



# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*  
Discipline ou spécialité : *Cancérologie*

---

Présentée et soutenue par *BERGALET Julie*  
Le 13 Décembre 2011

**Titre :**

*Un nouveau rôle de la tyrosine kinase oncogénique NPM-ALK dans le contrôle de l'expression génique au niveau post-transcriptionnel*

---

**JURY**

*Pr. Laurence LAMANT, Président*  
*Pr. Véronique KRUY, Rapporteur*  
*Pr. Karen LEROY, Rapporteur*  
*Dr. Jean ROSENBAUM, Examineur*  
*Dr. Estelle ESPINOS*

---

**Ecole doctorale :** *Biologie, Santé, Biotechnologies (BSB)*  
**Unité de recherche :** *INSERM UMR1037 - CRCT*  
**Directeur(s) de Thèse :** *Dr. Estelle ESPINOS*  
**Rapporteurs :** *Pr. Véronique KRUY et Pr. Karen LEROY*





## REMERCIEMENTS

*Il est de tradition d'adresser quelques remerciements aux personnes qui nous ont entourés, tant celles qui ont contribué au travail que celles qui ont fait que chaque jour de cette étape tumultueuse soit agréable. Je vais donc tenter de réaliser ce difficile exercice en essayant de n'oublier personne.*

*Je tiens dans un premier temps à remercier le Pr. Georges Delsol de m'avoir accueillie, il y a 5 ans au sein de son équipe et de m'avoir permis d'effectuer cette thèse. Je vous remercie tout particulièrement pour l'intérêt et le temps que vous m'avez consacré notamment au moment du concours pour les bourses de thèse. Merci également pour votre enthousiasme ainsi que pour votre sympathie.*

*Je remercie également, le Pr. Pierre Brousset, d'avoir porté un certain intérêt à ce travail.*

*Je remercie les membres du jury: Véronique Kruys, Karen Leroy et Jean Rosenbaum d'avoir accepté de juger mon travail et avoir consacré du temps à la lecture de ce manuscrit.*

*Je remercie Laurence Lamant d'avoir apporté ses compétences d'anatomopathologiste à ce travail mais aussi d'avoir partagé ses connaissances sur les lymphomes anaplasiques. Merci également d'avoir accepté de présider mon jury de thèse.*

*Je remercie bien évidemment Estelle Espinos. Je te remercie de m'avoir encadrée avec brio durant toutes ces années. Malgré tes occupations à la fac, tu auras toujours été très impliquée dans ce projet et toujours présente pour m'épauler. Merci de m'avoir fait confiance tant au labo qu'à l'extérieur en me confiant, notamment à plusieurs reprises, la garde de tes enfants. En plus de nos discussions scientifiques, j'ai apprécié nos échanges à propos du dernier film vu, dernier livre lu, ou encore de la dernière tenue dégottée! Notre seul point de discorde aura été finalement ...le cyclisme ! Après ces 5 années passées à tes côtés, j'ai pu me rendre compte que nous avons beaucoup de points communs tant dans la façon de travailler que dans notre façon de penser et d'évoluer dans la vie, ce qui me fait dire aujourd'hui que j'ai eu beaucoup de chance à faire ce chemin avec toi! Il est nécessaire pour moi, aujourd'hui, de pousser d'autres portes, ce qui ne nous empêchera pas de garder un étroit contact. Sache que la porte de ma cabane au Canada est ouverte !*

*Je remercie Céline et ses doigts de fée! Impliquée à 200% sur le projet, très rigoureuse et super efficace pour les manips (notamment le Western Blot que tu maîtrises mieux que personne !!), tu as réellement bien fait de quitter ta vie de commerciale pour venir nous rejoindre au laboratoire! Bien entendu, tu te doutes que tu as été bien plus qu'une compagne de paillasse. Je me rappellerais toujours de nos petits bavardages autour des bons*

*plans de "groupon" (enfin quand les instituts ne font pas faillite), de tes histoires avec ta grande copine d'enfance, et j'en passe.... Merci pour ta bonne humeur et ton réconfort qui m'a été précieux à la fin de ce périple. J'espère que tu dégoutteras la place en or qui te permettra de t'épanouir pour une durée indéterminée dans la recherche, tu la mérites amplement. J'aimerais tellement reformer le trio de choc à mon retour... seul le futur nous le dira ! En attendant, j'espère avoir des nouvelles et une petite visite de vous 3 à Montréal !!*

*Je vais maintenant remercier l'incontournable Jeanine alias Jaja. Vous êtes sans aucun doute la personne sur laquelle tout le monde peut compter! Vous êtes toujours disponible, à l'écoute et toujours là pour trouver une solution à un quelconque problème. Notre cohabitation dans le labo (et oui, nous passons le plus clair de notre temps au labo finalement !), nous aura beaucoup rapproché et m'ont amenée à plusieurs reprises à me confier à vous : je pense que vous connaissez mieux que tout le monde les petites aventures de la famille pourtau-bergalet-chaya (et oui il ne faut pas l'oublier). Outre nos petits bavardages, vous m'avez tout de même appris à considérer les souris comme des bêtes de labo et non des petits être vivants à protéger, et ça ce n'était pas mince affaire! Malgré tout le temps que nous avons passé ensemble, il me reste cependant un regret....c'est de ne pas avoir trouvé les bottes en plastiques de vos rêves... Si j'en trouve à Montréal promis je vous les envoie, sinon vous viendrez les chercher ;-)!*

*Cécile, je tiens également à te remercier pour toutes nos discussions autour de notre sujet favori : la régulation post-transcriptionnelle dans les LAGC. J'aurais vraiment apprécié de prolonger notre petite collaboration pour découvrir l'implication coordonnée de nos deux chouchous (miRNAs et AU-BP) dans les LAGC, mais bon il est temps pour moi de voir autre chose !! Tu as toujours été de bon conseil et j'espère que ce sera un jour reconnu! Sois heureuse avec ta petite famille dont j'espère avoir des nouvelles !!*

*L'ensemble de ces données présentées ici sont le fruit d'une collaboration étroite avec Dominique Morello et Mohamad Fawal que je remercie profondément pour nos longues discussions sur certains aspects scientifiques mais aussi techniques. Merci pour tous les conseils que vous nous avez apportés.*

*Ce travail a été également soutenu par la plateformes de protéomique IPBS ( « Bernard MONSORRAT » et « Carole Pichereaux »), la plateforme bioinformatique IFR- 150 « Jason S. JACOVONI » ainsi que le service d'anatomopathologie de Toulouse-Purpan.*

*Merci également à Marlène Faubladièr ainsi qu'à Philippe Valenti de m'avoir transmis leurs compétences techniques.*

*Comment ne pas remercier les statutaires et les étudiants avec lesquels j'ai partagé ces 5 années de thèse. Je vais en vrac remercier le « couple de choc » Charlotte et Ju pour leur joie de vivre et leur soutien inconditionnel, Cathy pour son sa disponibilité et sa grande sympathie, Emilie D. pour son ouverture d'esprit, Marie-Pierre pour sa gentillesse et son brin de folie, Marina pour ses conseils, Nais et Jérôme pour leur sympathie, Wilfried pour ses histoires à coucher dehors ainsi que Laure que je n'aurais fait que croiser. Je n'oublie pas bien entendu mes compagnons de Master2: Emilie L., Emilie-Fleur, Etienne et Fred "Junior", nous avons été dans le même bateau du début à la fin et notre soutien mutuel aura été pour moi réconfortant! Enfin, je remercie Fabienne, Sylvie, Michèle, Janie, Ashraf, Eric, ainsi que Gilles et Cyril pour les divers conseils qu'ils m'ont adressés durant ma thèse.*

*Ce travail a été soutenu par l'INSERM et l'université Paul Sabatier ainsi que la "ligue régionale contre le cancer" et "l'association pour la recherche contre le cancer (ARC)" dont je remercie les donateurs. Sans eux, ces travaux n'auraient certainement pas pu aboutir.*

*Je ne pouvais terminer ces remerciements sans citer mes amis et ma famille pour leur irremplaçable et inconditionnel soutien. Ils ont été présents pour écarter les doutes, soigner les blessures et partager les joies. Un merci tout particulier à Laurent pour sa présence à mes côté et le réconfort qu'il m'a apporté chaque jour.*



# SOMMAIRE





SOMMAIRE .....	7
INTRODUCTION.....	13
I. Les Lymphomes Anaplasiques à Grandes Cellules (LAGC).....	15
A. Aspects cliniques.....	15
B. Aspects Morphologiques.....	17
C. Marqueurs phénotypiques .....	19
D. Aspects moléculaires.....	21
1. La translocation t(2;5) (p23;q35).....	21
2. Les variants moléculaires des LAGC .....	25
E. Oncogénicité liée aux protéines de fusion X-ALK .....	27
1. Voies de signalisation activées par les oncogènes X-ALK .....	27
2. Profils d'expression "dépendants" de ALK.....	35
3. Pouvoir transformant des protéines de fusion X-ALK .....	41
4. Expression des protéines de fusion X-ALK dans d'autres cancers .....	43
F. ALK, comme cible thérapeutique .....	47
1. Les inhibiteurs pharmacologiques de ALK .....	47
2. Vaccination des tumeurs présentant l'antigène ALK.....	51
II. Le facteur de transcription C/EBP $\beta$ (CCAAT/Enhancer Binding Protein $\beta$ ) .....	53
A. Structure et propriétés de C/EBP $\beta$ .....	53
1. Structure de C/EBP $\beta$ .....	53
2. Propriétés de C/EBP $\beta$ .....	55
B. Régulation de l'expression du gène C/EBP $\beta$ .....	57
1. Régulation transcriptionnelle .....	57
1. Régulation post-transcriptionnelle .....	59
2. Régulation traductionnelle .....	63
3. Régulation post-traductionnelle .....	67
C. C/EBP $\beta$ , un acteur de l'oncogénèse.....	73
1. C/EBP $\beta$ dans les cancers solides .....	73
2. C/EBP $\beta$ dans les LAGC.....	77
III. Régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique .....	81
A. Généralités.....	81
1. L'initiation de la traduction .....	83
2. Mécanisme général de dégradation des ARNm.....	85
3. Localisation subcellulaire .....	87
B. Devenir de l'ARNm : à traduire ou à dégrader ?.....	91
1. "Contrôle-qualité" des ARNm .....	91
2. Contrôle de la quantité et du niveau de traduction des ARNm.....	95
C. La régulation post-transcriptionnelle via les miRNAs.....	103
1. Biogenèse des miRNAs .....	105
2. Mécanismes d'action des miRNAs .....	105
D. La régulation post-transcriptionnelle via les AU-BPs.....	109
1. Element "Cis" ARE (AU-rich element).....	109
1. Les principales AU-Binding Proteins: Facteurs "Trans" .....	113
E. L'AU-Binding Protein HuR (Elavl1).....	125
1. Structure.....	125
2. Modifications post-traductionnelles et modulation des propriétés biologiques de HuR .....	127
3. Fonctions.....	129
4. Mécanisme d'action .....	139

---

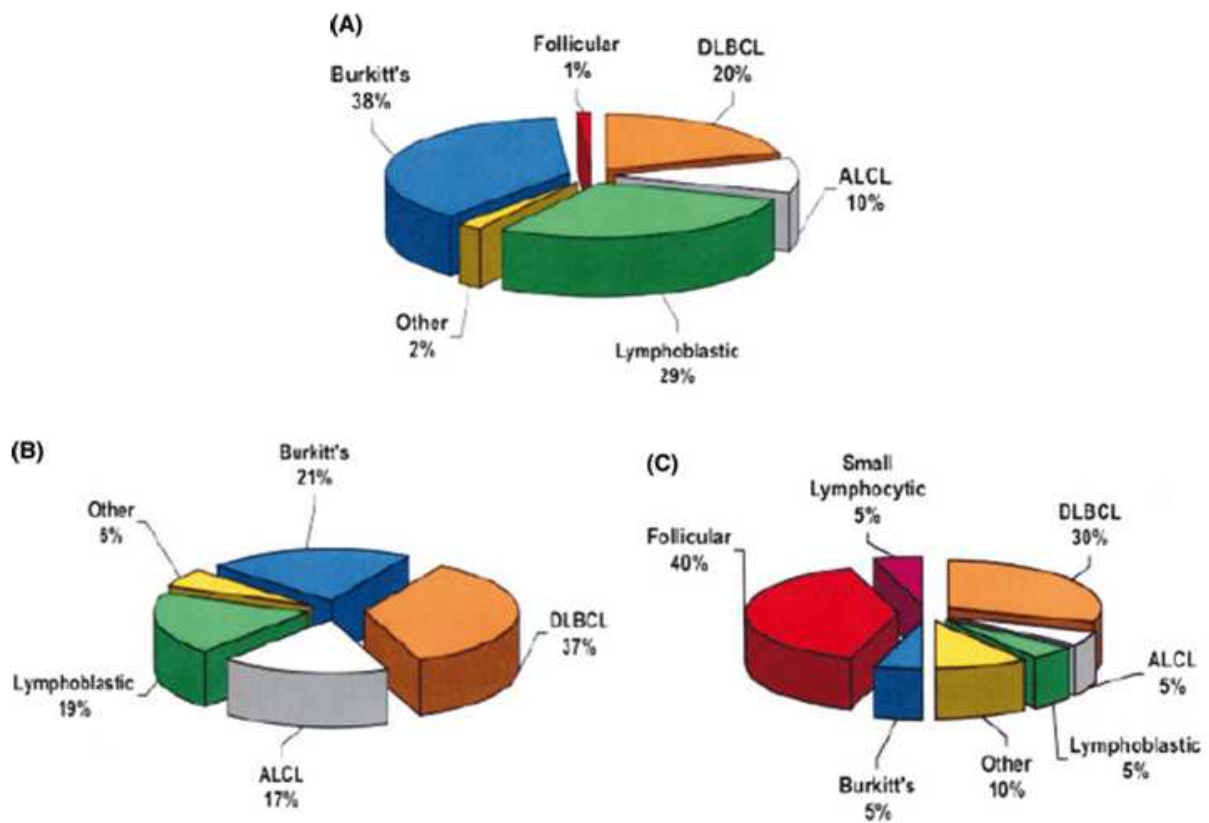
5. HuR dans les cancers .....	141
F. La régulation post-transcriptionnelle coordonnée par les miRNAs et les AU-BPs ..	143
OBJECTIFS .....	147
RESULTATS EXPERIMENTAUX .....	151
Article n°1 .....	153
Suite de l'article n°1 .....	157
Article n°2.....	181
DISCUSSION GENERALE .....	185
ANNEXES .....	205
Abréviations .....	211
BIBLIOGRAPHIE .....	215

**Figures:**

Figure 1: Incidence des sous-types de Lymphomes non-Hodgkiniens en France .....	14
Figure 2: Cellules caractéristiques des LAGC. ....	16
Figure 3: Structure des protéines NPM et ALK et de la protéine de fusion NPM-ALK. ....	22
Figure 4: Localisation subcellulaire de la protéine de fusion NPM-ALK. ....	24
Figure 5: Liste des variants X-ALK dans les LAGC. ....	24
Figure 6: Activation de la voie JAK/STAT par NPM-ALK. ....	28
Figure 7: Activation de la voie PI3K/AKT par NPM-ALK. ....	28
Figure 8: Activation de la voie des MAP kinases et de la PLC $\gamma$ par NPM-ALK. ....	30
Figure 9: Signalisation du CD30. ....	32
Figure 10: Structure du facteur de transcription C/EBP $\beta$ . ....	54
Figure 11: Mode de liaison des complexes C/EBP sur leur séquence consensus. ....	54
Figure 12: Régulation transcriptionnelle de C/EBP $\beta$ . ....	58
Figure 13: Régulation post-transcriptionnelle de C/EBP $\beta$ . ....	60
Figure 14: Isoformes protéiques de C/EBP $\beta$ . ....	62
Figure 15: Régulation traductionnelle de C/EBP $\beta$ : production de 3 isoformes protéiques ....	64
Figure 16: Impact du ratio LAP/LIP sur le devenir cellulaire. ....	64
Figure 17: Modélisation de la structure de C/EBP $\beta$ en fonction de son état de phosphorylation. ....	68
Figure 18: Modifications post-traductionnelles de C/EBP $\beta$ . ....	70
Figure 19: Expression de C/EBP $\beta$ dans les tumeurs humaines de LAGC ALK <sup>+</sup> et ALK <sup>-</sup> . ....	76
Figure 20: Régulation de l'expression du gène C/EBP $\beta$ dans les LAGC ALK <sup>+</sup> . ....	78
Figure 21: Schéma simplifié de la régulation post-transcriptionnelle d'un gène. ....	80
Figure 22: Les différentes phases de l'initiation de la traduction chez les eucaryotes. ....	82
Figure 23: Mécanisme général de dégradation des ARNm. ....	84
Figure 24: Le cycle des ARNm. ....	88
Figure 25: Mécanismes de contrôle-qualité des ARNm. ....	92
Figure 26: Eléments <i>cis</i> et facteurs régulateurs <i>trans</i> de la régulation post-transcriptionnelle. ....	94
Figure 27: Biogenèse des miRNAs. ....	104
Figure 28: Classification par fonctions moléculaires des gènes régulés via les motifs ARE. ....	108
Figure 29: Mécanisme de dégradation des ARNm à motifs ARE (ARE Mediated Decay : AMD). ....	112
Figure 30: Structure des protéines TTP et BRF1. ....	116
Figure 31: Structure de KSRP. ....	118
Figure 32: Structure des protéines TIA et TIAR. ....	118
Figure 33: Régulation de la traduction par les protéines TIA/TIAR. ....	120
Figure 34: Structure des 4 isoformes d'AUF1. ....	122
Figure 35: Mécanisme d'action de AUF1 dans la dégradation/stabilisation des ARNm-ARE. ....	122
Figure 36: Structure de l'AU-BP HuR. ....	124
Figure 37: Schéma représentant les mécanismes de régulation de l'expression géniques en réponse à un stress. ....	126
Figure 38: Modifications post-traductionnelles de HuR. ....	126
Figure 39: Fonctions nucléaires et cytoplasmiques de HuR. ....	128
Figure 40: Représentation schématique de l'influence de HuR sur l'apoptose. ....	132
Figure 41: Influence de la localisation cytoplasmique de HuR et de la régulation des protéines du cycle cellulaire. ....	134

Figure 42: Représentation schématique de l'influence de HuR sur l'angiogenèse.....	136
Figure 43: Exemples de mécanismes de régulation de l'expression génique coordonnée par les miRNAs et les AU-BPs.....	144
Figure 44: Cycle des ARNm dans les LAGC ALK+ .....	190
Figure 45: Un nouveau mode de régulation de l'expression génique par la tyrosine kinase NPM-ALK : le contrôle du métabolisme des ARNm. ....	202

# INTRODUCTION



**Figure 1: Incidence des sous-types de Lymphomes non-Hodgkiniens en France**

(A) groupe de 0-14 ans, (B) groupe de 15-19 et (C) groupe de 20 ans et plus. L'incidence des LAGC est représentée en blanc (d'après Hochberg J *et al.*) (1).

## **I. Les Lymphomes Anaplasiques à Grandes Cellules (LAGC)**

Les Lymphomes Anaplasiques à Grandes Cellules représentent environ 5% des lymphomes non hodgkiniens (LNH). Individualisés en 1985, ils se distinguent des autres lymphomes par leur caractéristique morphologique pleiomorphe et leur réactivité intense à l'anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène CD30 (anciennement Ki-1) (2).

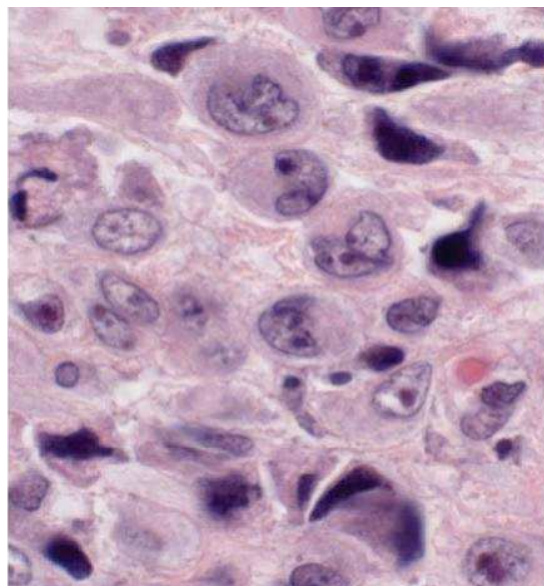
Les dernières classifications, Revised European-American Classification of Lymphoid neoplasm ("REAL classification, 1994") (3) et la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 2001) (4) renaient comme LAGC, des lymphomes de morphologie anaplasique, exprimant l'antigène CD30 et de phénotype T ou nul (non B non T). Depuis 2008, la classification de l'OMS classe ces lymphomes en 3 entités distinctes: 1- les LAGC cutanés ALK négatifs (5); 2- les LAGC systémiques qui présentent une translocation impliquant le gène *ALK* (Anaplastic Lymphoma Kinase) et qui expriment donc l'oncogène X-ALK (LAGC ALK<sup>+</sup>) (6); 3- les LAGC systémiques qui ne présentent pas de translocation impliquant le gène *ALK* (LAGC ALK<sup>-</sup>) (7).

### **A. Aspects cliniques**

D'après des études épidémiologiques, les LAGC systémiques font partie des quatre sous types majeurs de LNH (Lymphomes B Diffus à Grandes Cellules, Lymphomes de Burkitt, Lymphomes Lymphoblastiques B et T et LAGC) diagnostiqués de manière prédominante chez l'enfant et l'adolescent à hauteur de 13% contre seulement 2% chez l'adulte (8). Des études rétrospectives réalisées dans divers pays montrent une incidence des LAGC plus importante chez les adolescents (17%) que chez les jeunes enfants (10%) (Figure 1) (1). Les LAGC ALK<sup>+</sup> surviennent plutôt chez les adolescents avec une prédominance pour le sexe masculin (9) alors que les LAGC ALK<sup>-</sup>, de plus mauvais pronostic, surviennent plus fréquemment chez les patients plus âgés (10).

La forme systémique primaire des LAGC se traduit généralement par des polyadénopathies superficielles, fermes, indolores, non inflammatoires et associées à des symptômes généraux (forte fièvre persistante sans cause infectieuse, amaigrissement, fatigue inexplicquée, sueurs nocturnes). Dans plus de 70% des cas, les patients sont diagnostiqués à un stade avancé (III/IV) qui implique fréquemment les sites extra-ganglionnaires, les plus communs étant la peau (21%), les os (17%), les tissus mous (17%) et le foie (8%).





**Figure 2: Cellules caractéristiques des LAGC.**

Ces cellules présentent un noyau réniforme excentré (d'après Piccaluga PP, *et al.*) (11)

L'atteinte de la moelle osseuse existe dans certains cas (11-34%) alors que celle du système nerveux central reste rare (3-5%) (1).

Le traitement optimal pour les LAGC systémiques n'est pas bien défini. Les patients adultes reçoivent généralement le traitement CHOP (Cyclophosphamide, Doxorubicine, Vincristine et Prednisone) identique à celui des patients atteints de Lymphomes B Diffus à Grandes Cellules alors que les enfants sont traités selon le protocole ALCL99, avec alternance de cures A (methotrexate, ifosfamide, etoposide, Ara-C, dexaméthasone) et de cures B (methotrexate, cyclophosphamide, doxorubicin, dexaméthasone). Les taux de survie globale à 5 ans des LAGC ALK<sup>-</sup> et ALK<sup>+</sup> sont d'environ 40% contre 80 à 90% respectivement (12-13). Néanmoins une rechute des patients après chimiothérapie est observée dans 30% des cas (12).

## **B. Aspects Morphologiques**

La dernière classification de l'OMS (2008) définit les LAGC ALK<sup>+</sup> selon un type histologique unique constitué de cellules de morphologie caractéristique (dites "hallmark cells", Figure 2), présentes en quantité variable et plus ou moins mêlées à des cellules réactionnelles (6). Selon la présence et la nature de ces cellules réactionnelles, on dénombre 4 variants morphologiques dans la classification de l'OMS (2008). Le **type commun**, qui correspond au variant identifié en 1985 et est observé dans plus de 65% des cas, n'est constitué que des cellules caractéristiques qui présentent un noyau réniforme excentré avec un nucléole proéminent entouré d'un cytoplasme abondant. Le **variant lymphohistiocytaire** (environ 10% des cas) est marqué par la présence de cellules de taille variable tout comme le **variant à petites cellules** (5 à 10% des cas). La présence d'un grand nombre d'histiocytes permet de distinguer le premier sous type du deuxième. Ces deux variants qui sont assez fréquents sembleraient être, selon la classification de l'OMS de 2008, associés à un moins bon pronostic que les autres variants (6). Cet impact pronostique a été d'ailleurs clairement démontré récemment sur une série de 375 LAGC ALK<sup>+</sup> pédiatriques (Lamant *et al.*, J Clin Oncol. 2011, sous presse). On retrouve ensuite, plus rarement, le **variant Hodgkin-like** que l'on retrouve plutôt chez les sujets jeunes, mais qui est très difficile à différencier des Lymphomes Hodgkiniens (LH). En effet, il existe une sclérose nodulaire comme dans les LH avec des cellules ressemblant à des cellules de Reed-Sternberg et reste donc encore très controversé en tant qu'entité: ce diagnostic ne doit être posé que si les cellules tumorales sont ALK<sup>+</sup>. D'autres variants très rares sont également décrits (variants riche en cellules géantes, à cellules chevalières, à cellules sarcomatoïdes, riches en cellules épithélioïdes, ou encore riches en éosinophiles).



