Brody, J. P. p62 overexpression in breast tumors and regulation by prostate-derived Ets factor in breast cancer cells. *Oncogene* **22,** 2322–33 (2003).
465. Rolland, P. *et al.* The ubiquitin-binding protein p62 is expressed in breast cancers showing features of aggressive disease. *Endocr. Relat. Cancer* **14,** 73–80 (2007).
466. Puissant, A., Fenouille, N. & Auberger, P. When autophagy meets cancer through p62/SQSTM1. *Am. J. Cancer Res.* **2,** 397–413 (2012).
467. Isakson, P., Bjørås, M., Bøe, S. O. & Simonsen, A. Autophagy contributes to therapy-induced degradation of the PML/RARA oncoprotein. *Blood* **116,** 2324–31 (2010).
468. Weinstein, I. B., Joe, A. & Felsher, D. Oncogene Addiction. *Cancer Res.* **68,** 3077–3080 (2008).
469. Rodriguez, O. C. *et al.* Dietary downregulation of mutant p53 levels via glucose restriction: mechanisms and implications for tumor therapy. *Cell Cycle* **11,** 4436–46 (2012).
470. Choudhury, S., Kolukula, V. K., Preet, A., Albanese, C. & Avantaggiati, M. L. Dissecting the pathways that destabilize mutant p53: the proteasome or autophagy? *Cell Cycle* **12,** 1022–9 (2013).
471. Schlie, K. *et al.* When Cells Suffocate: Autophagy in Cancer and Immune Cells under Low Oxygen. *Int. J. Cell Biol.* **2011,** 470597 (2011).
472. Ma, Y. *et al.* Autophagy and Cellular Immune Responses. *Immunity* **39,** 211–227 (2013).
473. Chemali, M., Radtke, K., Desjardins, M. & English, L. Alternative pathways for MHC class I

presentation: a new function for autophagy. *Cell. Mol. Life Sci.* **68,** 1533–41 (2011).
474. Schmid, D., Pypaert, M. & Münz, C. Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes. *Immunity* **26,** 79–92 (2007).
475. Jia, W. & He, Y.-W. Temporal regulation of intracellular organelle homeostasis in T lymphocytes by autophagy. *J. Immunol.* **186,** 5313–22 (2011).
476. Kovacs, J. R. *et al.* Autophagy promotes T-cell survival through degradation of proteins of the cell death machinery. *Cell Death Differ.* **19,** 144–52 (2012).
477. Rao, S., Yang, H., Penninger, J. M. & Kroemer, G. Autophagy in non-small cell lung carcinogenesis: A positive regulator of antitumor immunosurveillance. *Autophagy* **10,** 529–31 (2014).
478. Kim, M.-J. *et al.* Involvement of autophagy in oncogenic K-Ras-induced malignant cell transformation. *J. Biol. Chem.* **286,** 12924–32 (2011).
479. Parkhitko, A. *et al.* Tumorigenesis in tuberous sclerosis complex is autophagy and p62/sequestosome 1 (SQSTM1)-dependent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108,** 12455–60 (2011).
480. Nelson, D. A. *et al.* Hypoxia and defective apoptosis drive genomic instability and tumorigenesis. *Genes Dev.* **18,** 2095–107 (2004).
481. Yang, S. *et al.* Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes Dev.* **25,** 717–29 (2011).
482. Gonzalez, C. D. *et al.* Autophagy, Warburg, and Warburg reverse effects in human cancer. *Biomed Res. Int.* **2014,** 926729 (2014).
483. Guo, J. Y. *et al.* Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev.* **25,** 460–70 (2011).
484. Pavlides, S. *et al.* Warburg Meets Autophagy: Cancer-Associated Fibroblasts Accelerate Tumor Growth and Metastasis via Oxidative Stress, Mitophagy, and Aerobic Glycolysis. *http://www.liebertpub.com/ars* (2012).
485. Poillet-Perez, L., Despouy, G., Delage-Mourroux, R. & Boyer-Guittaut, M. Interplay between ROS and autophagy in cancer cells, from tumor initiation to cancer therapy. *Redox Biol.* **4,** 184–192 (2015).
486. Amaravadi, R. K. Autophagy-induced tumor dormancy in ovarian cancer. *J. Clin. Invest.* **118,** 3837–40 (2008).
487. Kenific, C. M., Thorburn, A. & Debnath, J. Autophagy and metastasis: another double-edged sword. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22,** 241–5 (2010).
488. Viale, A. *et al.* Oncogene ablation-resistant pancreatic cancer cells depend on mitochondrial function. *Nature* **514,** 628–32 (2014).
489. Yue, W. *et al.* Inhibition of the autophagic flux by salinomycin in breast cancer stem-like/progenitor cells interferes with their maintenance. *Autophagy* **9,** 714–29 (2013).
490. Ojha, R., Jha, V., Singh, S. K. & Bhattacharyya, S. Autophagy inhibition suppresses the tumorigenic potential of cancer stem cell enriched side population in bladder cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1842,** 2073–2086 (2014).
491. Song, Y.-J. *et al.* Autophagy contributes to the survival of CD133+ liver cancer stem cells in the hypoxic and nutrient-deprived tumor microenvironment. *Cancer Lett.* **339,** 70–81 (2013).
492. Sosa, M. S., Bragado, P. & Aguirre-Ghiso, J. A. Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nat. Rev. Cancer* **14,** 611–22 (2014).
493. Gewirtz, D. a. Autophagy, senescence and tumor dormancy in cancer therapy. *Autophagy* **5,** 1232–4 (2009).
494. Chambers, A. F., Groom, A. C. & MacDonald, I. C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer* **2,** 563–72 (2002).
495. Thorburn, J. *et al.* Autophagy regulates selective HMGB1 release in tumor cells that are destined to die. *Cell Death Differ.* **16,** 175–83 (2009).
496. Han, J. *et al.* Involvement of protective autophagy in TRAIL resistance of apoptosis-defective