Chez certains patients, on peut observer plusieurs variants au sein d'un même ganglion ou dans des ganglions différents, appelé variant composite. Il faut enfin noter que les LAGC ALK<sup>-</sup> sont de morphologie « commune » et sont, en dehors de leur négativité pour ALK, impossible à différencier des LAGC ALK<sup>+</sup> sur leur pur aspect morphologique (11).

### **C. Marqueurs phénotypiques**

La classification de l'OMS liste de manière détaillée des marqueurs immunohistochimiques caractéristiques des LAGC (6-7). Ces lymphomes sont notamment identifiables par leur forte réactivité pour l'antigène d'activation lymphocytaire CD30. Cependant, ce marqueur peut aussi être exprimé par d'autres lymphomes à grandes cellules. D'autres marqueurs sont donc nécessaires pour identifier ces lymphomes. Ces lymphomes co-expriment pour la grande majorité l'antigène épithélial membranaire (EMA). Ils sont, de plus, de phénotype T ou nul (non B non T): ils présentent, en effet, de nombreux antigènes de surface T qui, dans certains cas, peuvent disparaître ("trou phénotypique"). C'est le cas du CD3, qui, bien que très classiquement exprimé par les lymphocytes T et donc couramment reconnu comme marqueur pan-T, n'est pas exprimé dans la plupart des LAGC (CD3<sup>-</sup> >75%). A contrario, les LAGC sont dans 75% des cas CD2<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>, CD7<sup>+</sup>, CD43<sup>+</sup> ou encore CD45RO<sup>+</sup>. Très peu de cas expriment le CD4 ou le CD8 même si le CD4 reste majoritaire. Les LAGC de type nul n'expriment pas de marqueurs antigéniques T ou B mais des réarrangements du TCR peuvent être détectés (6-7).

Les LAGC ont également un caractère cytotoxique via l'expression de molécules telles que le granzyme B, la granulysine, la perforine ou encore TIA-1 (T-cell restricted intracellular antigen-1). Ces marqueurs cytotoxiques peuvent porter parfois à confusion quant à l'origine des LAGC car ils sont également exprimés, tout comme le CD30, par les cellules Natural Killer (NK). L'absence du CD56 (molécule d'adhésion) à la surface des LAGC permet alors de les différencier d'une tumeur lymphoïde d'origine NK (6-7).

En 2000, Wellman *et al.* ont également caractérisé la clusterine en tant que nouveau marqueur des LAGC (14). En effet, ils ont montré par immunohistochimie que parmi près de 200 lymphomes de type B, T ou hodgkiniens, seuls les cas de LAGC montrent une réactivité à la clusterine caractérisée par un marquage exclusif du golgi. Cependant ce marquage ne permet pas de distinguer les LAGC ALK<sup>+</sup> des LAGC ALK<sup>-</sup> (15), ni les LAGC cutanés des différents types de maladies lymphoprolifératives CD30<sup>+</sup> de la peau (16).



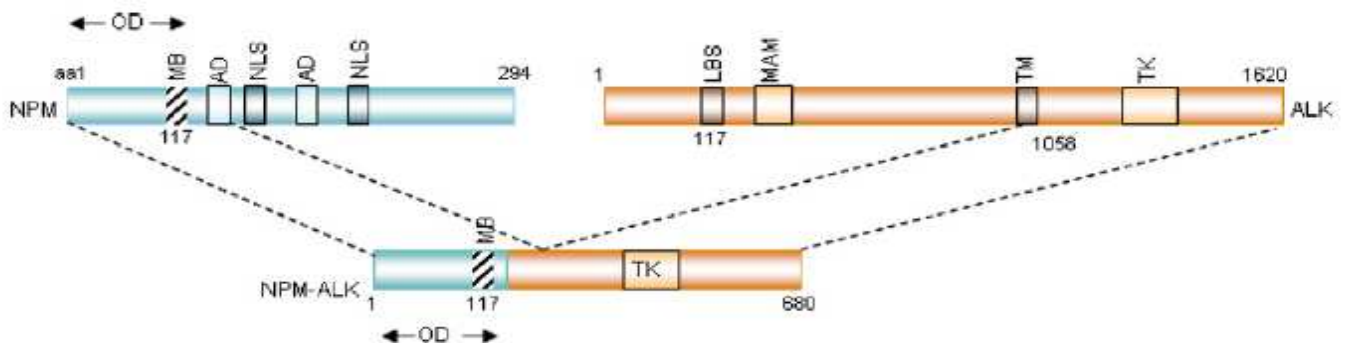
Enfin, ALK reste un antigène primordial dans l'identification de ces lymphomes puisque 85% des cas l'expriment. On le retrouve majoritairement exprimé dans les LAGC systémiques bien que de rares cas de lymphomes B diffus à grandes cellules soient également ALK<sup>+</sup> (17).

Etant donné qu'il n'y a pas de marqueur immunophénotypique ou génétique unique pour identifier les LAGC ALK<sup>-</sup>, leur diagnostic reste encore difficile. Il est notamment complexe de les différencier des lymphomes T-périphériques sans spécificité (PTCL-NOS) qui expriment l'antigène CD30. Les LAGC ALK<sup>-</sup> peuvent être néanmoins distingués de ces lymphomes par quelques critères: leur morphologie anaplasique, leur forte expression des marqueurs CD30, EMA et des protéines cytotoxiques. De plus, les LAGC ALK<sup>-</sup> expriment plus faiblement certains marqueurs T (CD2, CD3, CD4 et CD43) que les PTCL-NOS. Des études ont également démontré que la tyrosine kinase ZAP-70 associée au récepteur T était systématiquement exprimée dans les PTCL-NOS contrairement aux LAGC ALK<sup>-</sup>. Enfin, ces deux entités seraient génétiquement distinctes par la perte exclusive des chromosomes 5q et 9p dans les PTCL-NOS (18).

## **D. Aspects moléculaires**

### **1. La translocation t(2;5) (p23;q35)**

Dès la fin des années 80, plusieurs groupes ont montré que les LAGC étaient associés à une translocation chromosomique équilibrée, la t(2;5)(p23;q35). Le clonage des points de cassure sur chaque chromosome a ensuite permis, en 1994, d'identifier les gènes impliqués : *ALK*, pour Anaplastic Lymphoma Kinase sur le chromosome 2 et *NPM* sur le chromosome 5 (19). Cette translocation juxtapose la partie 3' du gène *ALK* à la partie 5' du gène *NPM* codant la nucleophosmine. Cette translocation, qui s'avère être la plus fréquente (75% des cas de LAGC ALK<sup>+</sup> la portent), entraîne donc l'expression d'une protéine chimère constituée de la partie N-terminale de *NPM* et de la partie C-terminale de *ALK* (19-20).



**Figure 3: Structure des protéines NPM et ALK et de la protéine de fusion NPM-ALK.**

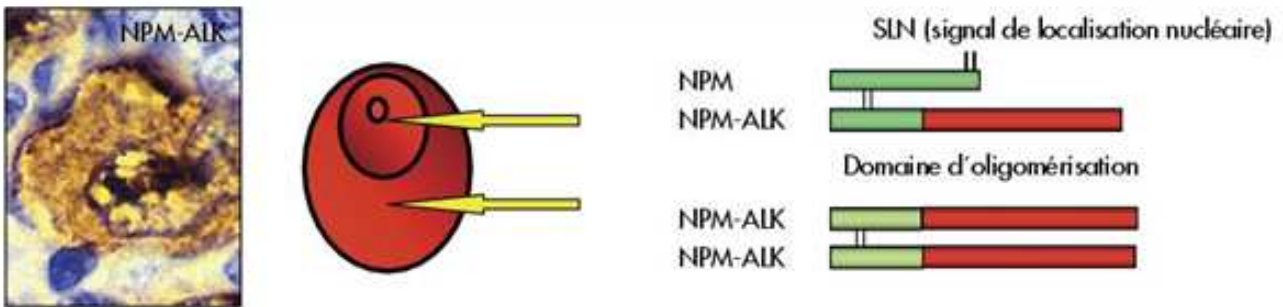
La protéine NPM-ALK conserve le domaine d'oligomérisation (OD) de NPM (en bleu) et la partie cytoplasmique de ALK contenant son domaine tyrosine kinase (en rouge) (d'après Ardini E *et al.*) (21).

- Le gène *ALK*, situé sur le chromosome 2 en position p23, code un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase appartenant à la superfamille du récepteur à l'insuline (22). *ALK* est constitué d'un large domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire hydrophobe et d'un domaine intracellulaire portant le domaine à activité tyrosine kinase (23). Le récepteur *ALK* présente une forte homologie de séquence, notamment au niveau du domaine catalytique, avec le récepteur LTK (Leukocyte tyrosine kinase) Il est quasi exclusivement exprimé au niveau du système nerveux central et principalement au stade embryonnaire (22, 24-25). Deux ligands de *ALK* ont été identifiés mais restent controversés: la pléiotrophine (PTN) (26) et la midkine (MK) (27), des cytokines sécrétées par les cellules neuronales et gliales principalement au cours de l'embryogenèse. Il a été démontré dans notre équipe que le récepteur *ALK* pleine taille fait partie de la famille des récepteurs à dépendance. En effet, il présente une activité pro-apoptotique en l'absence de ligand et une activité anti-apoptotique en présence de son ligand (28). Enfin, aucun phénotype particulier n'a été observé dans les souris déficientes en protéines *ALK* (29).

- Le gène *NPM*, situé sur le chromosome 5 en position p35, code une abondante phosphoprotéine nucléolaire ubiquitaire de 23 kDa aux multiples fonctions. Les embryons de souris invalidés pour le gène *NPM* développent une anémie, une instabilité génomique, ainsi que des problèmes dans la duplication des centrosomes et dans la biogenèse des ribosomes (30). Les rôles décrits pour *NPM* dans la transcription, la réplication et la réparation de l'ADN, ainsi que dans la biogenèse des ribosomes et le cycle cellulaire corroborent avec les effets de son invalidation chez la souris. Quelques études, encore peu détaillées, décrivent d'autres rôles pour *NPM* tels que son implication dans l'apoptose (31), dans l'hématopoïèse (32) ou encore dans l'épissage (33) et la stabilité des ARNm (34).

Suite à la translocation t(2;5) (p23; q35), la protéine de fusion *NPM-ALK* créée comprend la partie N-terminale de *NPM* (avec son domaine d'oligomérisation), et la partie C-terminale de *ALK* (qui comprend son domaine catalytique à activité tyrosine kinase) (Figure 3). Le partenaire *NPM* va, d'une part, favoriser l'homodimérisation des protéines de fusion *NPM-ALK* via son domaine d'oligomérisation. Mimant l'effet d'un ligand, cette homodimérisation entraîne l'activation constitutive suivie de l'autophosphorylation du domaine tyrosine kinase de *ALK*.





**Figure 4: Localisation subcellulaire de la protéine de fusion NPM-ALK.**

Sous forme d'homodimère, NPM-ALK se localise dans le cytoplasme alors qu'hétérodimérisée avec la protéine pleine taille NPM, cette protéine de fusion se localise dans le noyau et le nucléole (d'après Espinos E *et al.*) (35).

Translocation	Frequency in ALK+ lymphoma	Localization	
t(2;5)(p23; q35)	~75%	N/C	
t(1;2)(q25; p23)	~18%	C	
inv(2)(p23; q35)	~2%	C	
t(2;17)(p23; q23)	~2%	C	
t(2;3)(p23; q21)	~1%	C	
t(2;3)(p23; q21)	~1%	C	
t(2;19)(p23; p13.1)	<1%	C	
t(2;X)(p23; q11-12)	<1%	CM	
t(2;22)(p23; q11.2)	<1%	C	
t(2;17)(p23; q25)	<1%	C	

**Figure 5: Liste des variants X-ALK dans les LAGC.**

Dix variants moléculaires impliquant ALK ont été décrits dans les LAGC (adapté de Ardini, E *et al.*) (21)

NPM va, d'autre part, contrôler la localisation subcellulaire de NPM-ALK: lorsque les protéines de fusion sont homodimérisées, elles vont se localiser au cytoplasme, alors qu'hétérodimérisées avec la protéine sauvage NPM, qui possède dans sa région C-terminale un motif de localisation nucléaire et nucléolaire, elles vont se retrouver à la fois dans le noyau et le nucléole (Figure 4).

## **2. Les variants moléculaires des LAGC**

Depuis la découverte de la translocation t(2;5)(p23; q35), 9 autres translocations impliquant ALK ont été décrites dans les LAGC (Figure 5) (21). Quel que soit le partenaire, les protéines de fusion X-ALK vont pouvoir s'oligomériser ou se rapprocher de manière à induire une activation de ALK par autophosphorylation des domaines catalytiques de ALK. De plus, ces protéines de fusion, qui sont en général localisées au cytoplasme, vont dans certains cas présenter des profils de localisation particuliers.

Par exemple, la protéine de fusion CLTCL-ALK, qui implique la région N-terminale de la clathrine, une protéine trimérique essentielle dans la formation de l'enveloppe des vésicules de transport intracellulaire, induit un marquage particulier de ALK au niveau de ces vésicules. La formation de la paroi de ces vésicules, avec une incorporation alternative de protéines de clathrine et de protéines de fusion CTLCL-ALK, permet le rapprochement des domaines catalytiques de ALK et entraîne son activation (36). De la même manière, la protéine chimère MSN-ALK se localise au niveau de la membrane plasmique grâce à son association aux protéines de moesine pleines tailles ou à d'autres protéines membranaires avec lesquelles MSN-ALK peut interagir. L'absence de domaines d'oligodimérisation dans la partie N-terminale de MSN suggère que l'activation de ALK soit permise grâce au rapprochement des protéines de fusion au niveau de la membrane (37). De par, leur localisation particulière ces protéines de fusion vont induire des effets oncogéniques variables. Armstrong F. *et al.* (38) ont notamment démontré, en comparant le pouvoir oncogénique de plusieurs protéines de fusion, que la protéine chimère TMP3-ALK possède le pouvoir invasif le plus fort. Cette caractéristique serait lié au fait que TPM3 est la seule protéine partenaire liée au cytosquelette d'actine dans les cellules NIH-3T3. Ainsi, elle pourrait à la fois ne pas activer pas les mêmes voies de signalisation que les autres protéines de fusion, et affecter l'organisation du réseau d'actine notamment les fibres de stress (38-39).



## **E. Oncogénicité liée aux protéines de fusion X-ALK**

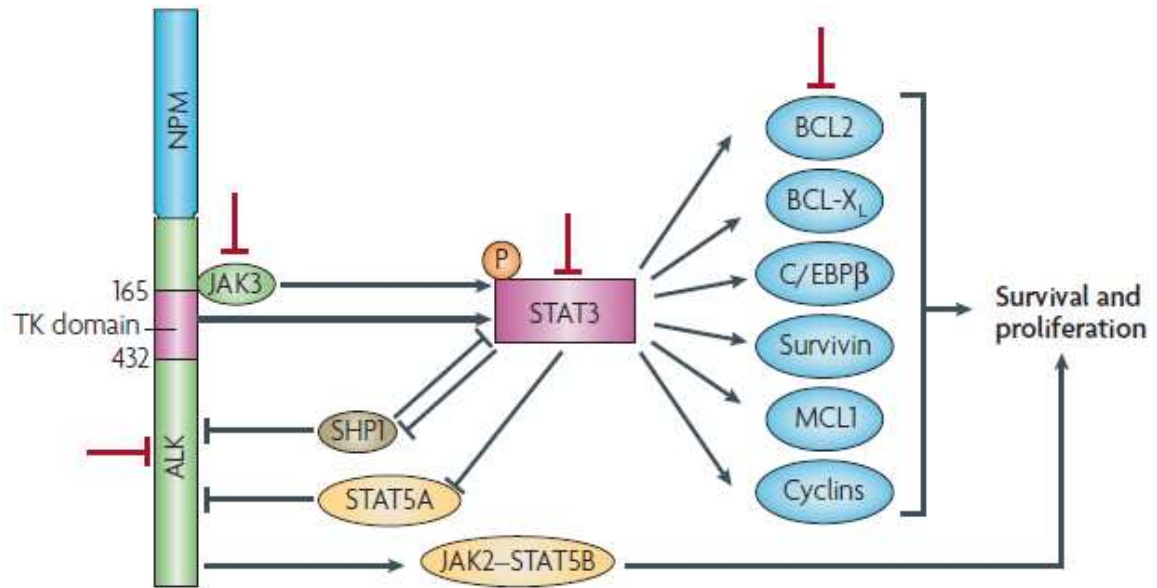
L'oncogénicité des protéines de fusion NPM-ALK provient essentiellement de son activation constitutive. Shiota *et al.* (20) montrent, en 1994, que la protéine de fusion NPM-ALK, d'un poids moléculaire de 80 kDa, est phosphorylée sur résidu tyrosine dans une lignée dérivée de LAGC (20). D'autres travaux réalisés en 1996 par Fujimoto *et al.* (40) vont prouver que NPM-ALK est associée à une activité oncogénique importante puisque son expression exogène entraîne une transformation maligne de fibroblastes murins NIH-3T3. Dans ces cellules transformées, ils identifient l'existence d'interactions entre NPM-ALK et des protéines adaptatrices telles que SHC et IRS-1 via des motifs caractéristiques NPXY identifiés dans le domaine phosphotyrosine de ALK. C'est la première étude qui suggère que NPM-ALK, via l'activation de protéines adaptatrices, joue un rôle dans la signalisation et *in fine* dans la transformation cellulaire (40). Depuis ces travaux, de nombreuses voies de signalisation induites par ALK ont été décrites (41).

### **1. Voies de signalisation activées par les oncogènes X-ALK**

Le pouvoir oncogénique des protéines de fusion X-ALK est lié notamment à leur capacité d'activer de nombreuses voies de signalisation qui favorisent à la fois la prolifération, la survie mais aussi la migration cellulaire via des réarrangements du cytosquelette. Ces voies de signalisation sont fortement interconnectées et s'imbriquent quelques fois entre elles. Parmi elles, on trouve les voies des MAP kinases, de la PLC $\gamma$ , la voie JAK/STAT et la voie PI3K - AKT.

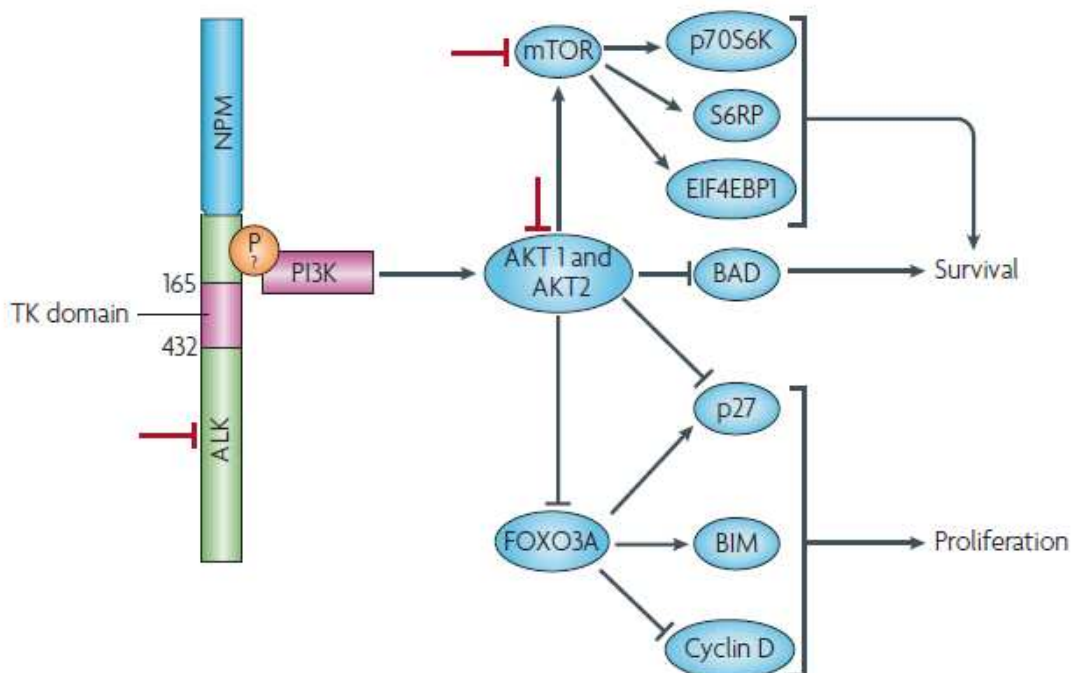
#### **a) Voie JAK/STAT**

La voie des STATs (Signal Transducers and Activators of Transcription) joue un rôle central dans la tumorigenèse induite par NPM-ALK. L'implication du facteur de transcription STAT3 dans les LAGC a été finement étudiée *in vivo* et *in vitro*. En effet, Chiarle R *et al.* (42) ont montré, *in vivo*, grâce à un système de souris transgénique *Stat3*<sup>-/-</sup> et d'un système CRE/lox, que Stat3 était requis pour la transformation des cellules fibroblastiques induite par NPM-ALK ainsi que dans la survie et la croissance des cellules T néoplasiques.



**Figure 6: Activation de la voie JAK/STAT par NPM-ALK.**

NPM-ALK active les facteurs de transcription STAT3 et STAT5B via les protéines kinases JAK3 et JAK2 respectivement. L'expression de STAT5A est quant à elle réprimée par méthylation de son promoteur via une méthyltransférase dont l'expression est induite par STAT3. STAT3 induit par ailleurs l'expression de nombreux facteurs impliqués dans la survie et la prolifération (d'après Chiarle R *et al*) (43).



**Figure 7: Activation de la voie PI3K/AKT par NPM-ALK.**

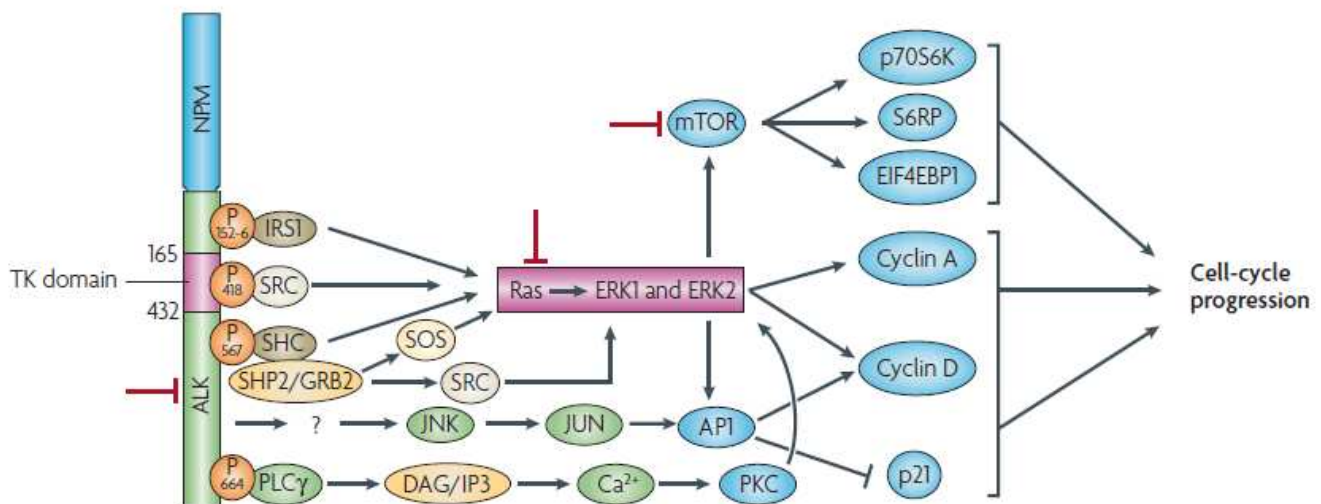
NPM-ALK interagit directement avec la PI3K qui active les protéines kinases AKT1 et AKT2. Ces kinases inhibent d'une part le facteur de transcription FOXO3. Cette inhibition empêche l'expression d'inhibiteurs du cycle comme p27 et favorise l'expression de la cycline D mais aussi inhibe l'expression de la protéine apoptotique BIM. Ainsi cette voie favorise la prolifération et la survie. La survie est également induite via l'inactivation directe de la protéine apoptotique BAD par AKT et par l'activation de la voie mTOR (d'après Chiarle R *et al.*) (43).

De nombreuses études ont ensuite démontré que STAT3, suite à son activation par NPM-ALK via une interaction directe ou via l'intermédiaire de JAK3, pouvait contribuer à la fois à la survie et à la prolifération des LAGC via la transcription de gènes anti-apoptotiques tels que *Bcl-2*, *Bcl-xL*, *survivine* et *MCL-1* mais aussi de gènes impliqués dans la prolifération comme *C/EBPβ* et *cycline D3* (Figure 6). La voie qui emprunte le facteur de transcription STAT3 se démarque des autres voies puisqu'il a été décrit qu'elle pouvait intervenir dans l'échappement tumoral à la réponse immunitaire via l'induction de l'expression du gène *CD274*, un récepteur immunosuppresseur (44), et *IL-10*, connu pour induire un arrêt de prolifération des cellules immunitaires environnantes à la tumeur (45).

Par ailleurs, le facteur de transcription STAT5 semble également être un médiateur important de la tumorigenèse des LAGC (46). Cependant, seule l'inhibition de STAT5b bloque l'effet transformant de ALK *in vivo* et *in vitro* par apoptose (46-47). STAT5a, dont l'expression est réprimée par méthylation de son promoteur par la méthyltransférase MeCP2 (methyl CpG binding protein 2) transcrite par STAT3, semblerait quant à elle avoir plutôt des effets "suppresseur de tumeur" (48) (Figure 6).

#### b) Voie PI3K/AKT

La voie PI3K/AKT a été décrite pour son implication dans la survie des tumeurs de LAGC (49-50). PI3K interagit directement et indirectement avec ALK via sa sous-unité p85. Cette interaction mène à l'activation de la PI3K suivie de la phosphorylation d'AKT (49), une protéine connue pour son pouvoir anti-apoptotique via la régulation de plusieurs médiateurs comme BAD, NF-κB, la caspase 9 ou encore Fas ligand. AKT, en hyperphosphorylant le facteur de transcription FOXO<sub>3</sub>, va, de plus, favoriser la survie et la prolifération cellulaire en empêchant la transcription de gènes apoptotiques tels que *BIM* ou *p27* et en favorisant l'expression du gène codant la Cycline D2 (51) (Figure 7). Cette voie active, d'autre part, la protéine mTOR (mammalian Target of Rapamycin) (52) qui est aussi activée par la voie des MAP kinases décrite ci-dessous (I.E.1.d).



**Figure 8: Activation de la voie des MAP kinases et de la PLC $\gamma$  par NPM-ALK.**

D'une part, NPM-ALK interagit avec des protéines adaptatrices IRS1, Shc, SHP2/GRB2 ainsi que la protéine kinase Src qui vont permettre l'activation des protéines ERK1/2. Ces protéines vont induire l'activation de la protéine mTOR, qui en activant les facteurs p70S6K, S6RP et eIF4BP1 va induire la traduction de protéines impliquées dans le cycle cellulaire dont Jun B. D'autre part, NPM-ALK va activer la Jun Kinase qui phosphoryle JunB. JunB peut ainsi se lier à la protéine c-fos pour former le complexe AP-1 qui va moduler la transcription de facteurs impliqués dans le cycle cellulaire (Cyclin D et p21). NPM-ALK interagit directement avec la protéine PLC $\gamma$  qui aboutit à l'activation de la PKC ce qui augmente l'activation de la voie des MAP kinase (d'après Chiarle R *et al.*) (43).

d) Voie PLC  $\gamma$ 

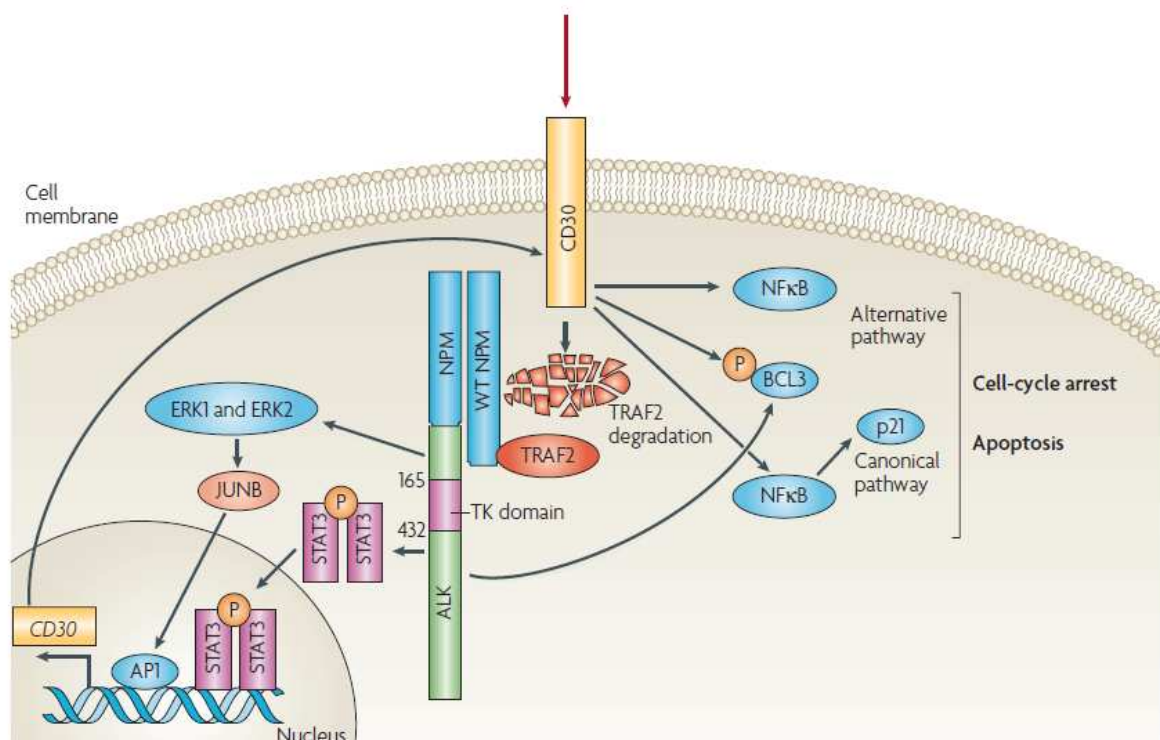
NPM-ALK contrôle également la prolifération en interagissant directement avec la PLC $\gamma$  (phospholipase C- gamma) (53). Cette phospholipase, une fois activée, entraîne l'hydrolyse du Phosphatidylinositol (PIP<sub>2</sub>) en Inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) et Diacylglycerol (DAG), molécule qui, en se liant à ses récepteurs présents à la membrane du Réticulum Endoplasmique, va entraîner la libération du Ca<sup>2+</sup> et permettre d'activer les PKC (53) (Figure 8).

e) Voie des MAP kinases

NPM-ALK se comporte comme une protéine d'amarrage pour des protéines adaptatrices qui interagissent avec NPM-ALK grâce à leurs domaines SH2. Parmi elles, SHC (SH2 domain-containing transforming protein), IRS-1 (Insulin Receptor Substrate1) et GRB2 (Growth factor Receptor-Bound protein 2), une fois phosphorylées par NPM-ALK, activent la voie Ras-ERK1/2 qui aboutit d'une part à l'activation de mTOR (mammalian Target of Rapamycin) et d'autre part, à l'augmentation de la transcription de JunB. L'activation de mTOR favorise la phosphorylation de la protéine ribosomale S6 (S6RP) et du facteur de traduction 4EBP1, ce qui permet la traduction de JunB (52, 54). De surcroît, JNK (Jun Kinase), en interagissant directement avec NPM-ALK, est activée et phosphoryle JunB. JunB phosphorylée forme, avec c-fos, le complexe AP-1 qui induit la transcription des *cyclines A1* et *D3* et l'inhibition de la transcription du gène codant un inhibiteur du cycle, *p21* (55). Par conséquent, cette voie aboutit à la prolifération des LAGC (Figure 8).

Cette voie MAP kinase peut également être activée par la tyrosine kinase c-Src. c-Src est un récepteur à activité tyrosine kinase impliqué dans la migration, la prolifération et la croissance tumorale (Figure 8). Son activité kinase est notamment indispensable pour l'adhésion cellulaire via les intégrines et l'adaptation morphologique des cellules. Dans les LAGC, pp-60src (c-Src) est activée directement par NPM-ALK ou indirectement via la protéine adaptatrice Grb2 par phosphorylation au niveau de sa tyrosine 418 (40) (56). L'utilisation d'inhibiteur de c-Src a démontré que cette protéine était importante dans la croissance des cellules de LAGC (56). De plus, c-Src, en activant le facteur d'échange de nucléotide guanylique (GEF) VAV1, aboutit à l'activation de la Rho GTPase Cdc42, une protéine impliquée à la fois dans la croissance et la maintenance des LAGC *in vivo* mais aussi dans la régulation de leur morphologie et de leur migration (57).





**Figure 9: Signalisation du CD30.**

L'expression du récepteur CD30 est induite par NPM-ALK via la voie JAK/STAT et la voie des MAP kinases. Le CD30 se localise à la membrane et régule les voies alternatives et canoniques de NFκB qui ont des effets anti-prolifératifs et apoptotiques. L'activation des voies impliquant NFκB se fait via l'activation de TRAF par le CD30. Cependant, NPM-ALK va phosphoryler NPM qui va séquestrer les protéines TRAF et les tenir éloignées du CD30. Ainsi la voie du CD30 est modulée par NPM-ALK de manière à favoriser la survie et la prolifération (d'après Chiarle R *et al.*) (43).

### *f) Signalisation via le récepteur CD30*

Le marqueur CD30 appartient à la famille du TNFR (tumor necrosis factor receptor). Son expression est induite indirectement par NPM-ALK via le facteur de transcription JunB mais aussi via le facteur de transcription STAT3 ce qui la rend caractéristique des LAGC. Ce marqueur induit une signalisation particulière encore très controversée. Dans les LAGC, l'engagement du CD30 par son ligand naturel CD30L ou par des anticorps anti-CD30, aboutit à plusieurs effets divers et opposés incluant l'activation ou l'inhibition du cycle cellulaire, la différenciation ou l'apoptose. Ces effets sont le résultat du recrutement, au niveau du domaine intracytoplasmique du CD30, des protéines TRAFs (Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor) qui entraînent l'activation du facteur de transcription NFκB. En utilisant le ligand naturel, Wright, CW *et al.*(58) ont montré que la stimulation du CD30 entraîne l'activation à la fois de la voie canonique et de la voie alternative de NFκB, les effets dépendants de l'intensité et de la durée de l'engagement du CD30.

Après stimulation du CD30 par son ligand naturel, une fraction de LAGC rentre rapidement en apoptose suite à une dégradation de la protéine TRAF2. L'autre fraction, qui survit, présente une activation importante de la voie alternative de NFκB associée à la transcription de gènes tels que ceux codants l'IL-8 ou la cycline D2. En prolongeant la stimulation de ces cellules, les LAGC arrêtent de proliférer en corrélation avec l'augmentation d'expression de l'inhibiteur du cycle p21<sup>WAF1</sup> induite par la voie canonique de NFκB (58). Or NPM-ALK semblerait réguler l'activité de cette voie canonique en induisant la phosphorylation de la protéine NPM normale qui entrainerait la séquestration de la protéine TRAF2 loin du CD30 (59). De plus, en induisant la surexpression et la phosphorylation de BCL3, une protéine de la famille  $\kappa$ B (protéine inhibitrice de NFκB), NPM-ALK favoriserait la transcription des gènes induits par la voie alternative de NFκB (60) (Figure 9). La signalisation via le CD30 est donc modulée à la fois par NPM-ALK et par le CD30 lui-même, de manière à favoriser le développement tumoral. Néanmoins, l'ensemble de ces travaux ont été réalisés *in vitro*, et à ce jour les fonctions exactes du CD30 n'ont pas encore été démontrées *in vivo*.



## **2. Profils d'expression "dépendants" de ALK**

### **a) Le transcriptome des LAGC**

L'activation des voies de signalisation par NPM-ALK entraîne donc *in fine* l'activation de facteurs de transcription tels que STAT3, JunB et FOXO3 et par conséquent, la transcription de certains gènes clés impliqués dans l'oncogenèse des LAGC. L'analyse du transcriptome a notamment révélé que les tumeurs ALK<sup>+</sup> sont souvent associées à une surexpression de gènes codant des marqueurs d'activation de cellules T, ou encore des protéines impliquées dans le cycle cellulaire, la signalisation et l'apoptose (61). En utilisant une puce à ADNc de type "Lymphochip", qui porte des ADNc correspondant à des ARNm exprimés seulement dans les lymphocytes et les leucémies, Thompson *et al.* (62) ont comparé les niveaux d'ARNm présents dans 7 tumeurs ALK<sup>+</sup> par rapport à ceux présents dans 7 tumeurs ALK<sup>-</sup>. Les tumeurs ALK<sup>+</sup> surexpriment des gènes codants de protéines impliquées dans la transduction des signaux tels que Lyn, Syk et CDC37 mais également des protéines du cycle comme la cycline D3 (62). Par la suite, deux études réalisées simultanément ont permis d'identifier, par deux méthodes différentes, des gènes dont l'expression était fortement corrélée à celle de NPM-ALK. Une des deux études, réalisée au laboratoire, a consisté à comparer l'expression génique de tumeurs et lignées de LAGC ALK<sup>+</sup> et ALK<sup>-</sup> à partir d'un plus grand nombre d'échantillons: 25 tumeurs ALK<sup>+</sup> contre 7 tumeurs ALK<sup>-</sup> et 5 lignées de LAGC (63). L'analyse non supervisée a permis, dans un premier temps, de séparer les tumeurs selon leur type morphologique: d'un côté les patients atteints de LAGC de type commun et de l'autre, ceux présentant des variants morphologiques de LAGC. Dans un deuxième temps, en comparant uniquement le profil d'expression des cas ALK<sup>+</sup>, 2 nouveaux sous-groupes sont apparus: le premier regroupant les patients présentant un stade I/II et le deuxième, les patients présentant un stade avancé III/IV au diagnostic. Parmi ce deuxième groupe, de nombreux patients avaient notamment subi des rechutes précoces (63). L'analyse supervisée a, quant à elle, montré que les tumeurs ALK<sup>+</sup> et ALK<sup>-</sup> ont des profils d'expression génique différents, confirmant que ce sont bien des entités distinctes. Parmi les 303 gènes différentiellement exprimés entre tumeurs ALK<sup>+</sup> et ALK<sup>-</sup>, *BCL6*, *PTPN12*, *C/EBPβ* et *Serpine A1* apparaissent comme les gènes les plus discriminants, avec un taux d'ARNm significativement supérieur dans les LAGC ALK<sup>+</sup>. Une analyse par tissu microarray a permis de confirmer ces résultats au niveau protéique pour *BCL6*, *C/EBPβ* et *Serpine A1*.



C/EBP $\beta$  s'est avérée être la protéine la plus différenciellement exprimée entre tumeurs ALK<sup>+</sup> et ALK<sup>-</sup> avec 97% des cas ALK<sup>+</sup> qui l'expriment (63/65) contre seulement 4,8% des ALK<sup>-</sup> (1/21) (63). Parallèlement à cette étude, et par une approche de perte de fonction induite par l'utilisation, soit de lentivirus permettant l'expression d'un shRNA inductible dirigé contre ALK, soit d'inhibiteurs spécifiques de ALK dans deux lignées de LAGC ALK<sup>+</sup>, Piva *et al.* (64) ont décrit qu'un groupe de gènes présentait une expression fortement corrélée à celle du CD30 et par conséquent à celle de ALK (64). Parmi eux, *BCL2A1* et *C/EBP $\beta$*  semblent indispensables à la transformation cellulaire ainsi qu'à la croissance et à la survie des cellules exprimant NPM-ALK (61, 64-65). Cependant une étude réalisée très récemment par ce même groupe sur un plus grand nombre de cas (22 ALK<sup>+</sup> versus 26 ALK<sup>-</sup>) suggère que ces deux facteurs, qui sont également exprimés dans quelques cas de LAGC ALK<sup>-</sup>, seraient induits dans ces tumeurs par un activateur autre que l'oncogène X-ALK (66).

Très récemment, une étude a rapporté le profil d'expression génique de cellules tumorales isolées à partir de biopsies de LAGC ALK<sup>+</sup> et ALK<sup>-</sup> (67). Ces cellules néoplasiques ont été obtenues par microdissection de biopsies issues de: 5 tumeurs de LAGC ALK<sup>+</sup>, 4 tumeurs de LAGC ALK<sup>-</sup>, 7 tumeurs de LAGC cutanés mais aussi 4 tumeurs de lymphomes hodgkiniens. Parallèlement à ces cellules néoplasiques, des cellules T et des cellules NK ont été prélevées par tri cellulaire à partir de sang périphérique de donneurs sains. Ainsi en comparant le profil d'expression génique de toutes ces cellules, Eckerle *et al.* (67) sont parvenus à séparer en deux classes distinctes les LAGC ALK<sup>+</sup> et ALK<sup>-</sup>, résultat jamais obtenu auparavant par une étude non supervisée. Ce résultat est sans doute dû au tri des cellules néoplasiques. Cette étude a permis également de séparer les LAGC ALK<sup>+</sup> des autres cellules néoplasiques ALK<sup>-</sup> et LH, soulignant le fait que les LAGC ALK<sup>+</sup> sont bien une entité à part entière. Cependant, cette étude a mis en lumière le fait que la quantité de gènes différenciellement exprimés entre LAGC ALK<sup>+</sup> et ALK<sup>-</sup> reste peu importante: ils correspondraient uniquement à ceux transcrits en aval des facteurs de transcription et des voies de signalisation induites par ALK, notamment STAT3 (67).



Etant donnée l'influence de ALK sur l'expression génique, un autre groupe a réalisé une étude dans laquelle à été comparé le profil d'expression génique de tumeurs exprimant deux variants moléculaires X-ALK différents: NPM-ALK et TPM3-ALK (68). Alors que de nombreux gènes sont dérégulés de la même manière dans ces deux entités (*C/EBP $\beta$* , *BCL-10*, *Il2R*, ...), un petit groupe de gène va présenter un profil d'expression distinct. Ce résultat pourrait s'expliquer par l'activation, par ces deux variants moléculaires, de voies de signalisation et de facteurs de transcription distincts en raison de leur localisation subcellulaire différente (68) (cf. paragraphe I.D.2).

### *b) Le protéome des LAGC*

Les analyses protéomiques des LAGC restent incontournables pour mieux comprendre la pathogénie de la maladie et identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et de nouveaux biomarqueurs utiles au diagnostic ou au pronostic. Ce type d'approche permet : 1) d'analyser la cellule entière ou un compartiment précis, 2) d'identifier des nouveaux partenaires interagissant avec ALK, 3) de déterminer les voies de signalisation dérégulées, 4) de quantifier l'impact d'un traitement pharmacologique.

Afin d'élaborer le catalogue complet des protéines exprimées dans les LAGC, un groupe a réalisé des études de spectrométrie de masse sur des fractions isolées cytoplasmiques, nucléaires et membranaires obtenues à partir d'une lignée de LAGC ALK<sup>+</sup> (69). Cette étude a révélé que, parmi un groupe représentatif de 206 protéines décrites dans la littérature pour être impliquées dans d'autres cancers, 44,7% étaient exprimées dans les LAGC ALK<sup>+</sup>. Parmi ces protéines, seules 4,3% avaient déjà été décrites dans la pathogénie des LAGC (69). Depuis, de nombreuses protéines, jouant un rôle majeur dans les LAGC, ont été caractérisées telles que des kinases, des protéines de la signalisation, de la transcription/traduction, des protéines de liaison aux ARN/ADN ou encore des protéines structurales. L'intérêt de cette approche est aussi de déterminer l'impact de l'expression de l'oncogène X-ALK sur le protéome. Ainsi, plusieurs équipes ont comparé le profil protéique de lignées exprimant ou non NPM-ALK (LAGC ou lignées transfectées). Deux études ont révélé la surexpression dans les lignées ALK<sup>+</sup> par rapport aux lignées ALK<sup>-</sup> de protéines du cytosquelette impliquées dans l'adhésion cellulaire et l'invasion, de protéines associées aux centrosomes et aux microtubules, de protéines chaperonnes souvent associées à la machinerie du protéasome mais aussi de protéine impliquées dans les voies de signalisation, dans le contrôle de l'expression et de la dégradation protéique, ainsi que dans l'homéostasie et le métabolisme (70-71).





Etant donné le rôle important que joue NPM-ALK dans l'activation de nombreuses voies de signalisation, l'identification des protéines avec lesquelles elle va interagir et former un complexe constitue une nouvelle stratégie pour définir des fonctions supplémentaires de l'oncogène X-ALK et identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans les LAGC. Ainsi, la plupart des études utilise un système d'enrichissement par co-immunoprécipitation avec un anticorps dirigé contre ALK suivi d'une analyse en spectrométrie de masse. Parmi 40 protéines identifiées dans "l'interactome" de ALK, 9 protéines étaient déjà connues pour être des médiateurs de la signalisation de ALK (72). Néanmoins, des protéines jamais identifiées auparavant ont été décrites. Parmi elles, on trouve des molécules adaptatrices (Rho GTPase-activating protein et RAB35), des kinases (MEK 1 et 4, PKC, myosin light chain kinase, cyclin G-associated kinase, EphA1, EphB, JNK kinase, and mitogen-activated protein kinase 1), des phosphatases (meprin, PTPK, and protein phosphatase 2 subunit), et des protéines de la réponse au choc thermique (Hsp60 precursor) (72). De manière intéressante, plusieurs études réalisées plus récemment ont pu mettre en évidence que ALK pouvait interagir avec d'autres classes de protéines telles que des protéines du cytosquelette (vimentine, tubuline, myosine...) (73) mais aussi avec des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN (MSH2 et MCM6) (74) et enfin des protéines qui lient les ARNm (PSF, la nucleoline, FUS/TLS, AWS, p54<sup>nrb</sup> et AUF1) (75-76). L'identification de l'ensemble de ces nouveaux partenaires offre ainsi un nouveau rôle potentiel des protéines de fusion X-ALK dans la réparation de l'ADN et dans la régulation du métabolisme des ARNm.

### **3. Pouvoir transformant des protéines de fusion X-ALK**

Le potentiel oncogénique des protéines chimères impliquant ALK a été démontré à plusieurs reprises *in vivo*. Différentes stratégies de (1) xénogreffes, (2) chimères ou encore (3) de souris transgéniques ont été utilisées de manière à mimer le développement des LAGC.

Des **xénogreffes** de cellules issues d'une lignée de LAGC exprimant NPM-ALK (77) ou de fibroblastes murins exprimant stablement NPM-ALK ont permis de montrer que l'expression de NPM-ALK (78) favorise le développement tumorale de LAGC mais aussi que des traitements visant ALK peuvent entraîner leur régression complète (77-78).



En ce qui concerne les **chimères hématopoïétiques**, Miething *C et al.* (79) ont, d'une part, généré des chimères ayant reçu une moelle osseuse transduite *ex vivo* par des lentivirus portant l'ADNc de NPM-ALK et, d'autre part, produit des chimères Cre-lox permettant l'expression de NPM-ALK dans les lymphocytes T grâce à l'expression de la recombinaise Cre sous le contrôle du promoteur du granzyme B (80). Cependant ces modèles n'ont développé que des lymphomes de type B (plasmocytomes ou DLBCL). Toutefois, la variabilité de la multiplicité d'infection virale (MOI) a abouti à des tumeurs NPM-ALK<sup>+</sup> de phénotypes différents ( plasmocytomes avec une MOI élevée ou DLBCL riche en histiocytes avec une MOI faible) suggérant que le niveau d'expression de NPM-ALK pouvait déterminer le phénotype B ou T des tumeurs développées (81).

Enfin, des modèles de **souris transgéniques** dans lesquelles l'expression de NPM-ALK est sous le contrôle d'un promoteur dont l'activité est normalement restreinte aux lymphocytes T, tel que celui du CD4 (82), de VAV (83) ou encore du CD2 (84), ont été également générés. Ces souris ont développé des lymphomes de phénotype B (plasmocytomes ou DLBCL) à l'exception d'une sous population de souris CD4-NPM-ALK qui présentent des tumeurs de phénotype T (82). Un récent modèle de souris transgéniques Tet-off, réalisé au laboratoire par Giuriato *et al* (85), dans lequel l'expression de NPM-ALK est dirigée dans les lymphocytes B ou T de façon conditionnelle, développe lui aussi des Lymphomes/Leucémies de type B. Ce modèle a permis de montrer pour la première fois que la maladie causée par l'expression anormale de NPM-ALK est réversible même à un stade avancé en diminuant le niveau d'expression de ALK ou en inhibant son activité (85).