tumor cells. *J. Biol. Chem.* **283,** 19665–77 (2008).
497. Shin, M. S. *et al.* Mutations of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1) and receptor 2 (TRAIL-R2) genes in metastatic breast cancers. *Cancer Res.* **61,** 4942–6 (2001).
498. Fung, C., Lock, R., Gao, S., Salas, E. & Debnath, J. Induction of autophagy during extracellular matrix detachment promotes cell survival. *Mol. Biol. Cell* **19,** 797–806 (2008).
499. Kim, Y. H. *et al.* Uncoordinated 51-like kinase 2 signaling pathway regulates epithelial-mesenchymal transition in A549 lung cancer cells. *FEBS Lett.* **590,** 1365–74 (2016).
500. Nitta, T. *et al.* Autophagy may promote carcinoma cell invasion and correlate with poor prognosis in cholangiocarcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **7,** 4913–21 (2014).
501. Catalano, M. *et al.* Autophagy induction impairs migration and invasion by reversing EMT in glioblastoma cells. *Mol. Oncol.* **9,** 1612–1625 (2015).
502. Grassi, G. *et al.* Autophagy regulates hepatocyte identity and epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transitions promoting Snail degradation. *Cell Death Dis.* **6,** e1880 (2015).
503. Chen, H.-Y. & White, E. Role of autophagy in cancer prevention. *Cancer Prev. Res. (Phila).* **4,** 973–83 (2011).
504. Kimmelman, A. C. The dynamic nature of autophagy in cancer. *Genes Dev.* **25,** 1999–2010 (2011).
505. Gewirtz, D. A. *et al.* The four faces of autophagy: implications for cancer therapy. *Cancer Res.* **74,** 647–51 (2014).
506. Gewirtz, D. a. When cytoprotective autophagy isn't… and even when it is. *Autophagy* **10,** 391–2 (2014).
507. Ozpolat, B. & Benbrook, D. M. Targeting autophagy in cancer management - strategies and developments. *Cancer Manag. Res.* **7,** 291–9 (2015).
508. Bellodi, C. *et al.* Targeting autophagy potentiates tyrosine kinase inhibitor – induced cell death in Philadelphia chromosome – positive cells , including primary CML stem cells. doi:10.1172/JCI35660.exerts
509. Torgersen, M. L., Engedal, N., Bøe, S. O., Hokland, P. & Simonsen, A. Targeting autophagy potentiates the apoptotic effect of histone deacetylase inhibitors in t(8;21) AML cells. *Blood* **122,** 2467–2476 (2013).
510. Bristol, M. L. *et al.* Dual functions of autophagy in the response of breast tumor cells to radiation: cytoprotective autophagy with radiation alone and cytotoxic autophagy in radiosensitization by vitamin D 3. *Autophagy* **8,** 739–53 (2012).
511. Hashimoto, D. *et al.* Autophagy is needed for the growth of pancreatic adenocarcinoma and has a cytoprotective effect against anticancer drugs. *Eur. J. Cancer* **50,** 1382–90 (2014).
512. Hahm, E.-R., Sakao, K. & Singh, S. V. Honokiol activates reactive oxygen species-mediated cytoprotective autophagy in human prostate cancer cells. *Prostate* **74,** 1209–21 (2014).
513. He, J. *et al.* Downregulation of ATG14 by EGR1-MIR152 sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin-induced apoptosis by inhibiting cyto-protective autophagy. *Autophagy* **11,** 373–84 (2015).
514. Han, W. *et al.* EGFR tyrosine kinase inhibitors activate autophagy as a cytoprotective response in human lung cancer cells. *PLoS One* **6,** e18691 (2011).
515. Yan, Y. *et al.* Targeting autophagy to sensitive glioma to temozolomide treatment. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **35,** 23 (2016).
516. Gammoh, N. *et al.* Role of autophagy in histone deacetylase inhibitor-induced apoptotic and nonapoptotic cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109,** 6561–5 (2012).
517. Gupta, A. *et al.* Autophagy inhibition and antimalarials promote cell death in gastrointestinal stromal tumor (GIST). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107,** 14333–14338 (2010).
518. Fulda, S. & Kögel, D. Cell death by autophagy: emerging molecular mechanisms and implications for cancer therapy. *Oncogene* **34,** 5105–5113 (2015).
519. Akar, U. *et al.* Silencing of Bcl-2 expression by small interfering RNA induces autophagic cell