#### **4. Expression des protéines de fusion X-ALK dans d'autres cancers**

##### **a) Hémopathies malignes**

L'expression anormale des oncogènes X-ALK a été rapportée dans d'autres hémopathies malignes. De nombreuses équipes ont pu mettre en évidence l'existence de translocations X-ALK dans les lymphomes B diffus à Grandes Cellules (DLBCL) (récapitulées dans le Tableau 1). Alors que certaines translocations avaient déjà été décrites dans les LAGC, des analyses cytogénétiques par fluorescence in situ (FISH) ont montré l'existence dans ces lymphomes de nouvelles translocations telles que SQSTM1-ALK (86) et SEC31A-ALK dans les DLBCL (87).

Disease	Fusion Protein	Chromosomal abnormality	Principal references
IMT	TPM3-ALK	t(1;2)(p25,p23)	Lawrence <i>et al.</i> 2000
IMT	TPM4-ALK	t(2;19)(p23,p13)	Lawrence <i>et al.</i> 2000
IMT	CLTC-ALK	t(2;17)(p23,q23)	Patel <i>et al.</i> 2007, Bridge <i>et al.</i> 2001
IMT	ATIC-ALK	inv(2)(p23;q35)	Debiec-Rychter <i>et al.</i> 2003
IMT	SEC31L1-ALK	t(2;4)(p23,q21)	Panagopoulos <i>et al.</i> 2006
IMT	RANBP2-ALK	t(2;2)(p23,q13) inv(2)(p23;p15;q31)	Ma <i>et al.</i> 2003
IMT	CARS-ALK	t(2;11;2)(p23,p15;q31)	Debelenko <i>et al.</i> 2003, Cools <i>et al.</i> 2002
IMT	PPF1BP1-ALK	t(2;12)(p23;p11)	Takeuchi <i>et al.</i> , 2011
NSCLC	EML4-ALK	inv(2)(p21;p23)	Soda <i>et al.</i> , 2007, Rikova <i>et al.</i> 2007
NSCLC	TGF-ALK	t(2;3)(p23,q21)	Rikova <i>et al.</i> 2007
NSCLC	KIF5B-ALK	t(2;10)(p23;p11)	Takeuchi <i>et al.</i> , 2008
DLBCL	NPM-ALK	t(2;5)(p23,q35)	Adam <i>et al.</i> 2003, Onciu <i>et al.</i> 2003
DLBCL	CLTC-ALK	t(2;17)(p23,q23)	De Paepe <i>et al.</i> 2003
DLBCL	unknown	ins(3'ALK)(4q22-24)	Stachurski <i>et al.</i> 2007
DLBCL	SQSTM1-ALK	t(2;5)(p23.1,q35;3)	Takeuchi <i>et al.</i> 2010
DLBCL	SEC31A-ALK	ins(4)(2;4)(?,q21)t(2;4)(p24;q21)	Van Roosbroeck <i>et al.</i> 2010, Bedwell <i>et al.</i> 2010
SCC	TPM4-ALK	t(2;19)(p23,p13)	Du <i>et al.</i> 2007, Jazii <i>et al.</i> 2006
RCC	VCL-ALK	t(2;10)(p23,q22)	Debelenko <i>et al.</i> 2010

**Tableau 1: Translocations impliquant ALK dans d'autres cancers que les LAGC (adapté de Barreca, A *et al.*)**

Ces deux nouveaux partenaires induisent une localisation cytoplasmique de ALK particulière différente de celle connue pour NPM-ALK. En effet, les cellules possèdent un marquage cytoplasmique plutôt granulaire, qui pourrait s'expliquer par le fait que SQSTM1 est une protéine de liaison à l'ubiquitine connue pour être associée aux autophagosomes et que SEC31A est une protéine localisée au niveau des vésicules périnucléaires impliquées dans le transport entre le RE et le golgi. La présence de séquences particulières sur la région N-terminale de ces nouveaux partenaires serait à l'origine de la dimérisation et de l'activation constitutive de ALK (86-87).

*b) Tumeurs non hématopoïétiques*

L'amélioration des techniques d'immunohistochimie a permis de mettre en évidence une expression de ALK dans des cas de tumeurs non lymphoïdes (Tableau 1).

Les Tumeurs Inflammatoires Myofibroblastiques (IMT) représentent un type de cancer non hématopoïétique dans lesquels l'expression de ALK a été rapportée dans environ 35 à 60% des cas (41). Ces tumeurs sont des lésions d'origine mésenchymateuse, au caractère inflammatoire, composées de cellules néoplasiques fusiformes infiltrées par des lymphocytes et des cellules plasmiques. Environ 50% de ces tumeurs présentent des réarrangements du gène *ALK* fusionné au gène *TPM3* ou *TPM4* (tropomyosine 3 ou 4). Néanmoins, 6 autres translocations ont été identifiées dans ces tumeurs (listées dans le Tableau 1). Parmi elles, 4 impliquent de nouveaux partenaires: RANBP2, CARS, SEC31L et PPF1BP1. Ces 4 protéines possèdent des domaines potentiels de dimérisation qui permettent, comme pour NPM-ALK, la formation d'homodimères et d'hétérodimères. Cette interaction entraîne dans certains cas une localisation particulière des protéines de fusion X-ALK. Par exemple, RANBP2 qui n'est autre que la nucleoporine, entraîne un marquage de ALK au niveau de la membrane nucléaire ou plus diffuse dans le cytoplasme selon les cas (88). SEC31L-ALK se localise, tout comme la protéine de fusion SEC31A-ALK décrite dans les LAGC, au niveau des vésicules de transport périnucléaire (89).

Depuis peu, les recherches concernant l'expression de ALK dans les cancers solides ont explosé. Soda *et al.* (90) rapportent une expression anormale de ALK, sous forme d'une protéine de fusion EML4-ALK, dans 7 % des cas de cancers du poumon non à petites cellules (NSCLC) (Tableau 1), cause la plus fréquente de décès par cancer au monde. Cependant quelques cas expriment une nouvelle protéine de fusion, KIF5B-ALK (91). Par ailleurs, ALK est exprimée dans des cancers épidermoïdes ou des cancers du rein dans lesquels la protéine de fusion VCL-ALK a été nouvellement identifiée (Tableau 1).



On peut noter que KIF5B, qui appartient à la famille des kinésines, entraîne une localisation périnucléaire des protéines de fusion alors que VCL, qui n'est autre que la vinculine, une protéine présente au niveau des adhésions focales, localise les protéines de fusion au niveau de la membrane plasmique ou dans le cytoplasme (91-92).

## **F. ALK, comme cible thérapeutique**

L'identification de formes constitutivement actives de la tyrosine kinase ALK dans de nombreux cancers ainsi que la démonstration de l'oncogénicité liée aux protéines de fusion X-ALK *in vivo*, ont mené au développement de molécules capables d'inhiber la croissance tumorale dépendante de ALK. En effet, malgré le relatif succès des chimiothérapies classiques (CHOP: cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine et prednisone) utilisées pour traiter les LAGC, il est clair que l'élaboration de nouveaux composés spécifiques de ALK sont envisageables de manière à mieux cibler la tumeur et à mieux traiter les patients résistants (20% des cas ALK<sup>+</sup>) ou en rechute. La plupart des stratégies cherchent à cibler le domaine catalytique de ALK grâce à des molécules pharmacologiques afin de bloquer son activation. Or, l'utilisation de la vaccination représente également aujourd'hui, une nouvelle stratégie envisageable.

### **1. Les inhibiteurs pharmacologiques de ALK**

Jusqu'à présent, une dizaine de molécules ciblant l'expression ou l'activité kinase de ALK a été développée. Parmi elles, les premières à avoir été testées sont des inhibiteurs naturels, la sautosporine et l' a7-hydroxysautospaurine (UCN-01) (93). Ces dernières ayant prouvé leurs effets sur un patient réfractaire à la polychimiothérapie CHOP, des dérivés de la sautosporine, connus sous l'appellation CEP, ont été développés (94). Leur faible stabilité et solubilité les ont rendus inutilisables en clinique. Une deuxième génération d'inhibiteurs a alors vu le jour tel que le composé 18 produit par Cephalon exerçant, de par sa bonne biodistribution, une inhibition de la croissance tumorale sur un modèle de xénogreffe murin de LAGC (95). Le NVP-TAE684 (96) et le GSK1838705 (97), deux molécules de la classe des pyridones, ont été également synthétisées. Etant donnée la très grande spécificité du premier et la très bonne pharmacocinétique et biodistribution du deuxième, ces deux molécules sont entrées en test clinique (98).





Alors que tous ces composés ciblent la poche ATP de ALK de manière à inhiber son activité kinase, une autre classe de composés naturels, induisant une dégradation de ALK, produits chez une souche de streptomyces tels que l'herbimycine A (99) ou la Geldamycine (100) a été également testée. Ces molécules agissent en se liant à la protéine chaperonne Hsp90 qui protège ALK de la dégradation. En se liant à cette chaperonne, elles la détachent ALK. N'étant plus protégée par sa chaperonne, ALK est dégradée par le protéasome (98).

Très récemment, des composés dérivés de l'urée ont également été testés (101). En effet, il est connu que les inhibiteurs de kinase qui ciblent les formes inactives, comme les dérivés d'urée, sont plus efficaces. Certains présentent une bonne affinité pour ALK entraînant une inhibition de ALK associée à des effets antiprolifératifs (101).

Enfin, la molécule pharmacologique la plus prometteuse reste le PF-2341066 ou Crizotinib produite par Pfizer (102). Cette molécule, développée initialement comme un inhibiteur de c-Met, a montré un IC50 plus faible pour ALK. Cette molécule, dont les effets antiprolifératifs ont été prouvés *in vitro* et *in vivo* (102), a été administrée à deux patientes atteintes de LACG ALK<sup>+</sup> ayant subi une rechute après traitement CHOP (103). Après 5 et 6 mois de traitement, on observe une régression des lésions dans ces deux patientes (103). Ainsi, le Crizotinib est actuellement en phase d'essai clinique pour les LAGC ALK<sup>+</sup> mais aussi pour les cancers du poumon. Elle a notamment été administrée en monothérapie à des patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC) présentant un réarrangement EML4-ALK (104). Le taux de réponse de 64% a amené à une deuxième phase d'essai clinique avec le traitement de 82 patients de NSCLC présentant un réarrangement de ALK. Après 6 mois de traitement, environ 57% des patients ont répondu au traitement avec 1 rémission complète, 46 partielles dont 33% sont stables. Ces résultats sont très encourageants surtout lorsque l'on connaît le très mauvais pronostic de ce type de tumeur. L'utilisation de ces thérapies pourrait donc être élargie à toutes les pathologies associées à ALK dont certaines font aujourd'hui l'objet d'une impasse au niveau thérapeutique. Cependant, une résistance à ces traitements ciblant ALK peut apparaître via notamment l'apparition de mutations de sa poche ATP (104).



## **2. Vaccination des tumeurs présentant l'antigène ALK**

Une autre stratégie de traitement est la vaccination contre l'antigène ALK. Un antigène utilisé pour la vaccination doit répondre à plusieurs contraintes: il doit être exprimé de manière spécifique et stable par la tumeur et il doit jouer un rôle majeur dans le processus d'oncogenèse. ALK, répondant à toutes ces conditions, représente donc une cible potentielle pour la vaccination. Une première étude réalisée par Pulford *et al.* (105) avait déjà montré que les patients atteints de LAGC présentent dans leur sérum des anticorps anti-ALK.

D'autres études ont par la suite démontré que, d'une part, ces anticorps anti-ALK persistent jusqu'à plus de 10 ans dans le sérum des patients rétablis et d'autre part, qu'une forte titration de ces anticorps est corrélée à un faible pourcentage de rechute (106). Par ailleurs, des tests d'antigénicité de ALK ont été réalisés *in vitro* et *in vivo*, ce qui a permis d'identifier 2 épitopes présents dans le domaine kinase de ALK pouvant être reconnus par des protéines du système HLA: HLA-A\*0201 (107). L'immunisation de souris avec ces molécules entraîne une activation des lymphocytes T cytotoxiques. De plus, après génération de lymphocytes T cytotoxiques (CTL) spécifiques de ALK, obtenus par sensibilisation des lymphocytes périphériques du sang (PBL) de donneurs sains présentant le HLA-A\*0201 aux épitopes immunogènes de ALK, ces CTL spécifiques de ALK s'avèrent être capables de lyser les cellules de LAGC ainsi que les neuroblastomes qui expriment ALK (107).

Par une technique de vaccination par ADN, Chiarle *et al.* (108). ont rapporté que des souris vaccinées puis xéno greffées une semaine plus tard par des cellules de LAGC ne développent pas de tumeurs, cette protection durant jusqu'à plus de 70 jours. Néanmoins, la vaccination réalisée après la prise de la tumeur n'a pas vraiment d'effet sur la croissance tumorale sauf si cette vaccination est réalisée en association avec un traitement de chimiothérapie. Cette association permet un bénéfice supplémentaire de 27% par rapport à un traitement de chimiothérapie seul. Ces résultats suggèrent donc que la vaccination en association avec une chimiothérapie classique pourrait être utile pour améliorer le traitement des patients (108).

Synonymes de C/EBP $\beta$	Nom complet	date	Mode de caractérisation	Auteurs
IL-6DBP	IL-6 DNA Binding Protein	1989	Identification d'une protéine capable de se lier à une séquence spécifique, IL-6RE, du promoteur de l'hémopexine pendant la réponse en phase aiguë	Poli V. <i>et al.</i>
NF-IL6	Nuclear Factor-IL6	1990	Sélection à partir d'une banque de protéines capables de se lier au promoteur de l'IL-6	Akira S. <i>et al.</i>
AGP/EBP	AGP / Enhancer Binding Protein	1990	Identification d'une protéine de liaison au promoteur de l' $\alpha$ 1 acid glycoprotein (AGP)	Chang CJ <i>et al.</i>
LAP	Liver Activator Protein	1990	Induit la transcription de gène chimères portant l'élément régulateur du promoteur à l'albumine D	Descombes, P <i>et al.</i>
CRP2	C/EBP Related Protein 2	1991	Sélection à partir d'une banque d'ADNc souris et rat pour identifier des protéines capables de se lier au site de liaison à l'ADN reconnu par C/EBP $\alpha$	William SC <i>et al.</i>
NF-M	Nuclear Factor Myeloide	1992	Impliqué dans la transformation des cellules myéloïdes aviaires: se lie au promoteur du gène codant le facteur de croissance myélomonocytaire du poulet (c-MGF) en association à AP-1	Sterneck E <i>et al.</i>

**Tableau 2: Synonymes de C/EBP $\beta$ .**

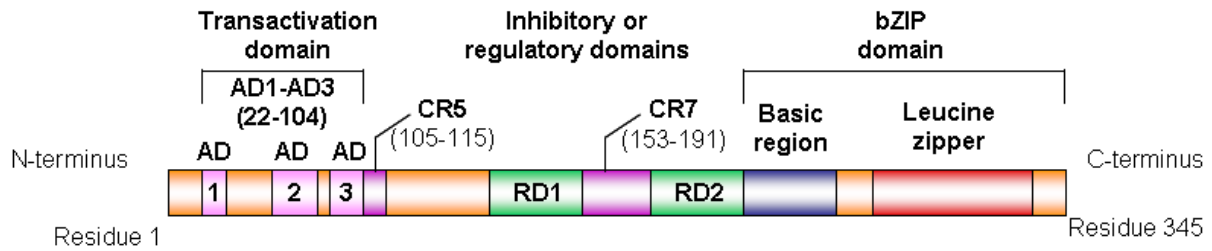
## **II. Le facteur de transcription C/EBP $\beta$ (CCAAT/Enhancer Binding Protein $\beta$ )**

Les protéines appartenant à la famille CCAAT/Enhancer Binding Proteins (C/EBPs) sont des facteurs de transcription dont les 6 membres (C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , C/EBP $\gamma$ , C/EBP $\delta$ , C/EBP $\epsilon$ , C/EBP $\xi$ ) ne sont représentés que dans les eucaryotes. Ces facteurs de transcription se lient sous forme de dimères (homo ou hétéro) sur des séquences spécifiques de l'ADN pour réguler la transcription de nombreux gènes. La famille C/EBP a d'importants rôles dans le métabolisme, l'inflammation, la prolifération et la différenciation cellulaire, la survie et l'apoptose, la transformation et la sénescence liée à l'oncogenèse ainsi que dans la tumorigenèse. Les membres de la famille C/EBP ont été identifiés dans l'ordre chronologique de leur appellation. Ainsi, le premier d'entre eux, C/EBP $\alpha$ , a été purifié à partir d'un foie de rat au milieu des années 1980 et a mené à l'identification du second membre C/EBP $\beta$ . Vers le début des années 1990, une protéine capable de se lier au promoteur de l'*IL-6* en réponse à l'*IL-1*, appelée NF-IL6, et présentant une forte homologie de séquence (87%) avec C/EBP $\alpha$  a été clonée (109). Cette protéine avait été identifiée au même moment par d'autres groupes sous des noms différents (listés dans le tableau 2). Etant donné, sa forte homologie de séquence avec C/EBP $\alpha$  et les similitudes dans le mode de liaison à l'ADN, par dimérisation via le domaine b-ZIP, ces protéines ont été regroupées sous l'appellation C/EBP $\beta$ .

### **A. Structure et propriétés de C/EBP $\beta$**

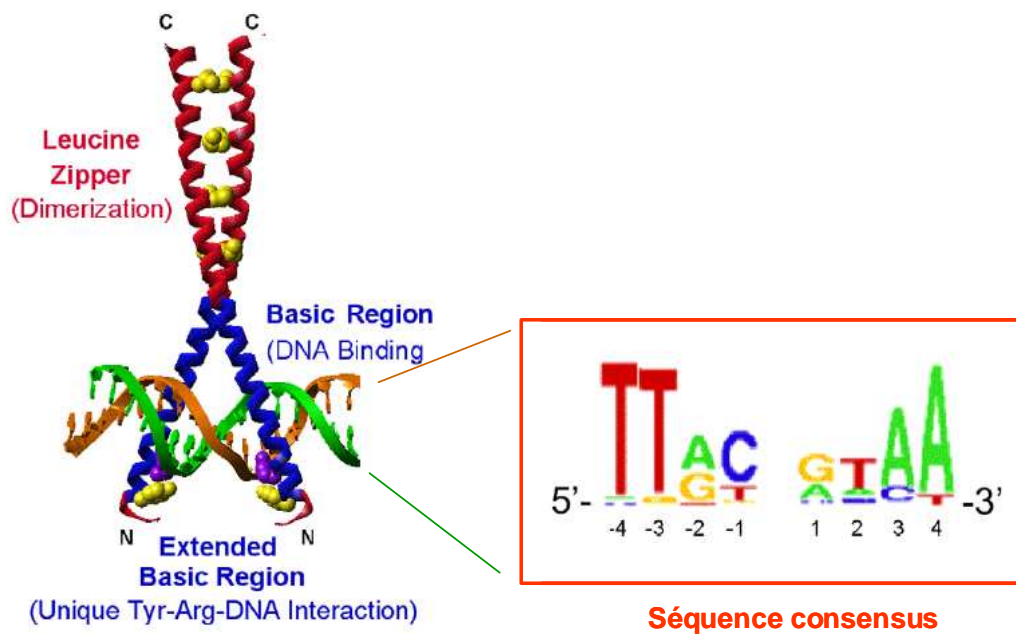
#### **1. Structure de C/EBP $\beta$**

Toutes les isoformes de la famille C/EBP sont composées d'une région C-terminale très conservée contenant le domaine de dimérisation à glissière à leucine (leucine zipper, ZIP) très proche du domaine basique de liaison à l'ADN (basic region, Figure 10) et du domaine de localisation nucléaire, formant ensemble le domaine appelé "b-ZIP". La partie N-terminale est moins conservée mais contient trois motifs courts assimilés à des domaines activateurs (AD) qui permettent une interaction avec des co-activateurs et des composants de la machinerie de transcription (Figure 10).



**Figure 10: Structure du facteur de transcription C/EBP $\beta$ .**

C/EBP $\beta$  possède dans sa région C-terminale un motif "b-ZIP" constitué d'un domaine de dimérisation à glissière à Leucines (Leucine Zipper, ZIP) et d'un domaine basique de liaison à l'ADN (basic region). Sa région N-terminale contient les domaines régulateurs de la transcription transactivateurs (AD) ou répresseurs (RD) ainsi que des régions conservées inhibitrices (CR) (d'après Zahnow CA *et al.*) (110).



**Figure 11: Mode de liaison des complexes C/EBP sur leur séquence consensus.**

Suite à la dimérisation des complexes via leurs domaines Leucine Zipper, les régions basiques des protéines C/EBP $\beta$  forment un "Y" et se lient au niveau d'une séquence consensus au niveau de l'ADN (adapté de Tsukada, J *et al.*) (111).

C/EBP $\beta$  possède en plus de nombreux éléments régulateurs qui vont inhiber son activité transcriptionnelle. Par exemple, parmi les 7 régions conservées décrites (CR1-CR7), deux d'entre elles, CR5 et CR7 (Figure 10) interagissent avec les domaines transactivateurs de la partie N-terminale et inhibent ainsi l'activité transcriptionnelle de C/EBP $\beta$  (112). De plus, 2 domaines régulateurs négatifs (RD1 et RD2) ont été identifiés: RD1 induit une conformation fermée qui empêche l'accès au domaine d'activation tandis que RD2 inhibe la liaison de C/EBP $\beta$  à l'ADN en induisant un changement de conformation qui empêche la région basique d'interagir avec l'ADN (113). La phosphorylation ou la délétion de ces domaines favorise l'activation de C/EBP $\beta$  et augmente son activité transcriptionnelle (112-113).

## **2. Propriétés de C/EBP $\beta$**

C/EBP $\beta$  est un facteur de transcription qui possède un domaine de liaison à l'ADN de type b-ZIP. Ce motif basique, à glissière de leucines, va à la fois permettre la dimérisation et la reconnaissance de la structure de l'ADN. En effet, ce domaine est constitué d'une répétition (6 fois) de 4 leucines (acides aminés hydrophobes) qui permettent de former une hélice  $\alpha$ . Seules 4 répétitions du quartet hydrophobe suffisent pour permettre la dimérisation de C/EBP $\beta$  nécessaire à sa fixation sur l'ADN. La superhélice formée par les domaines b-ZIP du dimère induit le rapprochement des domaines basiques qui entrent en contact avec l'ADN au niveau d'une séquence consensus et l'entourent de manière à former une structure en "Y" (Figure 11).

C/EBP $\beta$  a été initialement identifié pour son implication dans la transcription du gène codant l'IL-6 (109). Par la suite, les sites de liaison reconnus par C/EBP $\beta$  ont été rapportés au niveau de nombreux gènes tels que ceux codants la protéine C-réactive, l'hémopoxine, l'haptoglobine, l' $\alpha$ 1-acide glycoprotéine, l' $\alpha$ 2-macroglobuline, des cytokines telles que TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, G-CSF, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  et des récepteurs pour G-CSF, GM-CSF et M-CSF, protéines principalement associées à la réponse en phase aiguë du foie, à l'inflammation et à l'hématopoïèse (111). De plus, il a été montré que C/EBP $\beta$  pouvait se lier à des séquences enhancer de virus tels que le SV40, polyoma virus et le virus du sarcome murin (MSV) (111). L'alignement de ces sites avec ceux publiés pour C/EBP $\alpha$  ont ainsi permis de déterminer un site de liaison consensus reconnu par les deux protéines: TKNNGNAAK (K=T ou G).





En fait, tous les membres de la famille C/EBP reconnaissent ce même palindrome : ainsi, C/EBP $\beta$  va se lier sur ces séquences soit sous la forme d'homodimères soit sous la forme d'hétérodimères. Or, les protéines C/EBP ne disposant pas toutes des domaines de transactivation en partie N-terminale (cas de C/EBP $\gamma$ ) ou d'un domaine de liaison à l'ADN complet en partie C-terminale (cas de C/EBP $\xi$ ), l'hétérodimérisation avec ces protéines va moduler l'activité transcriptionnelle de C/EBP $\beta$  envers ses gènes cibles (111).