death in MCF-7 breast cancer cells. *Autophagy* **4,** 669–679 (2008).
520. Peng, P., Kuo, W.-H., Tseng, H.-C. & Chou, F.-P. Synergistic Tumor-Killing Effect of Radiation and Berberine Combined Treatment in Lung Cancer: The Contribution of Autophagic Cell Death. *Int. J. Radiat. Oncol.* **70,** 529–542 (2008).
521. Shin, J.-Y. *et al.* Aerosol delivery of beclin1 enhanced the anti-tumor effect of radiation in the lungs of K-rasLA1 mice. *J. Radiat. Res.* **53,** 506–15 (2012).
522. Yin, Y.-C. *et al.* Clozapine induces autophagic cell death in non-small cell lung cancer cells. *Cell. Physiol. Biochem.* **35,** 945–56 (2015).
523. Li, C. *et al.* Impact of autophagy inhibition at different stages on cytotoxic effect of autophagy inducer in glioblastoma cells. *Cell. Physiol. Biochem.* **35,** 1303–16 (2015).
524. Takeuchi, H. *et al.* Synergistic Augmentation of Rapamycin-Induced Autophagy in Malignant Glioma Cells by Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein Kinase B Inhibitors. *Cancer Res.* **65,** 3336–3346 (2005).
525. Lorente, M. *et al.* Stimulation of ALK by the growth factor midkine renders glioma cells resistant to autophagy-mediated cell death. *Autophagy* **7,** 1071–1073 (2011).
526. Laane, E. *et al.* Cell death induced by dexamethasone in lymphoid leukemia is mediated through initiation of autophagy. *Cell Death Differ.* **16,** 1018–29 (2009).
527. Grandér, D., Kharaziha, P., Laane, E., Pokrovskaja, K. & Panaretakis, T. Autophagy as the main means of cytotoxicity by glucocorticoids in hematological malignancies. *Autophagy* **5,** 1198–200 (2009).
528. Puissant, A. *et al.* Resveratrol promotes autophagic cell death in chronic myelogenous leukemia cells via JNK-mediated p62/SQSTM1 expression and AMPK activation. *Cancer Res.* **70,** 1042–52 (2010).
529. Sharma, K. *et al.* A novel cytostatic form of autophagy in sensitization of non-small cell lung cancer cells to radiation by vitamin D and the vitamin D analog, EB 1089. *Autophagy* **10,** 2346–61 (2014).
530. Dou, Q. *et al.* Ivermectin induces cytostatic autophagy by blocking PAK1/Akt axis in breast cancer. *Cancer Res.* canres.2887.2015 (2016). doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-2887
531. Bristol, M. L. *et al.* Autophagy Inhibition for Chemosensitization and Radiosensitization in Cancer: Do the Preclinical Data Support This Therapeutic Strategy? *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **344,** 544–552 (2013).
532. Chakradeo, S. *et al.* Yet Another Function of p53--The Switch That Determines Whether Radiation-Induced Autophagy Will Be Cytoprotective or Nonprotective: Implications for Autophagy Inhibition as a Therapeutic Strategy. *Mol. Pharmacol.* **87,** 803–814 (2015).
533. Wilson, E. N. *et al.* A switch between cytoprotective and cytotoxic autophagy in the radiosensitization of breast tumor cells by chloroquine and vitamin D. *Horm. Cancer* **2,** 272–85 (2011).
534. Youle, R. J. & Strasser, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9,** 47–59 (2008).
535. Li, D.-D. *et al.* The inhibition of autophagy sensitises colon cancer cells with wild-type p53 but not mutant p53 to topotecan treatment. *PLoS One* **7,** e45058 (2012).
536. Hollomon, M. G. *et al.* Knockdown of autophagy-related protein 5, ATG5, decreases oxidative stress and has an opposing effect on camptothecin-induced cytotoxicity in osteosarcoma cells. *BMC Cancer* **13,** 500 (2013).
537. Dupéré-Richer, D. *et al.* Vorinostat-induced autophagy switches from a death-promoting to a cytoprotective signal to drive acquired resistance. *Cell Death Dis.* **4,** e486 (2013).
538. Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E. & Croce, C. M. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* **228,** 1440–3 (1985).
539. Lomonosova, E. & Chinnadurai, G. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene* **27 Suppl 1,** S2–19 (2008).
540. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* **35,** 495–516 (2007).
541. Fulda, S. & Debatin, K.-M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer

chemotherapy. *Oncogene* **25,** 4798–4811 (2006).
542. Rautureau, G. J. P., Day, C. L. & Hinds, M. G. Intrinsically disordered proteins in bcl-2 regulated apoptosis. *Int. J. Mol. Sci.* **11,** 1808–24 (2010).
543. Liang, X. H. *et al.* Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *J. Virol.* **72,** 8586–96 (1998).
544. Oberstein, A., Jeffrey, P. D. & Shi, Y. Crystal structure of the Bcl-XL-Beclin 1 peptide complex: Beclin 1 is a novel BH3-only protein. *J. Biol. Chem.* **282,** 13123–32 (2007).
545. Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A. & Kroemer, G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8,** 741–52 (2007).
546. Fitzwalter, B. E. & Thorburn, A. Recent insights into cell death and autophagy. *FEBS J.* **282,** 4279–4288 (2015).
547. Mariño, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E. H. & Kroemer, G. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15,** 81–94 (2014).
548. Xu, H.-D. *et al.* The pro-survival role of autophagy depends on Bcl-2 under nutrition stress conditions. *PLoS One* **8,** e63232 (2013).
549. Lamy, L. *et al.* Control of autophagic cell death by caspase-10 in multiple myeloma. *Cancer Cell* **23,** 435–49 (2013).
550. Pileczki, V., Cojocneanu-Petric, R., Maralani, M., Neagoe, I. B. & Sandulescu, R. MicroRNAs as regulators of apoptosis mechanisms in cancer. *Clujul Med.* **89,** 50–5 (2016).
551. Xu, J., Wang, Y., Tan, X. & Jing, H. MicroRNAs in autophagy and their emerging roles in crosstalk with apoptosis. *Autophagy* **8,** 873–82 (2012).
552. Pasquier, B. Autophagy inhibitors. *Cell. Mol. Life Sci.* **73,** 985–1001 (2016).
553. Pascolo, S. Time to use a dose of Chloroquine as an adjuvant to anti-cancer chemotherapies. *Eur. J. Pharmacol.* **771,** 139–44 (2016).
554. Kim, E. L. *et al.* Chloroquine activates the p53 pathway and induces apoptosis in human glioma cells. *Neuro. Oncol.* **12,** 389–400 (2010).
555. Park, E. J. *et al.* Chloroquine enhances TRAIL-mediated apoptosis through up-regulation of DR5 by stabilization of mRNA and protein in cancer cells. *Sci. Rep.* **6,** 611–620 (2016).
556. Maes, H. *et al.* Tumor vessel normalization by chloroquine independent of autophagy. *Cancer Cell* **26,** 190–206 (2014).
557. Kimura, T. *et al.* Chloroquine in cancer therapy: a double-edged sword of autophagy. *Cancer Res.* **73,** 3–7 (2013).
558. Nishimura, M., Hidaka, N., Akaza, T., Tadokoro, K. & Juji, T. Immunosuppressive effects of chloroquine: potential effectiveness for treatment of post-transfusion graft-versus-host disease. *Transfus. Med.* **8,** 209–14 (1998).
559. Amaravadi, R. K. *et al.* Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *J. Clin. Invest.* **117,** 326–336 (2007).
560. Pellegrini, P. *et al.* Acidic extracellular pH neutralizes the autophagy-inhibiting activity of chloroquine: implications for cancer therapies. *Autophagy* **10,** 562–71 (2014).
561. Levine, B. *et al.* Development of autophagy inducers in clinical medicine. *J. Clin. Invest.* **125,** 14–24 (2015).
562. McAfee, Q. *et al.* Autophagy inhibitor Lys05 has single-agent antitumor activity and reproduces the phenotype of a genetic autophagy deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109,** 8253–8258 (2012).
563. Miller, S. *et al.* Shaping development of autophagy inhibitors with the structure of the lipid kinase Vps34. *Science* **327,** 1638–42 (2010).
564. Fruman, D. A. & Rommel, C. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* **13,** 140–56 (2014).
565. Liu, J. *et al.* Beclin1 controls the levels of p53 by regulating the deubiquitination activity of USP10 and USP13. *Cell* **147,** 223–34 (2011).
566. Shao, S. *et al.* Spautin-1, a novel autophagy inhibitor, enhances imatinib-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia. *Int. J. Oncol.* **44,** 1661–1668 (2014).

567. Egan, D. F. *et al.* Small Molecule Inhibition of the Autophagy Kinase ULK1 and Identification of ULK1 Substrates. *Mol. Cell* (2015). doi:10.1016/j.molcel.2015.05.031
568. Petherick, K. J. *et al.* Pharmacological Inhibition of ULK1 Blocks mTOR-Dependent Autophagy. *J. Biol. Chem.* **290,** 11376–83 (2015).
569. Kung, C.-P., Budina, A., Balaburski, G., Bergenstock, M. K. & Murphy, M. Autophagy in tumor suppression and cancer therapy. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **21,** 71–100 (2011).
570. Jundt, F. *et al.* A rapamycin derivative (everolimus) controls proliferation through down-regulation of truncated CCAAT enhancer binding protein {beta} and NF-{kappa}B activity in Hodgkin and anaplastic large cell lymphomas. *Blood* **106,** 1801–7 (2005).
571. Pichler, M. & Calin, G. A. MicroRNAs in cancer: from developmental genes in worms to their clinical application in patients. *Br. J. Cancer* **113,** 569–573 (2015).
572. Montani, F. *et al.* miR-Test: a blood test for lung cancer early detection. *J. Natl. Cancer Inst.* **107,** djv063 (2015).
573. Ling, H. *et al.* The clinical and biological significance of MIR-224 expression in colorectal cancer metastasis. *Gut* **65,** 977–89 (2016).
574. Pichler, M. *et al.* MiR-200a regulates epithelial to mesenchymal transition-related gene expression and determines prognosis in colorectal cancer patients. *Br. J. Cancer* **110,** 1614–21 (2014).
575. Iqbal, J. *et al.* Global microRNA expression profiling uncovers molecular markers for classification and prognosis in aggressive B-cell lymphoma. *Blood* **125,** 1137–45 (2015).
576. Hydbring, P. & Badalian-Very, G. Clinical applications of microRNAs. *F1000Research* **2,** 136 (2013).
577. Mishima, Y. *et al.* Autophagy and autophagic cell death are next targets for elimination of the resistance to tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Sci.* **99,** 2200–8 (2008).
578. Chou, T.-C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res.* **70,** 440–6 (2010).
579. Li, X., Cassidy, J. J., Reinke, C. A., Fischboeck, S. & Carthew, R. W. A microRNA imparts robustness against environmental fluctuation during development. *Cell* **137,** 273–82 (2009).
580. Prochnik, S. E., Rokhsar, D. S. & Aboobaker, A. A. Evidence for a microRNA expansion in the bilaterian ancestor. *Dev. Genes Evol.* **217,** 73–7 (2007).
581. Horsham, J. *et al.* Clinical Potential of microRNA-7 in Cancer. *J. Clin. Med.* **4,** 1668–1687 (2015).
582. Landgraf, P. *et al.* A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* **129,** 1401–14 (2007).
583. Farh, K. K.-H. *et al.* The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science* **310,** 1817–21 (2005).
584. Correa-Medina, M. *et al.* MicroRNA miR-7 is preferentially expressed in endocrine cells of the developing and adult human pancreas. *Gene Expr. Patterns* **9,** 193–9 (2009).
585. Chang, T.-C. *et al.* Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat. Genet.* **40,** 43–50 (2008).
586. Lebedeva, S. *et al.* Transcriptome-wide analysis of regulatory interactions of the RNA-binding protein HuR. *Mol. Cell* **43,** 340–52 (2011).
587. Li, Y.-J. *et al.* TLR9 signaling repressed tumor suppressor miR-7 expression through up-regulation of HuR in human lung cancer cells. *Cancer Cell Int.* **13,** 90 (2013).
588. Weilemann, A. *et al.* Essential role of IRF4 and MYC signaling for survival of anaplastic large cell lymphoma. *Blood* **125,** 124–32 (2015).
589. Bergalet, J. *et al.* HuR-mediated control of C/EBPbeta mRNA stability and translation in ALK-positive anaplastic large cell lymphomas. *Mol. Cancer Res.* **9,** 485–96 (2011).
590. Zhao, J. *et al.* MicroRNA-7: a promising new target in cancer therapy. *Cancer Cell Int.* **15,** 103 (2015).
591. Nakagawa, Y. *et al.* Relationship between expression of onco-related miRNAs and the endoscopic appearance of colorectal tumors. *Int. J. Mol. Sci.* **16,** 1526–43 (2015).