L'hétérodimérisation avec d'autres facteurs de transcription possédant des domaines b-ZIP, comme ceux de la famille CREB/ATF par exemple, va également permettre à C/EBP $\beta$  de se lier sur des sites CRE permettant d'élargir le nombre de ses gènes cibles (111).

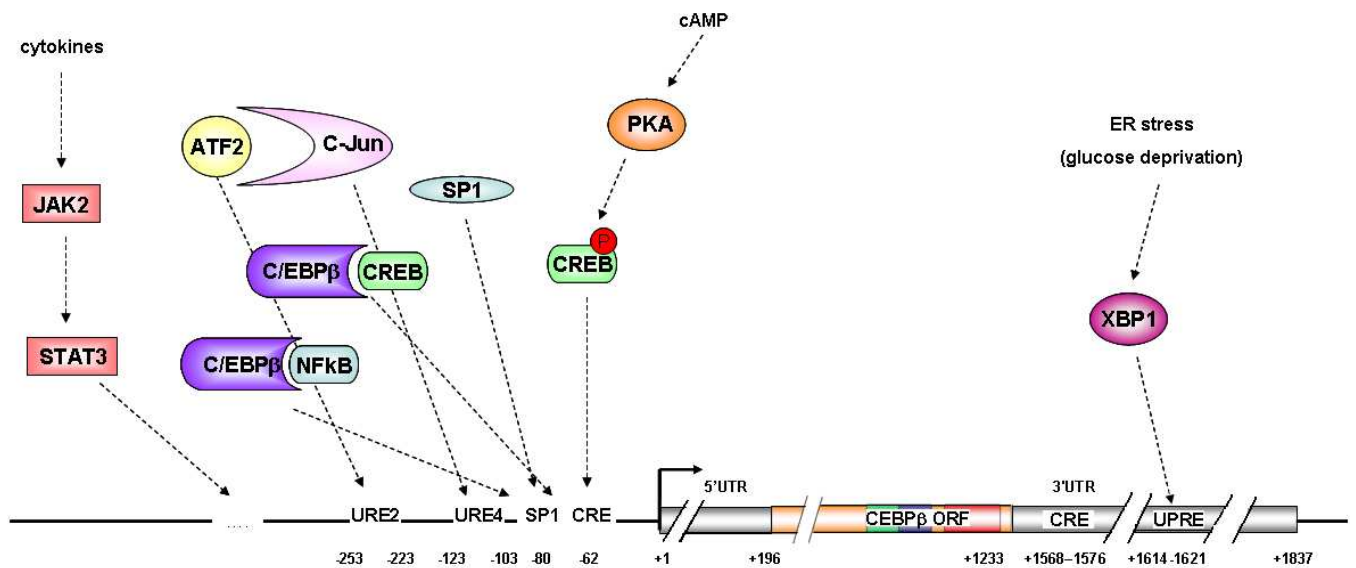
Enfin, C/EBP $\beta$  peut interagir avec des facteurs de transcription ne possédant pas de domaines b-ZIP comme par exemple c-myb, NF $\kappa$ B, N-FAT, AP-1 etc.... (111). Dans ce cas, chaque facteur de transcription se lie sur sa séquence "enhancer" ou "promoteur" respective. L'interaction de la partie C-terminale de C/EBP $\beta$  avec un autre facteur de transcription, localisé à plusieurs dizaines de paires de bases du site C/EBP, entrainerait la formation d'une boucle de l'ADN permettant de rapprocher les séquences reconnues par ces deux facteurs et d'induire la transcription de leur gène cible (114).

Etant donné que les dimères peuvent se former et se dissocier très rapidement, un stress extracellulaire va pouvoir induire la formation préférentielle d'un dimère plutôt qu'un autre et ainsi moduler de manière importante l'expression des gènes cibles de C/EBP $\beta$  (111).

## **B. Régulation de l'expression du gène C/EBP $\beta$**

### **1. Régulation transcriptionnelle**

La caractérisation, dans de nombreuses espèces, des séquences promotrices du gène C/EBP $\beta$  a permis de révéler qu'il pouvait contrôler sa propre transcription. La présence de plusieurs séquences consensus C/EBP dans son promoteur chez le poulet (115), ainsi que sa capacité à se lier à 2 éléments non consensus de son promoteur chez la souris (116), laissaient présager de l'existence d'une autorégulation de C/EBP $\beta$ . Ce mécanisme a été confirmé chez l'Homme, par Niehof M. *et al.* (116), qui ont décrit la liaison de C/EBP $\beta$  sur des éléments CRE like, localisés entre les nucléotides -121 et -71. Cette liaison nécessite l'interaction de C/EBP $\beta$  avec les protéines CREB et NF $\kappa$ B (116).



**Figure 12: Régulation transcriptionnelle de *C/EBPβ*.**

*C/EBPβ* est capable de s'autoréguler en se dimérisant avec les facteurs de transcription CREB. Une fois lié à l'ADN, il peut aussi interagir avec NFκB, lié sur un autre site du promoteur, pour induire sa propre transcription. Les facteurs de transcription C-Jun et ATF2 sont capables d'induire simultanément la transcription de *C/EBPβ*. STAT3, SP-1 ou encore CREB quant à eux sont capables de se lier directement à leurs sites consensus situés en aval du promoteur du gène *C/EBPβ*. Enfin, la fixation de XBP1 au niveau de l'extrémité 3' non traduite (3'NT) favoriserait, de manière originale, la transcription de *C/EBPβ* suite à un stress. (Schéma réalisé à partir de toutes les données bibliographiques actuelles).

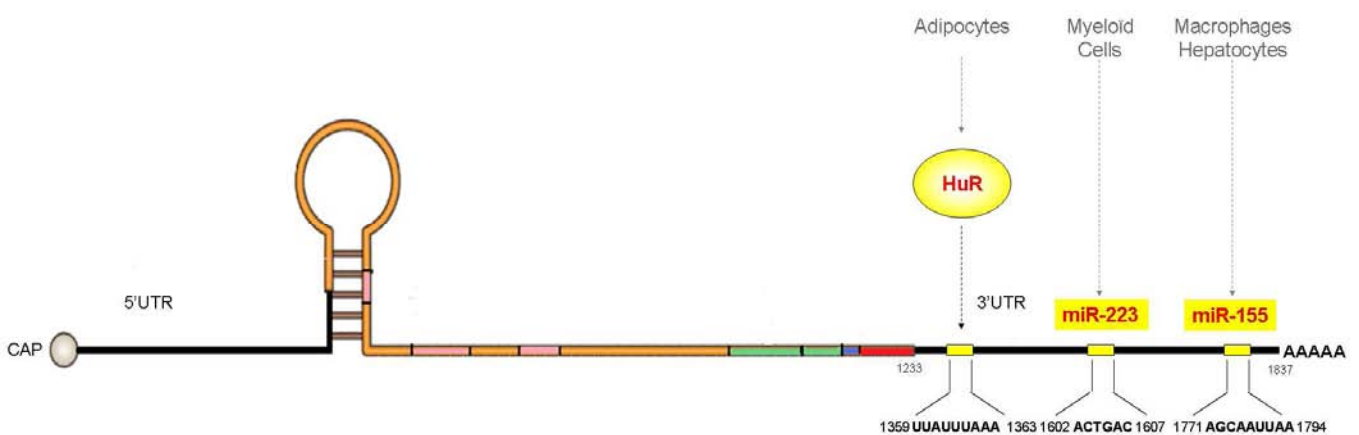
Cependant, cette boucle d'autorégulation ne peut avoir lieu sans une induction initiale de l'expression de *C/EBPβ*. Or, chez le poulet, la fixation du facteur de transcription v-myb sur son site consensus induit l'expression de *C/EBPβ*, à l'origine de la boucle d'autorégulation (115). De la même manière, on peut imaginer que CREB pourrait initier cette boucle d'autorégulation chez l'Homme puisqu'il a été montré que CREB, une fois phosphorylée par la PKA, était capable de se lier aux sites consensus CRE du promoteur de *C/EBPβ* (117-118) (Figure 12).

Outre cette boucle d'autorégulation, la transcription du gène *C/EBPβ* reste finement régulée selon la présence et l'état d'activation des facteurs "trans" tels que les facteurs de transcription (Sp1, c-Jun, STAT3) mais aussi selon les éléments "cis" utilisés (CRE, URE, sp1) dans les différents lignages cellulaires. En effet, dans les macrophages et les hépatocytes, les facteurs de transcription de la famille CREB modulent l'expression de *C/EBPβ* via leur fixation sur des éléments "Cis" différents impliquant simultanément le facteur de transcription Sp1 (117, 119). Parmi les protéines CREB connues, ATF2 se lie au promoteur de *C/EBPβ* de manière coordonnée avec un autre facteur de transcription de la famille AP-1, c-Jun. La liaison de ces 2 protéines permet d'induire l'expression de *C/EBPβ* lors de la phase aiguë du foie (120). Durant l'adipogénèse et la phase aiguë inflammatoire, un autre facteur de transcription, STAT3, activé par JAK2, induit la transcription de *C/EBPβ* en se liant au niveau d'une région distale de son promoteur (121) (Figure 12).

Enfin, Chen C *et al.* (122) ont révélé l'existence d'une régulation originale de la transcription de *C/EBPβ* faisant intervenir un élément régulateur présent dans la partie 3'NT du gène. Suite à une privation en glucose, cet élément *cis* régulateur serait reconnu par la protéine XBP1 et permettrait la transcription de *C/EBPβ*, l'ARNm *C/EBPβ* n'étant pas induit dans des fibroblastes embryonnaire de souris *XBP1<sup>-/-</sup>* (122) (Figure 12).

### **1. Régulation post-transcriptionnelle**

Le gène *C/EBPβ* ne possède pas d'intron, sa transcription entraîne donc l'expression d'un ARNm unique. En conséquence, les pré-ARNm *C/EBPβ* ne subissent pas d'épissage mais vont tout de même être pris en charge par des protéines de liaison aux ARNm qui vont notamment permettre leur export vers le cytoplasme pour y être traduits.

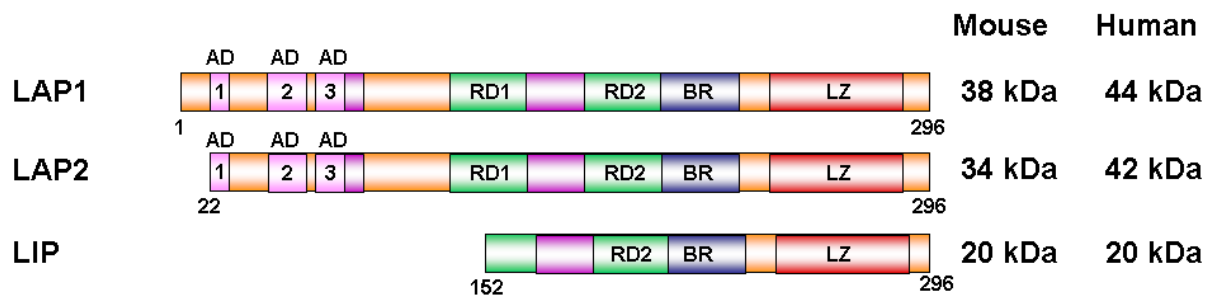


**Figure 13: Régulation post-transcriptionnelle de *C/EBPβ***

Les miRNAs, miR-223 et miR-155 ainsi que la protéine HuR modulent la stabilité et le niveau de traduction de l'ARNm *C/EBPβ*. L'AU-BP HuR régule également la quantité d'ARNm *C/EBPβ* dans le cytoplasme en contrôlant son export nucléo-cytoplasmique (Schéma réalisé à partir de toutes les données bibliographiques actuelles).

Une première étude réalisée par l'équipe du Pr. Pékala a montré que, suite à la surexpression ectopique de la protéine de liaison aux ARNm HuB dans les adipocytes, le niveau protéique de C/EBP $\beta$  était affecté (123). Par cette étude, ils ont donc montré que l'expression de C/EBP $\beta$  pouvait être modulée par des protéines de liaisons aux ARNm. La même équipe a, par la suite, démontré que dans les adipocytes, C/EBP $\beta$  est également la cible d'une autre protéine appartenant à la famille de HuB, la protéine HuR (124). En se liant à l'ARNm C/EBP $\beta$  dans le noyau des adipocytes (124), HuR permet son export au cytoplasme, sa stabilisation (125) et une augmentation de sa traduction puisqu'une diminution de l'expression de HuR dans ces cellules entraîne une diminution du taux protéique de C/EBP $\beta$  (124). En formant, dès le noyau, un complexe avec l'ARNm C/EBP $\beta$ , HuR joue un rôle majeur dans le contrôle de la quantité d'ARNm à exporter dans le cytoplasme lors du processus de différenciation adipocytaire (125) (Figure 13). Depuis, la régulation post-transcriptionnelle de l'expression du gène C/EBP $\beta$  a été rapportée dans d'autres modèles. Goethe *et al.* (126) ont notamment montré que, dans des cellules myélomonocytaires de poulet traitées par des agents activateurs des kinases PKA et PKC, l'expression du gène C/EBP $\beta$  était régulée de manière transcriptionnelle mais aussi post-transcriptionnelle via la stabilisation de son ARNm (126) (Figure 13). Un autre type de régulation post-transcriptionnelle de C/EBP $\beta$  a été décrit par He M. *et al.* (127). Ce groupe a en effet observé que les macrophages infiltrés dans divers types de tumeurs présentent une augmentation du taux de protéines C/EBP $\beta$  sans que le taux d'ARNm soit affecté (127). Ce résultat a mené à l'identification d'un microRNA, miR-155, capable de se lier directement sur la région 3' non traduite (nt +1771 à nt +1794) de l'ARNm C/EBP $\beta$  et d'en empêcher la traduction (Figure 13). Dans les macrophages péricarcinomaux, la faible expression de ce miR ne permet pas la répression de la traduction de l'ARNm C/EBP $\beta$  ce qui serait à l'origine de son fort taux protéique (127). A contrario, la surexpression du miR-155, constatée par Wang B *et al.* (128) dans les hépatocarcinomes, aboutit à une diminution concomitante du taux de protéines C/EBP $\beta$ , jouant un rôle majeur dans l'émergence de la pathologie.

Très récemment, un autre miR impliqué dans l'hématopoïèse, le miR 223, a aussi été identifié pour son effet répresseur de la traduction de l'ARNm C/EBP $\beta$  (Figure 13). Ce miR empêche l'expression du facteur de transcription C/EBP $\beta$  et d'un grand nombre de ses gènes cibles impliqués dans la différenciation myéloïde (129).



**Figure 14: Isoformes protéiques de C/EBP $\beta$ .**

La traduction de l'ARNm *C/EBP $\beta$*  génère 3 isoformes protéiques distinctes: LAP1, LAP2 et LIP. L'absence de certaines régions dans la partie N-terminale des isoformes LAP2 et LIP module leur activité par rapport à LAP1 qui possède l'intégralité de la séquence protéique. La taille des isoformes chez l'homme et la souris est indiquée à droite (d'après Zahnov et al.) (110).

## **2. Régulation traductionnelle**

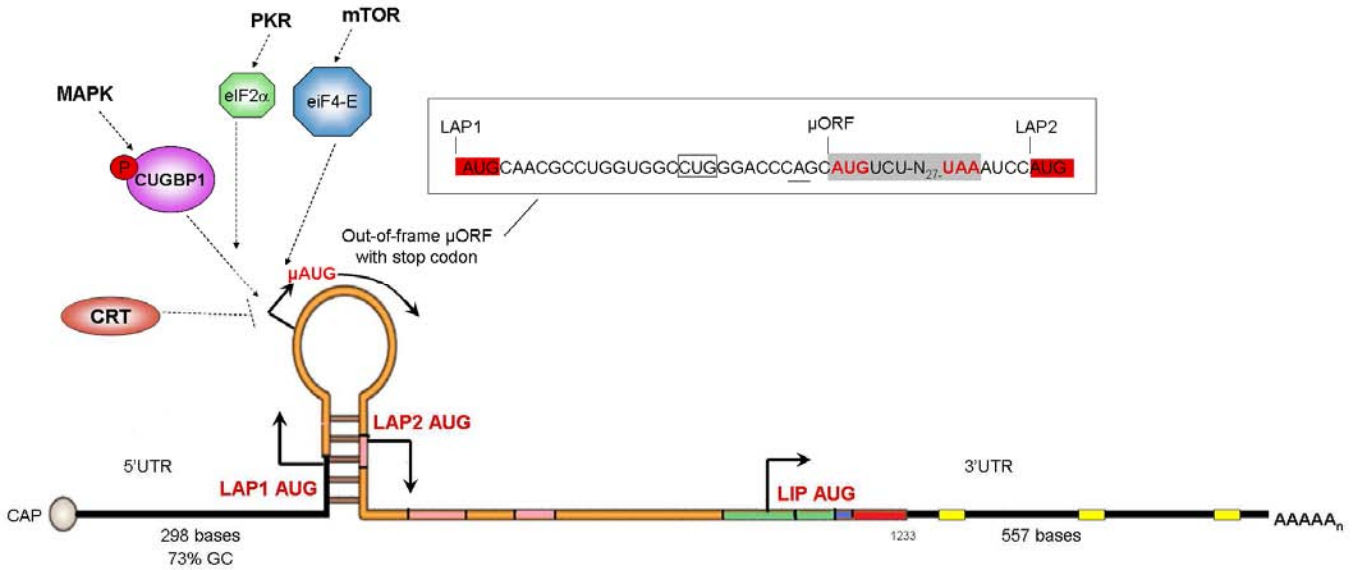
### **a) Production de trois isoformes protéiques distinctes**

La traduction de l'ARNm *C/EBPβ* génère trois isoformes protéiques distinctes (Figure 15) : LAP1 ou LAP\* (Liver Activating Protein) d'un poids moléculaire de 44 kDa, LAP2 ou LAP de 42 kDa et LIP (Liver Inhibitory Protein) de 20 kDa, LAP 2 étant l'isoforme la plus communément exprimée dans les cellules eucaryotes (130) (Figure 14).

La présence, sur l'ARNm *C/EBPβ*, de trois codons d'initiation de la traduction (AUG) en phase permettrait d'expliquer la production de ces trois isoformes. En effet, ces codons, localisés dans un contexte de Kozak favorable, seraient utilisés de manière alternative lors de l'initiation de la traduction (130-133). Une autre hypothèse a été cependant proposée par deux équipes distinctes: la petite isoforme serait générée suite à un clivage protéolytique des formes pleines tailles (134-135). En insérant toutefois, de manière artificielle, une séquence de Kozak entre le 2<sup>ème</sup> et le 3<sup>ème</sup> codon d'initiation, Calkhoven CF *et al.* (136). ont démontré qu'une nouvelle isoforme était produite. Cette dernière expérience a ainsi permis de privilégier la théorie de l'initiation alternative de la traduction définie par les différents codons d'initiation (136).

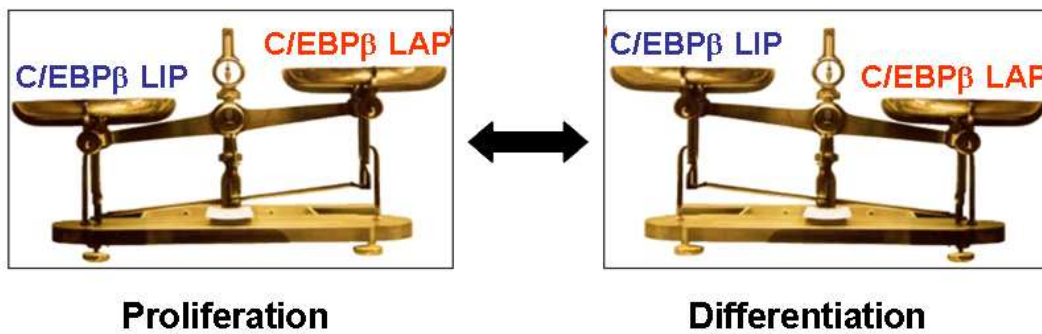
Il faut noter la présence, entre le 1<sup>er</sup> et le 2<sup>ème</sup> codon d'initiation de la traduction (LAP1 AUG et LAP2 AUG), d'un petit cadre de lecture ouvert ( $\mu$ ORF, Upstream Open Reading Frame), qui n'est pas en phase avec les 3 autres codons d'initiation de la traduction de *C/EBPβ* (Figure 16). Lorsque cette  $\mu$ ORF est traduite, la ré-initiation de la traduction au niveau du 2<sup>ème</sup> codon d'initiation (LAP2 AUG) n'est pas possible (le codon de terminaison de la  $\mu$ ORF étant trop proche du 2<sup>ème</sup> codon d'initiation), alors qu'elle est effective au niveau du dernier codon (LIP AUG). Ceci favorise ainsi la production de l'isoforme tronquée LIP, au dépend de l'isoforme LAP2 (137). Dans la situation inverse, LAP2 sera produite, par initiation alternative ou par ré-initiation immédiate de la traduction, au dépend de l'isoforme tronquée LIP (136, 138). La génération de souris mutées au niveau de cette  $\mu$ ORF a permis de prouver son rôle puisque l'élimination du codon d'initiation de la  $\mu$ ORF abolit l'expression de l'isoforme LIP (139).





**Figure 15: Régulation traductionnelle de C/EBPβ: production de 3 isoformes protéiques**

La production de 3 isoformes de C/EBPβ s'explique par l'utilisation alternative de 3 codons d'initiation de la traduction distincts. La présence d'une μORF localisée entre les 1<sup>er</sup> et 2<sup>ème</sup> codons d'initiation (LAP1 AUG et LAP2 AUG) permet de moduler la production respective des 3 isoformes. Le codon d'initiation de la μORF est dans un contexte favorable à la traduction puisqu'il est précédé d'une séquence de Kozac et d'un site CUG ciblé par des protéines régulatrices de la traduction (Schéma réalisé à partir de l'ensemble des données bibliographiques actuelles).



**Figure 16: Impact du ratio LAP/LIP sur le devenir cellulaire.**

Lorsque l'isoforme LIP est moins exprimée que les isoformes LAP, la cellule est engagée vers une voie de différenciation. Lorsque l'isoforme LIP est plus exprimée que LAP, la cellule est engagée dans le processus de prolifération (Schéma réalisé à partir des données bibliographiques actuelles).

Le contrôle de la traduction des différents isoformes par la  $\mu$ ORF fait également intervenir des protéines de liaison aux ARNm qui, selon les conditions cellulaires, favoriseront ou non la traduction de telle ou telle isoforme. Le groupe de Timchenko L.T. (140-141) a ainsi identifié deux protéines de liaison aux ARNm, CUGBP1 (CUG Binding Protein 1) et la calreticuline (CRT), capables de se lier aux ARNm *C/EBP $\beta$*  au niveau de la boucle présente dans la partie 5' NT (Figure 15). Ces deux protéines ont des rôles antagonistes sur la traduction des isoformes de *C/EBP $\beta$* . En effet, la calreticuline (CRT), en se liant à cette boucle, réprime l'expression des isoformes de *C/EBP $\beta$*  (140) alors que CUGBP1 va induire une augmentation de la production de LIP (141). La compétition de ces 2 protéines pour un même site suggère que CUGBP1, une fois activée par phosphorylation, prend la place de CRT et en s'associant avec les sous unités du facteur d'initiation de la traduction eIF2 $\alpha$ , permet l'association de l'ARNm aux polysomes et la traduction de l'isoforme LIP. Une étude complémentaire menée par Baldwin *et al.* (142) précise que la voie des MAP Kinases pourrait être à l'origine de la phosphorylation de CUGBP1 (142) (Figure 15).

Les voies de signalisation impliquées dans l'activation de la traduction vont-elles aussi influencer la production de telle ou telle isoforme. Par exemple, Calkhoven *et al.* (136) rapportent que certains facteurs initiateurs de la traduction tels que eIF2 et eIF4-E favorisent l'expression de la forme tronquée LIP suite à leur activation par les protéines mTOR et PKR (136) (Figure 15).

#### *b) Fonctions distinctes des isoformes LAP et LIP*

Les effets biologiques de *C/EBP $\beta$*  (détaillés plus loin : paragraphe II.C.1) sont très étroitement liés au ratio existant entre ces isoformes. Il est communément admis que les formes pleines tailles (LAP1 et LAP2) engagent la cellule sur la voie de la différenciation et l'arrêt du cycle cellulaire alors que la forme tronquée LIP induit le cycle cellulaire (Figure 16).