592. Meza-Sosa, K. F. *et al.* MiR-7 promotes epithelial cell transformation by targeting the tumor suppressor KLF4. *PLoS One* **9,** e103987 (2014).
593. Gallo, A. *et al.* The Majority of MicroRNAs Detectable in Serum and Saliva Is Concentrated in Exosomes. *PLoS One* **7,** e30679 (2012).
594. Lv, L.-L. *et al.* Isolation and Quantification of MicroRNAs from Urinary Exosomes/Microvesicles for Biomarker Discovery. *Int. J. Biol. Sci.* **9,** 1021–1031 (2013).
595. Wang, S. *et al.* A plasma microRNA panel for early detection of colorectal cancer. *Int. J. cancer* **136,** 152–61 (2015).
596. Babae, N. *et al.* Systemic miRNA-7 delivery inhibits tumor angiogenesis and growth in murine xenograft glioblastoma. *Oncotarget* **5,** 6687–700 (2014).
597. Wang, W. *et al.* Regulation of epidermal growth factor receptor signaling by plasmid-based microRNA-7 inhibits human malignant gliomas growth and metastasis in vivo. *Neoplasma* **60,** 274–83 (2013).
598. Tu, C.-Y. *et al.* Trichostatin A Suppresses EGFR Expression through Induction of MicroRNA-7 in an HDAC-Independent Manner in Lapatinib-Treated Cells. *Biomed Res. Int.* **2014,** 1–11 (2014).
599. Kalinowski, F. C. *et al.* Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling and Erlotinib Sensitivity in Head and Neck Cancer Cells by miR-7. *PLoS One* **7,** e47067 (2012).
600. Liu, R. *et al.* MicroRNA-7 sensitizes non-small cell lung cancer cells to paclitaxel. *Oncol. Lett.* **8,** 2193–2200 (2014).
601. Zhao, J.-G., Men, W.-F. & Tang, J. MicroRNA-7 enhances cytotoxicity induced by gefitinib in non-small cell lung cancer via inhibiting the EGFR and IGF1R signalling pathways. *Contemp. Oncol. (Poznań, Poland)* **19,** 201–6 (2015).
602. You, L. *et al.* Crizotinib induces autophagy through inhibition of the STAT3 pathway in multiple lung cancer cell lines. *Oncotarget* **5,** (2015).
603. Villalva, C., Bougrine, F., Delsol, G. & Brousset, P. Bcl-2 expression in anaplastic large cell lymphoma. *Am. J. Pathol.* **158,** 1889–90 (2001).
604. Ji, C. *et al.* Induction of autophagy contributes to crizotinib resistance in ALK-positive lung cancer. **15,** 570–577 (2014).
605. Aveic, S. *et al.* Combating autophagy is a strategy to increase cytotoxic effects of novel ALK inhibitor entrectinib in neuroblastoma cells. *Oncotarget* **7,** 5646–63 (2016).
606. Wang, Y. *et al.* Novel ALK inhibitor AZD3463 inhibits neuroblastoma growth by overcoming crizotinib resistance and inducing apoptosis. *Sci. Rep.* **6,** 19423 (2016).
607. Dirks-Naylor, A. J. The role of autophagy in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Life Sci.* **93,** 913–916 (2013).
608. Manov, I., Pollak, Y., Broneshter, R. & Iancu, T. C. Inhibition of doxorubicin-induced autophagy in hepatocellular carcinoma Hep3B cells by sorafenib--the role of extracellular signal-regulated kinase counteraction. *FEBS J.* **278,** 3494–507 (2011).
609. Oehadian, A. *et al.* Differential expression of autophagy in Hodgkin lymphoma cells treated with various anti-cancer drugs. *Acta Med. Indones.* **39,** 153–6
610. Mackeh, R., Perdiz, D., Lorin, S., Codogno, P. & Poüs, C. Autophagy and microtubules - new story, old players. *J. Cell Sci.* **126,** 1071–80 (2013).
611. Kondo, Y., Kanzawa, T., Sawaya, R. & Kondo, S. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat Rev Cancer* **5,** 726–734 (2005).
612. Köchl, R., Hu, X. W., Chan, E. Y. W. & Tooze, S. A. Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes. *Traffic* **7,** 129–45 (2006).
613. Fass, E., Shvets, E., Degani, I., Hirschberg, K. & Elazar, Z. Microtubules Support Production of Starvation-induced Autophagosomes but Not Their Targeting and Fusion with Lysosomes. *J. Biol. Chem.* **281,** 36303–36316 (2006).
614. Altman, B. J. & Rathmell, J. C. Metabolic Stress in Autophagy and Cell Death Pathways. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4,** a008763–a008763 (2012).
615. Sharma, S. V. & Settleman, J. Oncogene addiction: setting the stage for molecularly targeted cancer therapy. *Genes Dev.* **21,** 3214–3231 (2007).