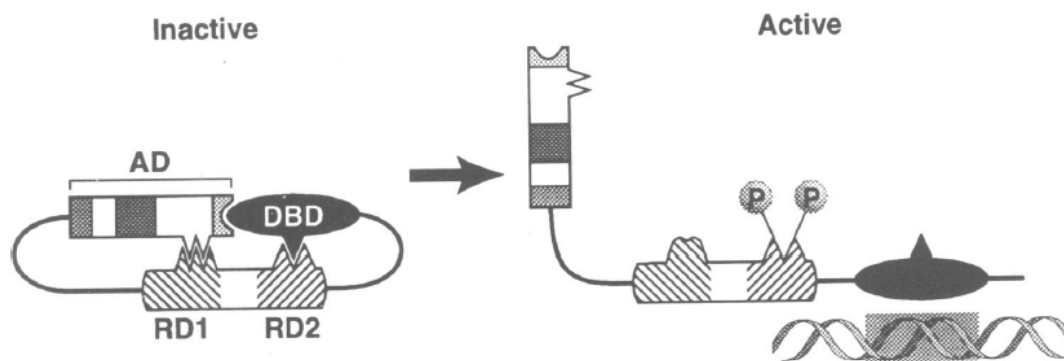
La génération, d'une part, de souris mutées au niveau du codon d'initiation de la  $\mu$ ORF du gène *C/EBP $\beta$*  (*C/EBP $\beta$  <sub>$\mu$ ORF</sub>*) et d'autre part, de souris transgéniques dans lesquelles le locus du gène *C/EBP $\beta$*  a été remplacé par la région codante de l'isoforme LIP (*C/EBP $\beta$ <sub>LIP</sub>*), a contribué à mieux comprendre les effets d'une variation du ratio LAP/LIP sur la physiologie (139).



Comme précisé précédemment (paragraphe II.B.3.a), la perte du codon d'initiation de la  $\mu$ ORF dans les souris C/EBP $\beta_{\mu$ ORF abolit l'expression de l'isoforme LIP. L'absence d'expression de LIP résulte, après hépatectomie partielle, à une augmentation de la phase inflammatoire aiguë du foie, à une répression de l'expression des gènes codant des protéines du cycle cellulaire et à un défaut d'entrée en cycle des hépatocytes (139). Dans les souris C/EBP $\beta_{LIP}$ , l'expression exclusive de l'isoforme LIP rétablit l'expression des gènes codant des protéines du cycle cellulaire et l'entrée des hépatocytes en phase S (139). L'ensemble de ces données confirment donc le rôle de cette petite isoforme dans la prolifération. Cependant, les souris C/EBP $\beta_{LIP}$  présentent une différenciation accrue des ostéoblastes alors que les souris C/EBP $\beta_{\mu$ ORF en sont dépourvues (139). Les isoformes LAP, les seules exprimées dans les souris C/EBP $\beta_{\mu$ ORF, apparaissent donc comme des répresseurs de la différenciation ostéoblastique alors que LIP agit en tant qu'activateur de la différenciation dans les souris C/EBP $\beta_{LIP}$ . Ces deux modèles murins prouvent ainsi que l'abondance de chacune des isoformes de C/EBP $\beta$  va induire des processus différents selon le type cellulaire et les signaux intracellulaires ou extracellulaires. Il est généralement admis que LIP est un répresseur général de la transcription et que LAP1/LAP2 sont des transactivateurs. LIP pourrait ainsi rentrer en compétition avec les isoformes longues au niveau de promoteurs de gènes cibles communs et avoir un rôle de dominant négatif (139). Néanmoins, il semblerait aujourd'hui que LIP puisse être un transactivateur dans certaines situations de prolifération, en ciblant par exemple des éléments C/EBP dans les promoteurs de gènes codant des protéines du cycle cellulaire (143), mais aussi dans la différenciation comme, dans les ostéoblastes en interagissant avec le facteur de transcription ostéoblastique Runx2 (144).

### **3. Régulation post-traductionnelle**

Comme introduit dans le paragraphe II.A, l'activité transcriptionnelle de C/EBP $\beta$  dépend de sa conformation et des dimères fixés sur le promoteur de ses gènes cibles. Ces paramètres sont contrôlés en amont par des combinaisons de modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, l'acétylation, la sumoylation et la méthylation (Figure 18). Ces modifications vont jouer un rôle crucial dans la régulation de la liaison de C/EBP $\beta$  à l'ADN, son activité transcriptionnelle, ses interactions protéines-protéines et sa localisation subcellulaire.



**Figure 17: Modélisation de la structure de C/EBP $\beta$  en fonction de son état de phosphorylation.**

C/EBP $\beta$  passe d'une conformation fermée (forme inactive) à une conformation ouverte (forme active) suite à des phosphorylations. Dans sa forme inactive, les domaines répresseurs (RD) interagissent avec les domaines de liaison à l'ADN et les domaines transactivateurs. Les phosphorylations des différents domaines, ici des domaines répresseurs, permettent l'activation de C/EBP $\beta$ . (D'après Williams et al.) (113).

a) Phosphorylation de C/EBP $\beta$

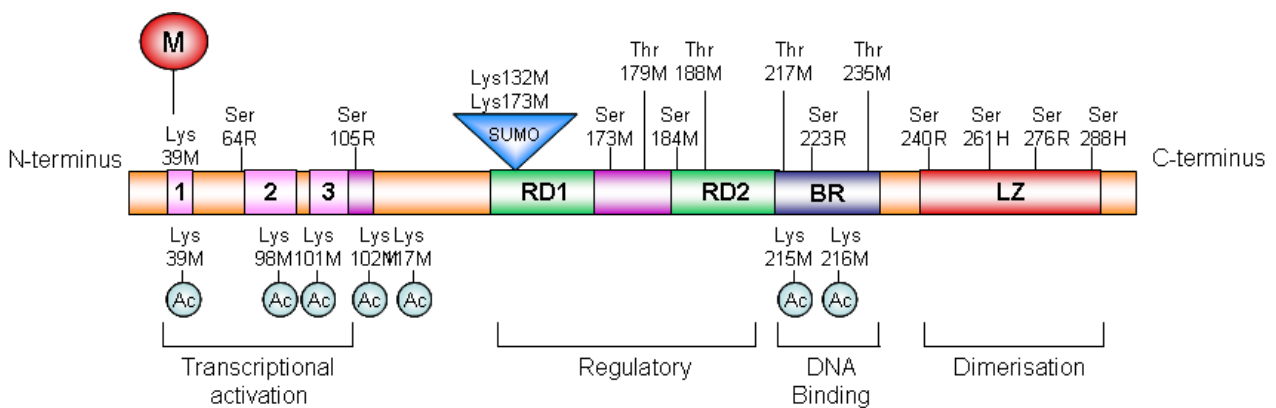
En l'absence de stimulus, C/EBP $\beta$  est maintenu sous une forme inactive via ses domaines régulateurs négatifs RD1 et RD2, qui bloquent stériquement les domaines de transactivation et de liaison à l'ADN (Figure 17: forme inactive). Des phosphorylations des différents domaines de C/EBP $\beta$  vont permettre son ouverture et la libération de ses domaines de transactivation, de localisation nucléaire et de liaison à l'ADN favorisant ainsi son activité transcriptionnelle (Figure 17: forme active).

Différents types de phosphorylation ont été répertoriés (Figure 18):

-Au niveau du domaine basique de liaison à l'ADN (BR), la Thr235 serait la cible des protéines kinases ERK et PKC, cette phosphorylation induisant une activation de l'activité transcriptionnelle de C/EBP $\beta$  (145-146) (Figure 18).

-Au niveau du domaine de dimérisation à glissière à leucine (LZ), la phosphorylation de résidus sérines a été également décrite. La Ser276 est la cible de la Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent protein kinase II (CAM kinase II) chez la souris alors que les Ser261 et Ser288 celles de la PKC ou de la PKA chez l'Homme (147). Ces phosphorylations sembleraient avoir des effets différents. En effet, la phosphorylation de Ser261 augmenterait la translocation de C/EBP $\beta$  au noyau alors que la phosphorylation de la Ser 288 inhiberait la liaison de C/EBP $\beta$  sur l'ADN *in vitro* (147). Chez le rat, C/EBP $\beta$  est également phosphorylée sur sa partie N-terminale. Suivant le stimulus extracellulaire, la Ser105 est phosphorylée par la PKC, la PKA ou encore la ribosomal S6 kinase (RSKp90) entraînant, dans tous les cas, une augmentation de l'activité transcriptionnelle de C/EBP $\beta$  (148) (Figure 18).

-Les domaines répresseurs (RD), riches en résidus sérines et thréonines, font aussi l'objet de nombreuses phosphorylations. Elles ont été rapportées chez la souris au niveau des résidus Thr188 (189 chez le rat) et Thr179 mais aussi au niveau du résidu Ser184 (149). Le premier résidu, localisé dans le domaine RD2 (Figure 18), est la cible de la voie des MAP Kinases, plus précisément de la kinase ERK2, et induit une augmentation de l'activité transcriptionnelle de C/EBP $\beta$  (149). Les deux autres résidus, Thr179 et Ser184, sont les cibles de la kinase GSK3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ) (149). Leurs phosphorylations libèrent le domaine DBD permettant la liaison de C/EBP $\beta$  à l'ADN. Ces résidus peuvent, de surcroît, être phosphorylés simultanément (Thr188 avec Ser184 ou Thr179) induisant soit une activation soit une inhibition de l'activité transcriptionnelle de C/EBP $\beta$  (149).



**Figure 18: Modifications post-traductionnelles de C/EBP $\beta$ .**

Plusieurs types de modifications post-traductionnelles vont moduler l'activité de C/EBP $\beta$  telles que des phosphorylations, des acétylations, des méthylations ou sumoylations. Les résidus modifiés par phosphorylation sont notés au dessus des traits, les lysines acétylées sont notées en dessous par des cercles bleus clairs, la méthylation par un rond rouge et la sumoylation par un triangle bleu foncé. Les résidus modifiés ainsi que l'espèce (M: mouse, R: Lapin ou H: Humain) dans laquelle ces modifications ont été décrites sont indiqués (D'après Zahnow et al.)(110).

En effet, l'activation de ERK2 et GSK3 $\beta$  va, durant l'adipogénèse, permettre une dimérisation et une augmentation de la liaison de C/EBP $\beta$  sur le promoteur des gènes tardifs de l'adipogénèse (C/EBP $\alpha$  ou PPAR $\gamma$ ) alors que, durant la réponse adaptative et innée, ces phosphorylations vont empêcher la fixation de C/EBP $\beta$  sur le promoteur des gènes pro-inflammatoires codants l'IL-6 et la lipocalin-2 (149) (Figure 18).

Ces phosphorylations entraînent des changements de conformation qui vont également libérer des cystéines qui, après oxydation, vont permettre de former des ponts disulfures entre protéines ce qui va stabiliser les dimères et favoriser l'activité transcriptionnelle de C/EBP $\beta$  (150).

#### *b) Les autres modifications post-traductionnelles de C/EBP $\beta$*

L'acétylation peut aussi réguler l'activité transcriptionnelle de C/EBP $\beta$ . Là encore, le profil d'acétylation va induire une affinité de C/EBP $\beta$  différente vis-à-vis de ses promoteurs cibles. Par exemple, les facteurs de croissance stimulent l'acétylation de C/EBP $\beta$  sur la Lys39 (151), localisée en N-Terminal, augmentant sa capacité à transcrire le gène *Fos* et la désacétylation de cette lysine par l'histone désacétylase1 (HDAC1) diminue l'activité transcriptionnelle de C/EBP $\beta$  durant l'adipogénèse (152). En revanche, l'acétylation de la Lys 215 ou 216 diminue la liaison de C/EBP $\beta$  sur le promoteur de la protéine de liaison à l'ADN inhibitrice ID1 mais sa désacétylation par HDAC1 restaure son activité transcriptionnelle (153) (Figure 18).

La Lys39 n'est pas seulement un substrat d'acétylation mais peut aussi servir de cible de méthyltransferases. L'histone lysine N-méthyltransferase, 5H3 lysine-9-specific 3 (G9a) a, en effet, été identifiée pour interagir directement avec la Lys39 de la région N-terminale de C/EBP $\beta$  (154). Cette interaction induit une méthylation de la Lys39 et la répression de l'activité transcriptionnelle de C/EBP $\beta$ . La phosphorylation de C/EBP $\beta$ , perturbant l'interaction avec G9a, semble alors empêcher cette méthylation. Cette Lys39 est donc importante dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de C/EBP $\beta$ , cependant elle n'est pas conservée chez l'Homme (154) (Figure 18).



Fonction affectée	Défaut observé	Références
Système hépatique	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Apparition d'une hypoglycémie souvent létale.</li> <li>-Absence de néoglucogenèse</li> <li>-Diminution du taux de glucose et de lipides dans le sang</li> <li>-Défaut de régénération du foie après hépatectomie partielle</li> <li>-Diminution de certaines enzymes du tissu adipeux blanc (acétylCoA, carboxylase, Fatty acid synthase) entraînant un défaut du métabolisme lipidique</li> <li>-Déficience du processus de thermogénèse dans le tissu adipeux brun</li> </ul>	(155);(156); (157);(158); (159)
Compartiment hématopoïétique et lymphoïde	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Défaut de différenciation et d'activation des macrophages due à un défaut de production de NO synthase résultant à une grande sensibilité aux pathogènes <i>Candida albicans</i>, <i>Listeria monocytogenes</i> et <i>Salmonella typhi</i>.</li> <li>-Augmentation de la réponse immune de type Th2</li> <li>-Diminution de la réponse immune de type Th1</li> <li>-Diminution et blocage de la différenciation des lymphocytes B au stade pré-B dans la moelle osseuse</li> <li>-Splénomégalie, lymphadénopathie et plasmocytose due à une prolifération accrue des lymphocytes B dans les organes lymphoïdes périphériques</li> <li>-Défaut de granulopoïèse: mort des neutrophiles par apoptose</li> <li>-Surexpression d' IL-6</li> <li>-Symptômes similaires à la maladie de Castleman (hypertrophie ganglionnaire angiofolliculaire)</li> </ul>	(160);(161); (162);(163); (164)
Système osseux	Délai de formation des os due à une absence de maturation des chondrocytes et de différenciation des ostéoblastes	(165)
Appareil reproducteur	<ul style="list-style-type: none"> <li>Stérilité due à un défaut de différenciation des cellules de la granulosa</li> <li>perte de l'activité sécrétrice et de la production des protéines du lait</li> <li>Défaut de croissance des canaux lactifères</li> </ul>	(166)
Peau	<ul style="list-style-type: none"> <li>Défaut de différenciation des kératinocytes de l'épiderme</li> <li>Diminution de l'expression des gènes codant la kératine 1 et 10</li> <li>Absence de stratification de la peau</li> </ul>	(167)

**Tableau 3: Phénotype des souris C/EBP $\beta$ <sup>-/-</sup>**

Enfin, C/EBP $\beta$  peut être sumoylé et sa sumoylation va aussi affecter son activité transcriptionnelle. Cette modification post-traductionnelle réversible implique la liaison covalente d'une ou plusieurs protéines SUMO, constituées d'ubiquitines, sur une lysine acceptrice. Un motif de 5 acides aminés contenant un résidu lysine, présent sur le domaine RD1 de C/EBP $\beta$ , constitue un site covalent de liaison pour les protéines SUMO1 et SUMO2/3 (168). Dans les cellules T, la sumoylation de C/EBP $\beta$  entrainerait sa relocalisation au niveau de l'hétérochromatine péricentrique ce qui empêche, notamment, la répression du promoteur du gène Myc mais ne modifie pas l'activation de la transcription du gène codant l'IL4 permettant la prolifération T (110, 169) (Figure 18).

### **C. C/EBP $\beta$ , un acteur de l'oncogénèse**

Plusieurs études menées sur des souris génétiquement modifiées, invalidées pour le gène C/EBP $\beta$ , ont permis d'une part, de démontrer le rôle de ce facteur de transcription dans le développement de divers organes(110) Ces études ont, d'autre part, révélé l'implication de ce facteur dans l'oncogénèse puisque les souris C/EBP $\beta$ <sup>-/-</sup> sont complètement réfractaires au développement de tumeurs, notamment de la peau, après exposition à divers carcinogènes (170).

#### **1. C/EBP $\beta$ dans les cancers solides**

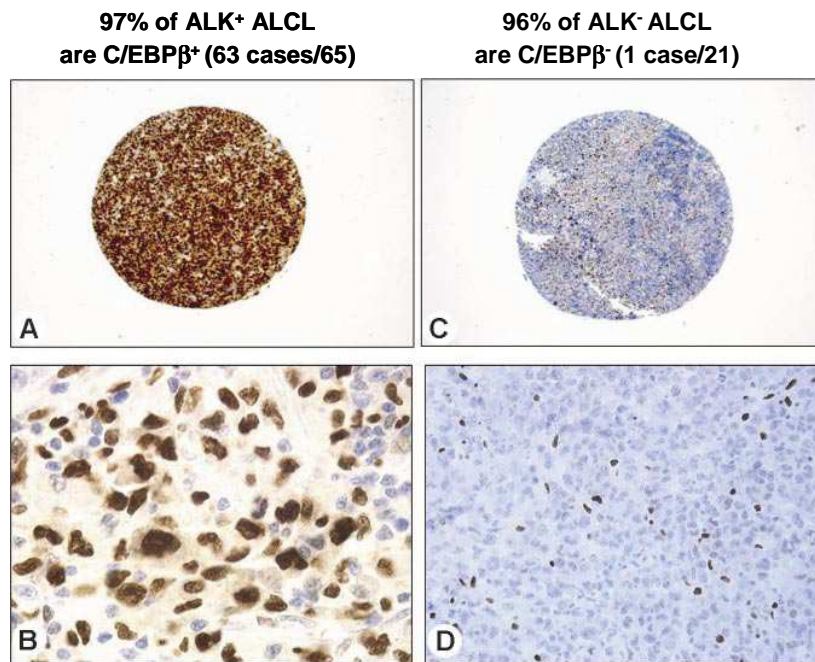
Plusieurs groupes ont en effet décrit que la diminution de l'expression de C/EBP $\beta$  induisait un ralentissement de la tumorigénèse alors que l'augmentation de son expression était le plus souvent corrélée à la tumorigénèse. Zhu *et al.* (170) ont par exemple montré que les souris C/EBP $\beta$ <sup>-/-</sup> étaient complètement réfractaires au développement de tumeurs de la peau normalement induites par divers carcinogènes. De même, dans des souris transgéniques présentant un génotype v-HA-ras, l'absence de C/EBP $\beta$  résulte en une diminution significative de la tumorigénèse (170). Par ailleurs, des souris surexprimant l'isoforme LIP au niveau des glandes mammaires développent une hypertrophie mammaire révélatrice d'une tumorigénèse (171). De manière similaire, chez l'Homme, une augmentation d'expression de C/EBP $\beta$  est retrouvée dans de nombreux cancers solides dont les cancers du sein (170) et des ovaires (172), les cancers gastriques (173) et colorectaux (174), les cancers rénaux (175), les gliomes (176) et les mélanomes (177).



Dans la majorité de ces cancers, les 3 isoformes de C/EBP $\beta$ , LAP1, LAP2 et LIP sont exprimées. Plusieurs équipes rapportent cependant que l'expression de LIP semblerait être induite lors de la transformation cellulaire et favoriserait la prolifération, LAP étant l'isoforme majoritaire dans les cellules non néoplasiques (178). Néanmoins, le rôle de LIP dans la tumorigenèse n'est pas clair. Des études contradictoires ont, en effet, rapporté que LIP était surexprimé dans certaines tumeurs de stades tardifs (172, 174) alors qu'il n'est absolument pas détecté dans d'autres types de tumeurs comme les mélanomes (177).

Malgré ces disparités, l'expression de C/EBP $\beta$  s'avère être un bon marqueur diagnostic ou pronostic de certaines tumeurs. Par exemple, des marquages immunohistochimiques réalisés dans les gliomes et dans les cancers ovariens, colorectaux et rénaux ont permis d'associer une expression de C/EBP $\beta$  avec des cancers de stades avancés malins (172, 174-176). Parallèlement, l'expression de C/EBP $\beta$ , observée dans très peu de cas d'hépatocarcinomes, serait associée à des tumeurs de bon pronostic présentant une progression tumorale ralentie (179). Dans le cas des cancers gastriques, la forte intensité du marquage C/EBP $\beta$  permet de distinguer les tumeurs atypiques et intestinales des autres types de tumeurs (173).

La dernière particularité de ce facteur de transcription est enfin d'être impliqué tout au long du développement tumoral, depuis l'émergence de la tumeur jusqu'à la formation de métastases en passant par la transition épithélio-mésenchymateuse et l'inflammation. En effet, en surexprimant l'isoforme LAP2 dans une lignée cellulaire mammaire saine, Bundy *et al.* (180) ont démontré que LAP2 était capable de transformer les cellules (formation de foci et perte de l'inhibition de contact) et d'induire une délocalisation de la E-Cadherine et une réorganisation du cytosquelette d'actine associée à une acquisition de filaments mésenchymateux (180). De la même manière, dans les cellules neuronales, C/EBP $\beta$  est considéré comme un facteur de transcription majeur de la transition épithélio-mésenchymateuse qui en collaboration avec STAT3 entrainerait un arrêt de différenciation neuronale et l'acquisition d'une morphologie fibroblastique suite à l'expression de marqueurs mésenchymateux (181). Dans ces deux types cellulaires, C/EBP $\beta$  favorise également, via la mise en place du réseau mésenchymateux, la perte d'adhésion cellulaire attribuant aux cellules un caractère invasif. C/EBP $\beta$  augmente cette capacité d'invasion via la transcription de protéines connues pour dégrader la matrice extracellulaire, comme des métalloprotéases (MMP-1, MMP-13) (182-183) ou la collagénase (184).



**Figure 19: Expression de C/EBP $\beta$  dans les tumeurs humaines de LAGC ALK<sup>+</sup> et ALK<sup>-</sup>.**

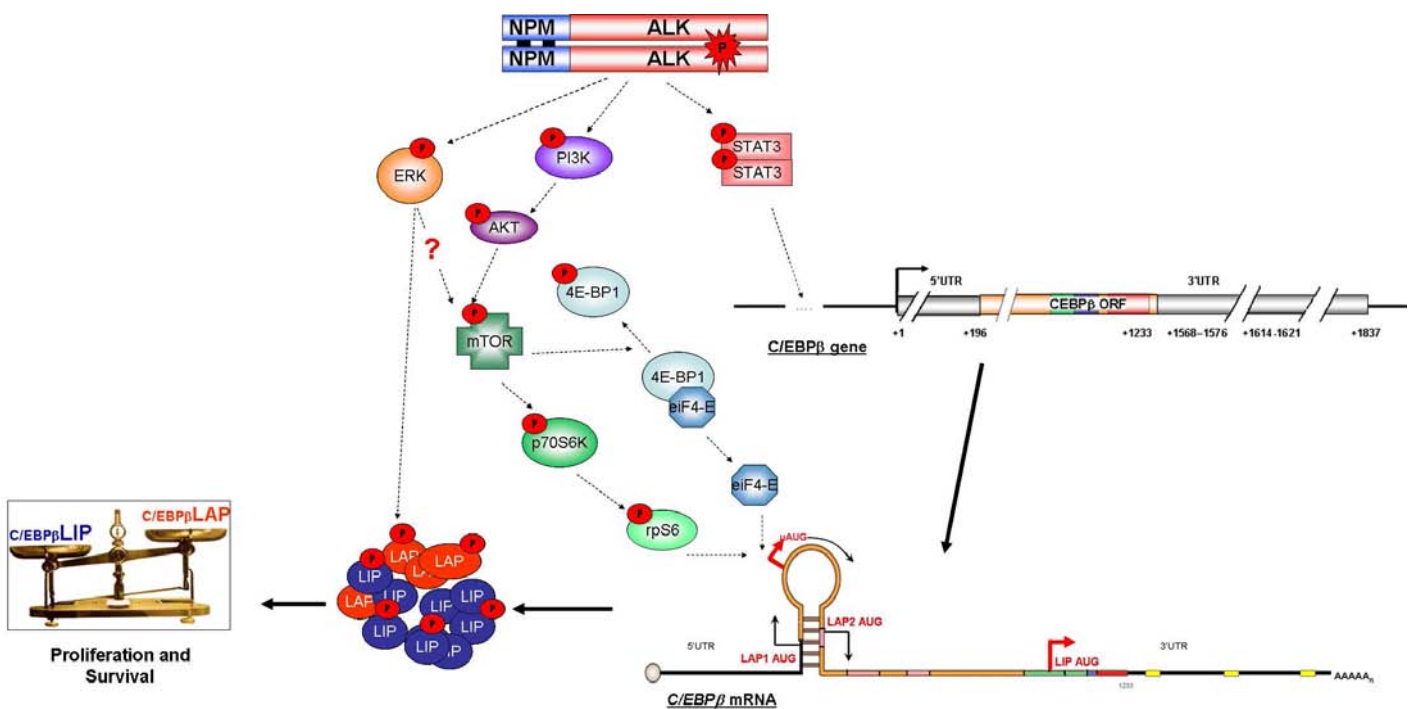
Analyse par immunohistochimie d'une banque de tissus (TMA), réalisée à partir de biopsies de tumeurs humaines de LAGC ALK<sup>+</sup> et ALK<sup>-</sup>. Le marquage a été réalisé avec un anticorps dirigé contre C/EBP $\beta$ . Au dessus, sont indiqués les pourcentages de cas exprimant C/EBP $\beta$  dans chaque type de tumeurs (d'après Lamant *et al.*) (63).

Ces évènements aboutissent à la formation de métastases dans lesquelles C/EBP $\beta$  est surexprimé et induit l'expression de gènes anti-apoptotique (*Bcl-2* et *Bcl-xL*) (185) mais aussi des marqueurs caractéristiques des métastases (gène *C4.4A*) (186). C/EBP $\beta$  participe, enfin, au phénomène de résistance des tumeurs face aux drogues, en induisant par exemple la transcription de gènes codant les protéines impliquées dans les mécanismes du MDR (multi-drug resistance) (187).

## **2. C/EBP $\beta$ dans les LAGC**

Alors que C/EBP $\beta$  est surexprimé dans de nombreux types de cancers solides, sa surexpression dans les hémopathies malignes est très rare. En effet, parmi 250 échantillons de cellules lymphoïdes saines, de lymphomes primaires et de lignées de lymphomes (lymphomes B, T ou hodgkiniens) testés pour l'expression de C/EBP $\beta$ , seul les LAGC ALK<sup>+</sup> se sont révélés positifs dans la quasi-totalité des cas (188). Ainsi, les LAGC constituent une des rares hémopathies malignes avec le myélome multiple (189) et les lymphomes folliculaires associés à la translocation t (14;18) (190) à surexprimer le facteur de transcription C/EBP $\beta$ .

Une première étude du transcriptome des LAGC, réalisée au laboratoire par Lamant *et al.* (63) (citée dans le paragraphe I.E.2.a), a révélé que les taux d'ARNm C/EBP $\beta$  sont de 2 à 5 fois plus importants dans les tumeurs ALK<sup>+</sup> que dans les tumeurs ALK<sup>-</sup>. De par l'importante significativité de cette surexpression ( $p < 1.10^{-7}$ ), C/EBP $\beta$  figure parmi les quatre gènes les plus discriminants entre ces deux types de tumeurs. Des expériences d'immunohistochimie, réalisées sur des banques de tissus (tissue microarrays, TMA) comportant 86 biopsies de LAGC, ont permis de valider ces données au niveau protéique. En effet, 97% des tumeurs de LAGC ALK<sup>+</sup> expriment la protéine C/EBP $\beta$  contre seulement 4% des tumeurs ALK<sup>-</sup> (63) (Figure 19). Ces résultats ont été confirmés par une analyse de transcriptome réalisée sur des lignées de LAGC conditionnelles pour l'expression de NPM-ALK ou de cellules traitées ou non par un inhibiteur de ALK (64).



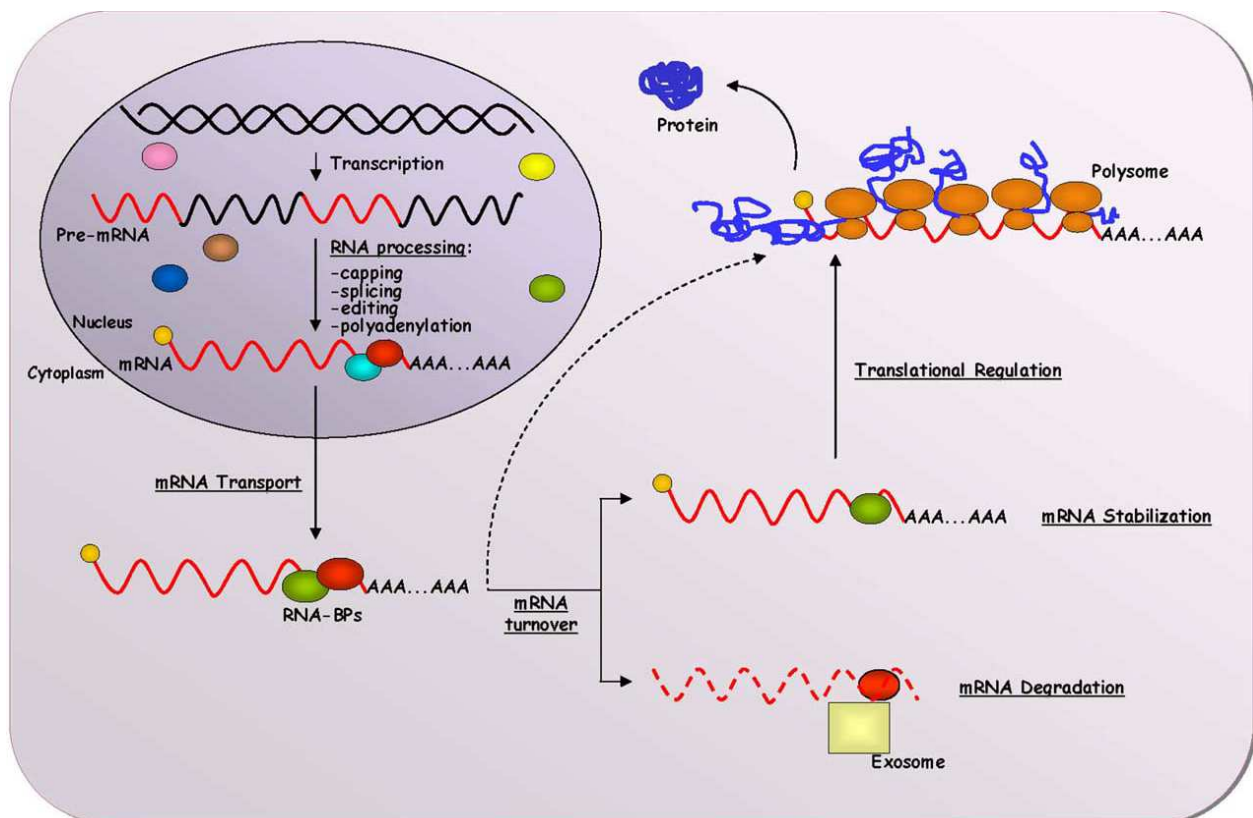
**Figure 20: Régulation de l'expression du gène *C/EBPβ* dans les LAGC ALK<sup>+</sup>.**

Dans les LAGC, l'expression de *C/EBPβ* est contrôlée au niveau transcriptionnel et traductionnel, favorisant l'expression de l'isoforme oncogénique LIP qui induit la prolifération et la survie des LAGC. (Schéma réalisé d'après l'ensemble des données bibliographiques actuelles).

Plusieurs travaux ont ensuite permis de déterminer les voies de signalisation, ainsi que les facteurs de transcription et de traduction, activés par NPM-ALK à l'origine de la régulation de l'expression de *C/EBPβ* dans les LAGC. Deux groupes ont, d'une part, décrit que le facteur de transcription STAT3, activé par NPM-ALK, était capable d'induire la transcription du gène *C/EBPβ* (64, 191) (Figure 20). Quintanilla-Martinez *et al.* (188) ont, d'autre part, rapporté que l'inhibition de l'activité de ALK modulait préférentiellement l'expression de l'isoforme oncogénique LIP, les taux des isoformes LAP, notamment l'isoforme LAP2, ne variant pas (188). D'autre part, il s'est avéré qu'un traitement à la rapamycine, un inhibiteur spécifique de mTOR, pouvait induire également une diminution de l'expression de l'isoforme LIP (192). Ainsi, étant donné que NPM-ALK était capable d'activer la voie AKT-mTOR (54), un modèle de régulation de la traduction de l'isoforme LIP dans les LAGC a été imaginé. Dans ce modèle, l'activation de mTOR par NPM-ALK favoriserait d'une part la disponibilité du facteur d'initiation de la traduction eIF-4E (Figure 20) et d'autre part, l'activation des protéines ribosomales rpS6. Une fois activées, ces protéines induiraient la traduction préférentielle de l'isoforme LIP (54, 192) (Figure 20). Piva *et al.* (64) avaient cependant décrit que l'expression de *C/EBPβ* était aussi dépendant de la voie ERK1/2. Cependant, l'implication de cette voie a été très récemment controversée. En effet, en inhibant l'activité de ces kinases, Anastasov *et al.* (191) montrent que les voies ERK1/2 n'induisent pas l'expression de LIP mais par contre sont impliquées dans sa phosphorylation. Ainsi ERK1/2 pourrait moduler l'activité transcriptionnelle de *C/EBPβ* dans les LAGC (191) (Figure 20).

Il est aujourd'hui clair que *C/EBPβ* joue un rôle majeur dans la pathogénie des LAGC. En effet, l'utilisation de cellules de LAGC ALK<sup>+</sup> déplétées en *C/EBPβ* ou encore en xéno greffant des cellules de fibroblastes murins WT ou *C/EBPβ*<sup>-/-</sup> exprimant NPM-ALK, Piva *et al.* (64) ont montré que *C/EBPβ* était nécessaire à la survie et à la croissance tumorale des cellules ALK<sup>+</sup> (64). Par ailleurs, l'utilisation de shRNA dirigés contre l'ARNm *C/EBPβ* a permis de clairement démontrer que la perte d'expression de la protéine *C/EBPβ* dans les LAGC entraîne une diminution considérable de la viabilité cellulaire coïncidant avec un arrêt de prolifération en phase G1 associée à une augmentation de l'apoptose (191).





**Figure 21: Schéma simplifié de la régulation post-transcriptionnelle d'un gène.**

Les précurseurs des ARNm (ARNpm) sont maturés en ARNm dans le noyau. La maturation consiste en l'addition d'une coiffe en 5', d'une queue poly-A en 3', en l'excision des régions introniques (épissage) et en l'édition des ARNm. L'ARNm mature est ensuite exporté au cytoplasme où il subit les processus de stabilisation ou de dégradation ("turnover"). Si l'ARNm n'est pas dégradé, il est recruté aux niveau des polysomes pour y être traduit (d'après Lopez de Silanes I *et al.*) (193).

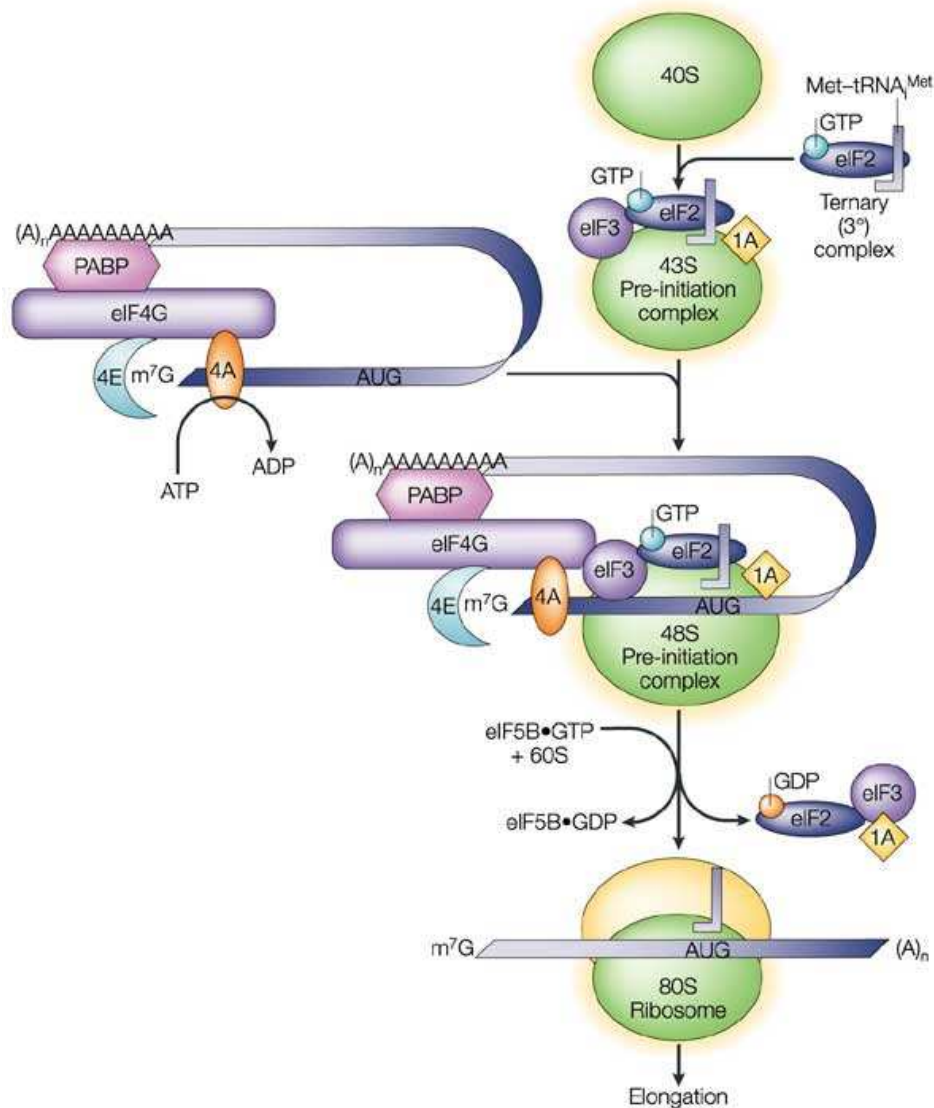
### **III. Régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique**

#### **A. Généralités**

Les ARNm sont des éléments centraux dans la transmission de l'information de l'ADN à la protéine. Les régulations post-transcriptionnelles constituent par conséquent une étape cruciale dans le contrôle de l'expression génique (194). Ces régulations englobent les étapes suivantes: la maturation du pré-ARNm, l'export nucléo-cytoplasmique de l'ARNm et la vérification de son intégrité moléculaire (surveillance de l'ARN), le contrôle de sa demi-vie, sa localisation subcellulaire (incluant son stockage) et son efficacité à être traduit en protéine (Figure 21).

Chacune de ces étapes doit être régulée de façon précise, car la moindre anomalie peut avoir des conséquences importantes sur l'expression du gène correspondant. Les mécanismes fondamentaux de cette régulation sont difficiles à étudier du fait de la présence de nombreux motifs structuraux (éléments *cis*) dans l'ARNm (195) et du nombre important de facteurs *trans*-régulateurs (RNA Binding Protein (RBP)s et petits ARNs non codants(miRNAs)) capables de s'associer à ces motifs.

Dans la suite de ce chapitre, je ne décrirai que les étapes de la régulation post-transcriptionnelle auxquelles je me suis intéressée au cours de ma thèse, à savoir celles qui, au niveau du cytoplasme, concernent le "devenir" des ARNm (stabilité/dégradation et efficacité de traduction).



**Figure 22: Les différentes phases de l'initiation de la traduction chez les eucaryotes.**

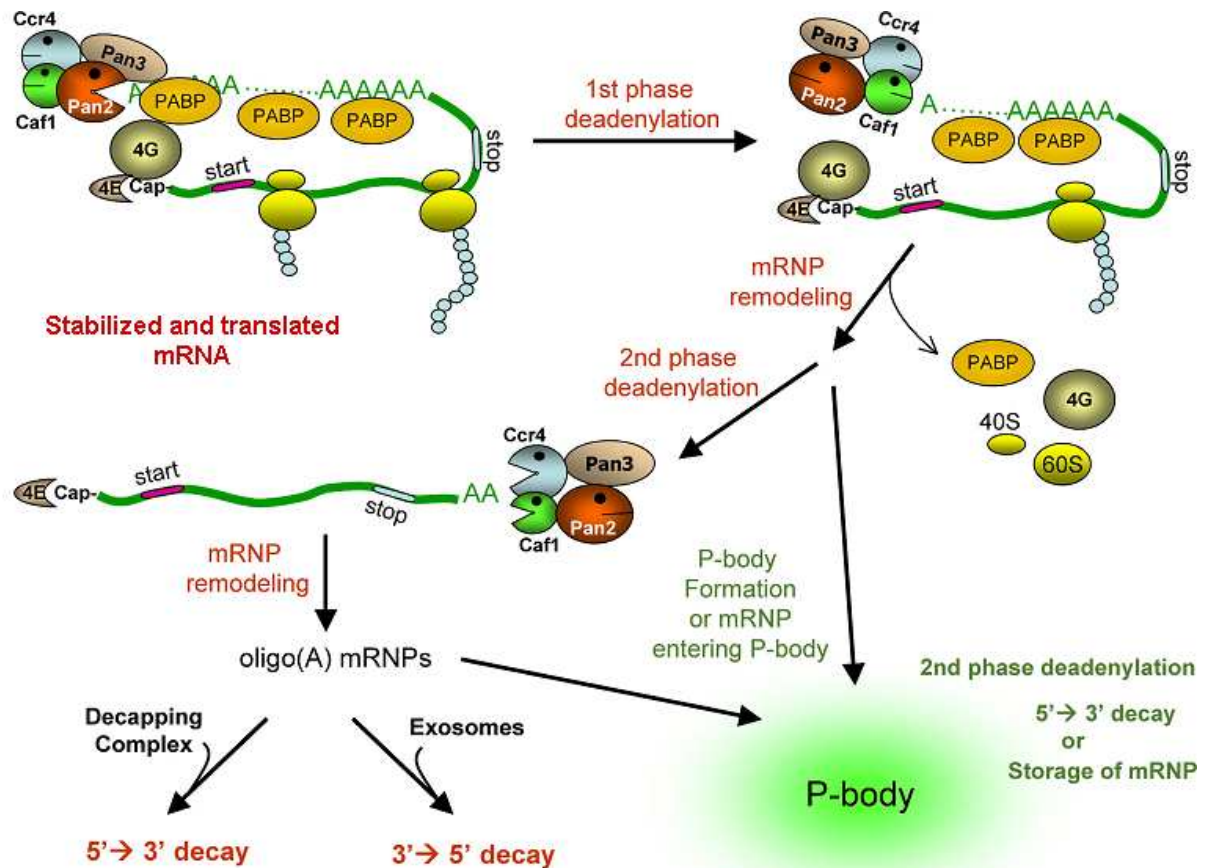
La phase d'initiation de la traduction pourrait se diviser en 3 étapes : premièrement, la formation spécifique du complexe de préinitiation 43S composé du complexe ternaire (Met-ARNt /eIf2) et de la sous-unité 40S, deuxièmement la liaison du complexe 43S à l'ARNm pour former le complexe de préinitiation 48S qui scanne le codon d'initiation AUG et troisièmement, la liaison de la sous-unité 60S pour former avec la sous-unité 40S le ribosome 80S (d'après Klann E *et al.*) (196).

## **1. L'initiation de la traduction**

Une fois exportés dans le cytoplasme, les ARNm sont en général engagés dans le processus de traduction, constitué de 3 étapes: l'initiation, l'élongation et la terminaison. L'étape limitante, la plus régulée, est l'étape d'initiation de la traduction. Même si différents types d'initiation de la traduction ont été décrits, les ARNm sont en général soumis à une initiation de la traduction dite "dépendante de la coiffe".

La phase d'initiation de la traduction fait intervenir dans un premier temps, la protéine d'échafaudage eIF4G, associée au facteur eIF4A, qui permet de faire la jonction entre la coiffe côté 5', via le facteur eIF4E lié directement à la coiffe, et la queue poly(A) côté 3' via la Poly-(A) Binding Protein (PABP). L'ensemble [eIF4E, 4A et 4G] constitue le complexe eIF4F. Par cet ensemble d'interactions, le transcrit prend une structure en boucle fermée où les deux extrémités de l'ARNm sont proches l'une de l'autre, favorisant ainsi le recyclage des sous-unités ribosomales pour un nouveau cycle de traduction. Le complexe ternaire, composé de l'ARNt chargé d'une méthionine et couplé au facteur eIF2, s'associe ensuite à la petite sous-unité ribosomale 40S ainsi qu'aux facteurs eIF3, eIF1, eIF1A et eIF5 pour former le complexe de préinitiation 43S. Le complexe de préinitiation sera recruté sur l'ARNm par l'interaction du facteur eIF3 avec le facteur eIF4G. Le complexe 43S va ensuite scanner l'ARNm dans le sens 5' vers 3' jusqu'à identifier le codon d'initiation AUG. Une fois le complexe de pré-initiation 43S lié de façon stable au codon AUG, l'ensemble donnera le complexe d'initiation 48S. L'association de la grande sous-unité 60S au complexe 48S donnera naissance au complexe final 80S, capable de catalyser la formation des premiers peptides et ainsi procéder à la phase d'élongation de la traduction (196) (Figure 22). Outre ce mécanisme dépendant de la coiffe, d'autres mécanismes d'initiation de la traduction indépendants de la coiffe existent tels que l'utilisation alternative des codons d'initiations, le saut de ribosomes qui passe au dessus de structures secondaires parfois longues et contenant de possibles codons d'initiations, ou encore la ré-initiation de la traduction sur un autre codon AUG après une première initiation au niveau d'un premier codon AUG (197).

L'initiation de la traduction est modulée par deux mécanismes de régulations majeurs. D'une part, une régulation "globale" incluant des modifications post-traductionnelles des facteurs d'initiation de la traduction, et d'autre part, des régulations plus spécifiques impliquant des complexes protéiques régulateurs (dont par exemple les AU-BPs : AU-binding proteins), et/ou des miARNs qui reconnaissent essentiellement des séquences présentes dans les régions 5' et/ou 3' non traduites (NT) de l'ARNm (196).



**Figure 23: Mécanisme général de dégradation des ARNm.**

La dégradation des ARNm débute en général par une première étape de déadénylation qui implique les protéines PAN2/3. Le raccourcissement de la queue poly(A) entraîne un décrochage des protéines liées en 3' de l'ARNm. A ce stade, l'ARNm subit une deuxième étape de déadénylation via les protéines Ccr4/Caf1 dans le cytoplasme ou dans les P-Bodies. La dégradation du corps de l'ARNm se fait ensuite, selon le sens 3'-5', grâce à des exonucléases contenues dans l'exosome ou, après décoiffage, dans le sens 5'-3' grâce à l'exonucléase XRN1. Ces deux dernières étapes peuvent avoir lieu dans le cytoplasme ou dans les P-bodies (d'après Zheng D *et al.*) (198).

## **2. Mécanisme général de dégradation des ARNm**

Outre son importance dans l'initiation de la traduction, la structure circularisée de l'ARNm lui confère une certaine stabilité en empêchant les déadénylases et les protéines de décoiffage d'atteindre les extrémités 5' et 3' NT. Ainsi, la dégradation des ARNm nécessite soit l'élimination de la coiffe ou de la queue poly(A), soit un clivage interne des ARNm par des endonucléases. Il s'avère néanmoins que la majorité des ARNm sont, dans un premier temps, dégradés par déadénylation. Cette première étape fait intervenir un couple de déadénylases, PAN2-PAN3, qui détache une centaine de nucléotides de la queue poly(A) de manière dépendante de la PABP (Figure 23). La queue poly(A) étant raccourcie, les protéines liées à la coiffe et à la queue poly(A) se dissocient, entraînant une ouverture de l'ARNm et permettant une deuxième étape de déadénylation via le couple de protéines CCR4/Caf1 ou via la déadénylase PARN. A ce stade, le corps de l'ARNm peut être dégradé dans le sens 3'-5' par les exonucléases des exosomes. Ces structures présentes dans le noyau et dans le cytoplasme, sont, en effet, constituées de 6 protéines à activité exoribonucléase (3' vers 5'). En plus de leur rôle au sein du cytoplasme, les protéines de l'exosome participent à la maturation des petits ARN non codants (snoRNA, snRNA, rRNA) mais aussi à la dégradation des ARNm mal épissés, présentant des défauts de synthèse en 3' ou encore mal associés aux mRNPs. Une fois, le corps de l'ARNm dégradé dans le sens 3'-5', la coiffe est dégradée par la protéine DcpS (scavenger decapping enzyme) (199). Si l'ARNm n'est pas engagé dans les exosomes, il est dégradé dans le sens 5'-3', par l'exonucléase XRN1 après dégradation de la coiffe par les protéines DCP1/DCP2. Ces deux dernières étapes peuvent avoir lieu dans le cytoplasme ou dans les Processing-bodies (P-bodies) (décrits paragraphe III.A.3) (200) (Figure 23).

Certains ARNm sont dégradés par clivage endonucléolytique indépendamment de la déadénylation (201). Après clivage interne des ARNm par des endonucléases, le fragment 5' résultant est dégradé dans le sens 3'-5' par les exonucléases de l'exosome et le fragment 3' est un substrat de la dégradation 5'-3' par l'exonucléase XRN1. Alors qu'un grand nombre d'endonucléases a été identifié, seuls quelques sites de clivages ont été répertoriés. Les endonucléases étant pour la majorité constitutivement actives, l'ARNm se protège du clivage endonucléolytique via la liaison de protéines spécifiques formant ainsi de nouveaux mRNPs (202).