616. Bellodi, C. *et al.* Targeting autophagy potentiates tyrosine kinase inhibitor–induced cell death in Philadelphia chromosome–positive cells, including primary CML stem cells. *J. Clin. Invest.* **119,** 1109–1123 (2009).
617. Liu, Y. *et al.* Inhibition of c-Met promoted apoptosis, autophagy and loss of the mitochondrial transmembrane potential in oridonin-induced A549 lung cancer cells. *J. Pharm. Pharmacol.* **65,** 1622–42 (2013).
618. Morgan, M. J. & Thorburn, A. Measuring Autophagy in the Context of Cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* **899,** 121–43 (2016).
619. Casas, C. *et al.* TRANSAUTOPHAGY: European network for multidisciplinary research and translation of autophagy knowledge. *Autophagy* **12,** 614–617 (2016).
620. Martinet, W., Schrijvers, D. M., Timmermans, J., Bult, H. & Meyer, G. R. Y. De. Immunohistochemical analysis of macroautophagy : Recommendations and limitations. 1–17 (2013). doi:10.4161/auto.22968
621. Barth, S., Glick, D. & Macleod, K. F. Autophagy: Assays and artifacts. *J. Pathol.* **221,** 117–124 (2010).
622. Dejean, E. *et al.* ALK+ALCLs induce cutaneous, HMGB-1-dependent IL-8/CXCL8 production by keratinocytes through NF-κB activation. *Blood* **119,** 4698–707 (2012).
623. Korolchuk, V. I., Mansilla, A., Menzies, F. M. & Rubinsztein, D. C. Autophagy Inhibition Compromises Degradation of Ubiquitin-Proteasome Pathway Substrates. *Mol. Cell* **33,** 517–527 (2009).
624. Jin, Z. *et al.* Cullin3-Based Polyubiquitination and p62-Dependent Aggregation of Caspase-8 Mediate Extrinsic Apoptosis Signaling. *Cell* **137,** 721–735 (2009).
625. Pursiheimo, J.-P., Rantanen, K., Heikkinen, P. T., Johansen, T. & Jaakkola, P. M. Hypoxia-activated autophagy accelerates degradation of SQSTM1/p62. *Oncogene* **28,** 334–44 (2009).
626. Kessler, S. M. *et al.* IMP2/p62 induces genomic instability and an aggressive hepatocellular carcinoma phenotype. *Cell Death Dis.* **6,** e1894 (2015).
627. Hou, W., Han, J., Lu, C., Goldstein, L. A. & Rabinowich, H. Autophagic degradation of active caspase-8: a crosstalk mechanism between autophagy and apoptosis. *Autophagy* **6,** 891–900 (2010).
628. Thorburn, J. *et al.* Autophagy Controls the Kinetics and Extent of Mitochondrial Apoptosis by Regulating PUMA Levels. (2014). doi:10.1016/j.celrep.2014.02.036
629. Martinez-Lopez, N., Athonvarangkul, D., Mishall, P., Sahu, S. & Singh, R. Autophagy proteins regulate ERK phosphorylation. *Nat. Commun.* **4,** 2799 (2013).
630. Mirandola, P. *et al.* Activated human NK and CD8+ T cells express both TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptors but are resistant to TRAIL-mediated cytotoxicity. *Blood* **104,** 2418–24 (2004).
631. Ravikumar, B., Berger, Z., Vacher, C., O'Kane, C. J. & Rubinsztein, D. C. Rapamycin pre-treatment protects against apoptosis. *Hum. Mol. Genet.* **15,** 1209–1216 (2006).
632. Shin, Y. J. *et al.* Rapamycin reduces reactive oxygen species in cultured human corneal endothelial cells. *Curr. Eye Res.* **36,** 1116–22 (2011).
633. Vega, F. *et al.* Activation of mammalian target of rapamycin signaling pathway contributes to tumor cell survival in anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large cell lymphoma. *Cancer Res.* **66,** 6589–97 (2006).
634. Gao, J. *et al.* Prognostic significance and therapeutic potential of the activation of anaplastic lymphoma kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin signaling pathway in anaplastic large cell lymphoma. *BMC Cancer* **13,** 471 (2013).
635. Colecchia, D. *et al.* MAPK15 mediates BCR-ABL1-induced autophagy and regulates oncogene-dependent cell proliferation and tumor formation. *Autophagy* **11,** 1790–1802 (2015).
636. Barrow-McGee, R. *et al.* Beta 1-integrin-c-Met cooperation reveals an inside-in survival signalling on autophagy-related endomembranes. *Nat. Commun.* **7,** 11942 (2016).
637. Young, M. M. *et al.* Autophagosomal membrane serves as platform for intracellular death-inducing signaling complex (iDISC)-mediated caspase-8 activation and apoptosis. *J. Biol. Chem.*

287, 12455–68 (2012).
638. Chen, Y. *et al.* UNC51-like kinase 1, autophagic regulator and cancer therapeutic target. *Cell Prolif.* **47,** 494–505 (2014).
639. Webster, R. J. *et al.* Regulation of epidermal growth factor receptor signaling in human cancer cells by microRNA-7. *J. Biol. Chem.* **284,** 5731–41 (2009).
640. Liu, Z. *et al.* miR-7 inhibits glioblastoma growth by simultaneously interfering with the PI3K/ATK and Raf/MEK/ERK pathways. *Int. J. Oncol.* **44,** 1571–1580 (2014).
641. Fang, Y., Xue, J.-L., Shen, Q., Chen, J. & Tian, L. MicroRNA-7 inhibits tumor growth and metastasis by targeting the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **55,** 1852–1862 (2012).
642. Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A. & Adams, J. M. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15,** 49–63 (2013).
643. Marquez, R. T. & Xu, L. Bcl-2:Beclin 1 complex: multiple, mechanisms regulating autophagy/apoptosis toggle switch. *Am. J. Cancer Res.* **2,** 214–21 (2012).
644. Xiong, S. MicroRNA-7 Inhibits the Growth of Human Non-Small Cell Lung Cancer A549 Cells through Targeting BCL-2. *Int. J. Biol. Sci.* 805–814 (2011). doi:10.7150/ijbs.7.805
645. Cory, S., Huang, D. C. S. & Adams, J. M. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* **22,** 8590–8607 (2003).
646. Xu, H.-D. *et al.* The Pro-Survival Role of Autophagy Depends on Bcl-2 Under Nutrition Stress Conditions. *PLoS One* **8,** e63232 (2013).
647. Qi, Z. *et al.* Bcl-2 Phosphorylation Triggers Autophagy Switch and Reduces Mitochondrial Damage in Limb Remote Ischemic Conditioned Rats After Ischemic Stroke. *Transl. Stroke Res.* **6,** 198–206 (2015).
648. Pattingre, S. *et al.* Bcl-2 Antiapoptotic Proteins Inhibit Beclin 1-Dependent Autophagy. *Cell* **122,** 927–939 (2005).
649. Marzec, M. *et al.* Oncogenic tyrosine kinase NPM/ALK induces activation of the rapamycin-sensitive mTOR signaling pathway. *Oncogene* **26,** 5606–14 (2007).
650. Pattingre, S., Bauvy, C. & Codogno, P. Amino acids interfere with the ERK1/2-dependent control of macroautophagy by controlling the activation of Raf-1 in human colon cancer HT-29 cells. *J. Biol. Chem.* **278,** 16667–74 (2003).
651. Zhang, Y., Wu, Y., Tashiro, S.-I., Onodera, S. & Ikejima, T. Involvement of PKC signal pathways in oridonin-induced autophagy in HeLa cells: a protective mechanism against apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **378,** 273–8 (2009).
652. Eum, K.-H. & Lee, M. Crosstalk between autophagy and apoptosis in the regulation of paclitaxel-induced cell death in v-Ha-ras-transformed fibroblasts. *Mol. Cell. Biochem.* **348,** 61–68 (2011).
653. Ceteci, F. *et al.* Conditional expression of oncogenic C-RAF in mouse pulmonary epithelial cells reveals differential tumorigenesis and induction of autophagy leading to tumor regression. *Neoplasia* **13,** 1005–18 (2011).
654. Matallanas, D. *et al.* Raf family kinases: old dogs have learned new tricks. *Genes Cancer* **2,** 232–60 (2011).
655. Wu, S.-Y. *et al.* Ras-related tumorigenesis is suppressed by BNIP3-mediated autophagy through inhibition of cell proliferation. *Neoplasia* **13,** 1171–82 (2011).
656. Xiong, S. *et al.* MicroRNA-7 inhibits the growth of human non-small cell lung cancer A549 cells through targeting BCL-2. *Int. J. Biol. Sci.* **7,** 805–14 (2011).
657. Duncavage, E., Goodgame, B., Sezhiyan, A., Govindan, R. & Pfeifer, J. Use of MicroRNA Expression Levels to Predict Outcomes in Resected Stage I Non-small Cell Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol.* **5,** 1755–1763 (2010).
658. Bäumer, S. *et al.* Antibody-mediated delivery of anti-KRAS-siRNA in vivo overcomes therapy resistance in colon cancer. *Clin. Cancer Res.* **21,** 1383–94 (2015).
659. Bäumer, N. *et al.* Antibody-coupled siRNA as an efficient method for in vivo mRNA

knockdown. *Nat. Protoc.* **11,** 22–36 (2016).

AUTEUR : Julie FRENTZEL
TITRE : Rôle et régulation de l'autophagie dans les Lymphomes Anaplasiques à Grandes Cellules ALK positifs
DIRECTEURS DE THESE : Dr. Sylvie GIURIATO & Dr. Fabienne MEGGETTO
LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : 17 octobre 2016, Toulouse

RESUME :

L'oncogène ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase) est une tyrosine kinase constitutivement active, impliquée dans divers cancers, tels que les lymphomes anaplasiques à grandes cellules (LAGC), ou certains carcinomes bronchiques. Ces tumeurs sont traitées par chimiothérapie, ce qui n'est pas un traitement optimal (30% de rechutes, abaissement de la qualité de vie). Dans ce contexte, de nombreux inhibiteurs spécifiques de la tyrosine kinase ALK tels que le Crizotinib ont été développés et ont prouvé leur efficacité à la fois dans des modèles *in vitro*, *in vivo* ainsi que chez les patients. Néanmoins, le succès de cette thérapie ciblée est limité par l'apparition de résistances. Il est donc essentiel de mettre au jour de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant de contrecarrer ces résistances. Récemment, l'autophagie, un processus catabolique intracellulaire de dégradation lysosomale, a été proposée comme nouvelle cible thérapeutique dans le traitement des cancers résistants aux inhibiteurs de tyrosine kinase. Le premier objectif de mon projet de thèse a été de caractériser ce processus autophagique dans les LAGC ALK+, en réponse à différents traitements. Nous avons montré que (1) l'autophagie était activée dans des lignées de LAGC en réponse à l'inhibition de ALK, (2) que cette autophagie jouait un rôle cytoprotecteur dans ce modèle et (3) que les traitements par chimiothérapies de ces cellules n'induisaient pas de réponse autophagique. Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à la régulation potentielle de l'autophagie par les microARNs. Nous avons montré que plusieurs microARNs, dont le miR-7, étaient sous-exprimés en réponse au traitement par le Crizotinib et que la réexpression ectopique de ce miR-7 permettait une potentialisation de l'effet du Crizotinib, par l'induction d'autophagie cytotoxique dans notre modèle. Nous avançons également l'hypothèse que le « switch » autophagique de la cytoprotection à la cytotoxicité, que nous observons pourrait s'expliquer par la régulation de l'expression de plusieurs protéines cibles de miR-7 telles que Bcl-2 ou c-Raf. Ainsi, l'ensemble de nos résultats nous permettent de mieux comprendre le rôle et la régulation de l'autophagie induite en réponse à l'inhibition de ALK dans les LAGC ALK+, et pourrait à terme contribuer à l'amélioration des thérapies actuelles de divers cancers dépendants de l'oncogène ALK.

MOTS-CLEFS : *Lymphomes Anaplasiques à Grandes Cellules ; ALK ; Autophagie ; microARNs ; thérapies ciblées ; résistances au traitement*

ABSTRACT:

The ALK oncogene (Anaplastic Lymphoma Kinase) is a constitutively activated tyrosine kinase implied in various cancers including Anaplastic Large Cell Lymphomas (ALCL), or some lung adenocarcinomas. The current operative treatment is standard chemotherapy, which is not optimal (30% of relapses, low quality of life). In this context, new specific ALK inhibitors such as Crizotinib have been developed, and have showed their efficiency *in vitro*, *in vivo* and in patients. However, the emergence of resistant mutations has been described. Thus, the identification of alternative therapies targeting new pathways appears as mandatory to counteract those resistances. In this context, autophagy, an intracellular catabolic lysosomal process, has been described as a new therapeutic target in the treatment of cancers resistant to tyrosine kinase inhibitors. The first aim of my project was to characterize the autophagic process in ALK+ ALCL, upon different treatments. We showed that (1) autophagy was activated in ALK+ ALCL cell lines in response to ALK inhibition (2) that this autophagy played a cytoprotective role in our model and (3) that treatment with chemotherapies did not trigger an autophagic response. In a second part of the project, we focused on the potential regulation of autophagy by microRNAs. We showed that several microRNAs including miR-7 were down-regulated upon Crizotinib treatment and that ectopic re-expression of this miR-7 potentiates the effects of Crizotinib by induction of cytotoxic autophagy in our model. We hypothesized that this switch in the role of autophagy from cytoprotection to cytotoxicity observed in our model, could be explained by the regulation of several protein targets of miR-7 such as Bcl-2 or c-Raf. Altogether, these results enable a better understanding of the role and regulation of autophagy induced upon ALK inhibition in ALCL, and could in the longer term, contribute to improvement of current therapies of cancers involving the ALK oncogene.

KEYWORDS: *Anaplastic Large Cell Lymphoma ; ALK ; Autophagy ; microRNAs ; targeted therapies ; resistance to treatment*

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Cancérologie
LABORATOIRE : Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse (CRCT), INSERM U1037, 2 avenue Hubert Curien, Oncopôle entrée C, CS53717, 31037 Toulouse CEDEX 1