### **3. Localisation subcellulaire**

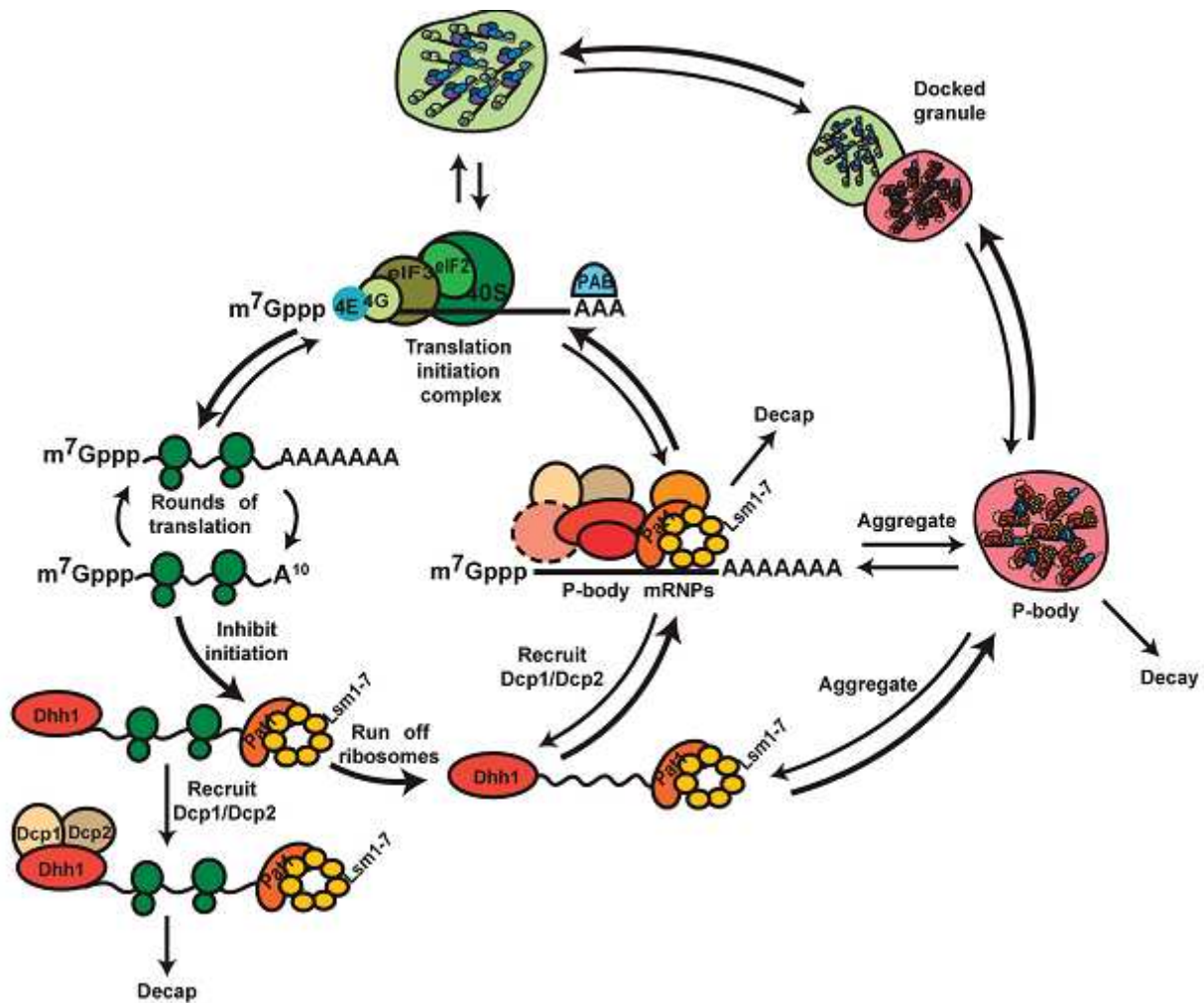
Les ARNm cytoplasmiques eucaryotes sont en équilibre dynamique entre différentes structures subcellulaires qui influencent fortement leur traduction et/ou leur dégradation.

Les ARNm peuvent, en effet, se localiser dans des structures particulières où ils sont hautement traduits. Ces structures appelées polyribosomes ou "polysomes" correspondent à une zone du cytoplasme où les ARNm sont traduits simultanément par de multiples ribosomes. Cependant, l'inhibition de la traduction (au cours du développement ou suite à un stress) conduit à relocaliser les ARNm dans des agrégats appelés "P-bodies" et "granules de stress".

Les P-bodies sont considérés comme des structures dynamiques spécialisées dans le stockage et la dégradation des ARNm. Leur assemblage dépend et est proportionnel à la quantité d'ARNm non traduits. Même si leur composition n'est pas encore très bien connue, on sait que les P-bodies sont constitués des enzymes de décoiffage DCP1/DCP2, des activateurs du décoiffage tels que Dhh1/RCK/p54 et le complexe Lsm1-7, et de l'exonucléase XRN1. Aussi, les P-bodies peuvent contenir des ARNm et des protéines impliquées dans la dégradation non sens (voir paragraphe II.B.1.a) tout comme des composants de la machinerie de répression des miRNAs (203). Cependant, tous les ARNm non traduits ne s'accumulent pas dans ces structures. Par exemple, les ARNm dont la traduction est inhibée par une boucle en 5' au niveau de laquelle le ribosome est bloqué ("dégradation de type non go decay", voir paragraphe III.B.1.c), ne s'accumulent pas dans les P-Bodies sauf si ils contiennent des éléments qui recrutent les composants des P-Bodies.

Les ARNm non traduits peuvent également former des structures secondaires cytoplasmiques appelées "granules de stress". Les granules de stress sont également dynamiques et semblent être composés d'ARNm qui ont amorcé une initiation de la traduction. En effet, les granules de stress contiennent des ARNm complexés avec un ensemble de facteurs d'initiation de la traduction (eIF4E, eIF4G, eIF4A, eIF3 et eIF2), la sous-unité ribosomale 40S, la protéine PABP, ainsi que des répresseurs traductionnels TIA-1 et TIAR. Ces granules sont généralement visibles lors d'un stress (stress oxydant, élévation de la température ou exposition aux UV, etc.) qui aboutit à l'inhibition de l'initiation de la traduction. Dans la plupart des cas, cette inhibition se met en place après la phosphorylation du facteur d'initiation eIF2- $\alpha$ , un facteur nécessaire à l'incorporation de l'ARN de transfert chargé en méthionine nécessaire à la formation du complexe de pré-initiation 48S lors de l'initiation de la traduction.





**Figure 24: Le cycle des ARNm**

Dans le cytoplasme, les ARNm se localisent dans 3 structures majeures particulières: les polysomes, les P-bodies et les granules de stress. Le recrutement de répresseurs traductionnels tels que Pat1, Dhh1 et Lsm-1 facilite le passage des ARNm dans un état traductionnellement réprimé. Des compétitions vont influencer le recrutement de protéines de décoiffage ou le décrochage des ribosomes et l'agrégation des ARNm dans les P-bodies. Les ARNm associés à la machinerie de décoiffage peuvent être dégradés, agrégés dans les P-bodies ou rentrer à nouveau dans une phase de traduction. Dans des conditions limitant l'initiation de la traduction, les ARNm peuvent être pris en charge par les granules de stress (d'après Balagopal V *et al*) (203).

La protéine TIA-1 serait également impliquée dans la formation des granules de stress via sa capacité à s'autoaggréger. Elle agirait notamment en aval de la phosphorylation d'eIF2- $\alpha$ . Selon une hypothèse, la protéine TIA-1 et le complexe ternaire seraient en compétition pour fixer le même site sur le complexe de pré-initiation 48S. Ainsi, suivant que l'ARNm est fixé par l'un ou l'autre de ces facteurs, il sera alors retrouvé soit dans la fraction polysomale pour être traduit, soit dans les granules de stress pour y être stocké (204). Des protéines impliquées dans la stabilité des ARNm sont également retrouvées dans les granules de stress, comme par exemple la protéine HuR (qui favorise la stabilité) et la protéine TTP (qui déstabilise les ARNm) (204). Ceci suggère que les granules de stress seraient des microdomaines dynamiques servant de site de triage pour les transcrits durant un stress.

De nombreuses études démontrent que les P-bodies et les granules de stress interagissent et sont capables d'échanger leur contenu mRNPs. L'observation que la surexpression de la protéine TTP entraîne une interaction prolongée entre les granules de stress et les P-bodies (205) d'une part, et que les protéines HuR, TIA-1 et TIAR ne sont pas des marqueurs exclusifs des granules de stress mais peuvent aussi être associées aux P-Bodies dans les cellules non stressées d'autre part (206), illustrent ce phénomène. De plus, le fait que l'inhibition de l'initiation de la traduction par des stress, des drogues ou des mutations entraînent une diminution des ARNm présents dans les polysomes et soit inversement corrélée à une augmentation de la quantité d'ARNm dans les granules de stress et les P-Bodies (203), montre que ces deux compartiments sont en équilibre dynamique avec les polysomes. Ainsi, les ARNm présents dans les P-Bodies et les granules de stress peuvent, suite à des remaniements de leurs protéines associées, retourner vers un processus de traduction et inversement (205). L'ensemble de ces échanges suggèrent un modèle pour le métabolisme des ARNm appelé "cycle des ARNm" (203) (Figure 24).

En conclusion, ces micro-compartiments concentrent une partie des facteurs nécessaires à la répression transitoire des gènes, qu'elle se fasse par la dégradation des ARNm ou l'inhibition traductionnelle. Ils pourraient servir de centre d'aiguillage contrôlant le trafic, la disponibilité et la quantité des ARNm ainsi que l'initiation de leur traduction et représentent donc un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle de première importance.



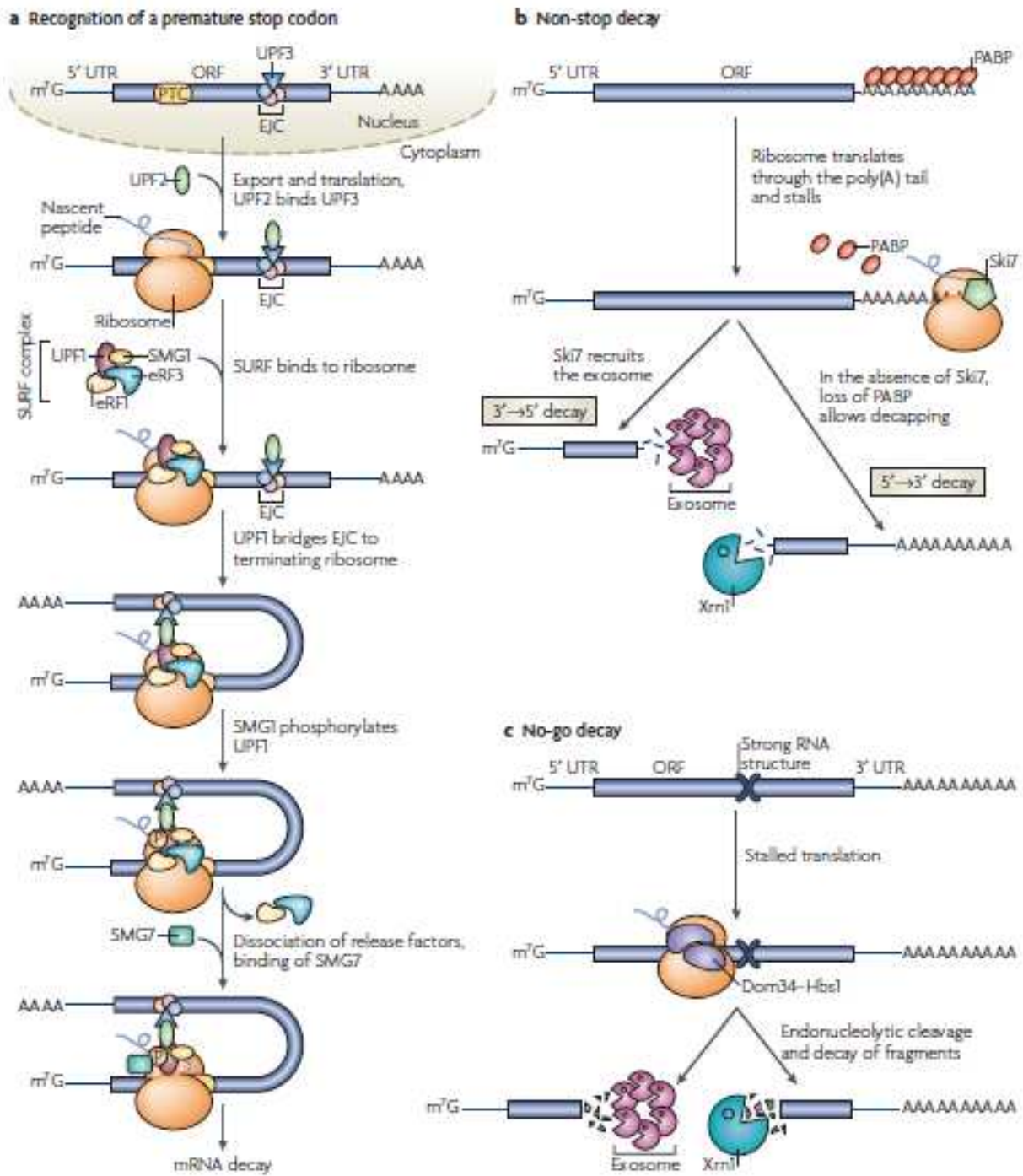
## **B. Devenir de l'ARNm : à traduire ou à dégrader ?**

Après transcription, modifications en 5' et 3', épissage et édition, l'ARNm est exporté dans le cytoplasme pour y être traduit en protéine. Cependant, ces différentes étapes de maturation de l'ARNm peuvent être source d'erreurs plus ou moins dommageables pour la cellule (expression de protéines tronquées ou mutées). Pour détecter la production d'ARNm possédant des anomalies, la cellule a mis en place un système de contrôle qualité.

### **1. "Contrôle-qualité" des ARNm**

#### **a) Dégradation des ARNm non sens (Non-sens mediated decay, NMD)**

Le mécanisme NMD concerne les ARNm, qui suite à une mutation (insertion ou délétion d'un nucléotide ou défaut d'épissage), vont présenter un codon stop prématuré (PTC, Premature Termination Codon). Ces ARNm sont reconnus et dégradés dès leur sortie du noyau. Deux modèles différents ont été décrits pour induire la dégradation ciblée de ces ARNm dits « non-sens ». Le premier modèle, conservé et universel, implique la mise en place, lors de l'épissage, de séquences de 20-24 nucléotides en aval des jonctions exon-exon par le complexe protéique EJC (exon junction protein complex). Au fur et à mesure que le ribosome lit l'ARNm, il détache ces séquences jusqu'au codon stop où il est reconnu par les protéines de terminaison de la traduction eRF1 et eRF3 qui hydrolysent l'ARN de transfert et libèrent le peptide nouvellement synthétisé. Or, lorsque l'ARNm présente un codon stop prématuré, le ribosome s'arrête précocement laissant des séquences "EJC" en aval. D'une part, les protéines UPF1 et SMG1 se lient au ribosome pour former le complexe SURF et d'autre part, UPF2 via UPF1 interagit avec le complexe EJC en aval du codon stop prématuré. Un pont est ainsi créé entre les complexes SURF et EJC ce qui aboutit au relargage des protéines et à un acheminement de l'ARNm vers les complexes de dégradation (207-208) (Figure 25). Cependant, pour certains ARNm (dont celui codant l'immunoglobuline  $\mu$  chez l'Homme), ce complexe EJC n'intervient pas: ce serait la distance entre le codon stop et la queue poly(A) qui serait cruciale dans le déclenchement de leur dégradation (209). Un autre mécanisme impliquant notamment les protéines PABP s'ajouterait à ce mécanisme EJC (210). Suite à une déplétion en protéine UPF1, des analyses par puces ont permis d'étendre ce mécanisme à d'autres ARNm tels que les ARNm qui possèdent des  $\mu$ ORF, des 3'NT avec introns, ou d'autres modifications semblables à des codons stop prématurés (210).



**Figure 25: Mécanismes de contrôle-qualité des ARNm.**

Trois mécanismes de contrôle-qualité des ARNm ont été décrits: la dégradation des ARNm "non-sens" qui consiste à dégrader les ARNm qui possèdent un codon stop prématuré. La dégradation "non-stop" des ARNm qui ne possèdent pas de codon stop et la dégradation "no go" des ARNm clivés ou possédant une structure qui entraîne un décrochage prématuré du ribosome. Ces mécanismes font intervenir la formation de mRNPs particuliers (d'après Garneau NL et al.) (210).

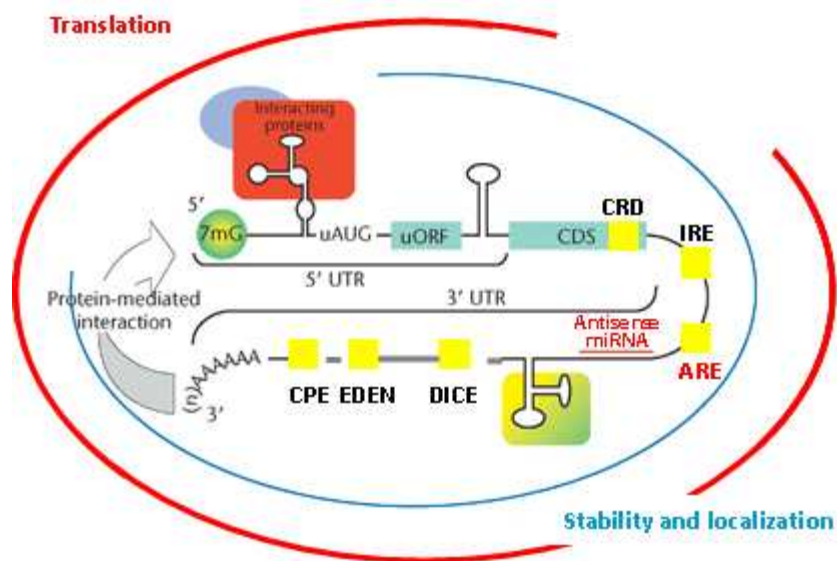
Pour finir, ce mécanisme de dégradation implique chez l'Homme, une phase initiale de déadénylation suivie d'une dégradation du corps de l'ARNm dans le sens 5'-3' par XRN1 ou 3'-5' par les protéines de l'exosome (211-212) (Figure 25).

*b) Dégradation des ARNm sans codon stop (Non Stop Decay, NSD)*

Le NSD cible les ARNm qui ne possèdent pas de codon stop. De tels transcrits peuvent être générés soit par des clivages de l'ARN, soit par l'absence de codon stop dans le cadre de lecture suite à une mutation : dans ce cas, les ribosomes ne s'arrêtent pas et traversent la queue poly(A) décrochant ainsi les PABPs. Aujourd'hui, deux mécanismes différents qui fonctionnent probablement simultanément ont été décrits. Dans le modèle original, lorsque le ribosome arrive à la fin de l'ARNm, la protéine Ski-7, qui mime le domaine C-terminal GTPase du facteur d'élongation EF1A, se fixe sur le site A de la sous unité 80S du ribosome. Ski-7 recrute et s'associe au complexe protéique de l'exosome et entraîne la dégradation de l'ARNm dans le sens 3'-5' (213-214). En absence de Ski-7, le deuxième processus fait intervenir une dégradation dans le sens 5'-3'. Il semblerait que le décrochage des protéines PABP par les ribosomes favoriserait ce type de dégradation (215) (Figure 25). Finalement, ce mécanisme permet à la fois de dégrader l'ARNm et de relarguer les ribosomes mal utilisés pour qu'ils puissent se lier aux autres ARNm "normaux".

*c) Dégradation des ARNm dont la traduction est avortée (No Go Decay, NGD)*

Le mécanisme NGD a été identifié récemment chez la levure et n'est pas encore très étudié chez l'Homme. Il cible tous les ARNm sur lesquels les ribosomes se détachent anormalement à cause notamment de la présence d'une structure secondaire. Ces ARNm sont reconnus par le complexe protéique Dom34/Hbs1 et parfois clivés par des endonucléases. Hbs1 et Dom34 peuvent interagir avec le ribosome détaché à la manière de Ski-7 et libérer les fragments d'ARNm qui sont dégradés par l'exosome et l'exonucléase XRN1 (216) (Figure 25).



**Figure 26: Eléments *cis* et facteurs régulateurs *trans* de la régulation post-transcriptionnelle.**

Les éléments de la région 5'NT tels que les IRES (Internal Ribosome Entry Site) et les  $\mu$ ORF (Upstream Open Reading Frame) vont majoritairement moduler le niveau de traduction. Les éléments de la région codante et de la 3'NT vont moduler la stabilité et de ce fait la localisation subcellulaire mais peuvent aussi intervenir dans la modulation de l'initiation de la traduction. Parmi eux, on note les éléments CRD ( Coding Region Determinants), IRE (Iron Responsive Elements), ARE (AU- Rich Elements), DICE (Differentiation Control Element), EDEN (Embryonic Deadenylation Element) et CPE ( Cytoplasmic Polyadenylation Elements). La queue poly(A) et la coiffe sont généralement impliquées dans ces mécanismes ainsi que les facteurs trans que sont les miRNAs (adapté de Mignone, F *et al.*, 2011)(217).

## **2. Contrôle de la quantité et du niveau de traduction des ARNm**

L'expression génique peut être finement régulée au niveau post-transcriptionnel. Cette régulation nécessite de nombreux facteurs régulateurs car elle doit se faire avec précision à un temps donné et un endroit donné. Les mécanismes post-transcriptionnels font intervenir des éléments "*cis*" disséminés dans la séquence de l'ARNm et des facteurs "*trans*-régulateurs" qui s'y associent. La nature de l'association élément *cis*/facteur *trans* contrôle positivement et/ou négativement le recrutement des machineries de dégradation des ARNm et d'inhibition de la traduction et par conséquent modulent la localisation subcellulaire des ARNm. Ces éléments définissent non seulement la stabilité (ou demi-vie) d'un ARNm, mais ils peuvent également contrôler son efficacité de traduction. Les éléments *cis* sont retrouvés dans toutes les régions de l'ARNm : les régions 5' et 3' NT et la région codante (Figure 26).

### a) Les éléments cis de la région 5'NT

Les éléments de la région 5'NT sont le plus souvent impliqués dans la régulation du niveau de traduction des ARNm. Parmi eux, on trouve principalement les éléments IRES et les  $\mu$ ORF positionnés en amont du "vrai" codon d'initiation de la traduction.

- Internal Ribosome Entry Sites (IRES)

Les éléments IRES sont présents dans des régions plutôt longues et très structurées de certains ARNm (218) tels que *c-myc* (219), *VEGF* (220) ou encore *HIF1 $\alpha$*  (220). Ces éléments permettent aux ARNm d'être traduits indépendamment de la coiffe. Dans certains cas, comme par exemple lors d'un stress cellulaire où la traduction dépendante de la coiffe est inhibée, la cellule est capable de mettre en place un mécanisme alternatif d'initiation de la traduction afin de maintenir la synthèse de certaines protéines nécessaires à la "réparation" cellulaire post-stress (221). Les IRES sont des structures en tige-boucle (Figure 26) qui ont une grande affinité avec les protéines du complexe d'initiation de la traduction telles que les protéines eIF4G ou eIF3. Cette grande affinité va permettre le recrutement de la sous-unité 40S au niveau de cette structure (218). Cependant, certains éléments IRES sont capables de s'associer directement à la petite sous-unité ribosomale. Les IRES ont été majoritairement caractérisées pour les ARNm viraux. L'étude de ces ARNm viraux a permis de mettre en évidence l'implication de protéines auxiliaires appelés ITAFs (IRES Trans-Acting Factors) qui seraient nécessaires pour l'activation de l'initiation de la traduction par ces structures (222).





- Upstream Open Reading frames ( $\mu$ ORF)

Certains ARNm possèdent une longue région 5'NT dans laquelle est retrouvé un codon d'initiation fonctionnel ( $\mu$ AUG) en amont du "vrai" codon d'initiation (223). Ce  $\mu$ AUG correspond au codon d'initiation d'un petit cadre de lecture ouvert qui interfère avec l'initiation normale de la traduction. Les  $\mu$ ORF contrôlent l'initiation de la traduction en jouant sur l'utilisation alternative des codons d'initiation et la capacité de réinitiation du ribosome. Ces éléments sont très conservés mais leurs caractéristiques structurales et fonctionnelles sont très variables selon l'ARNm. Par exemple, chez l'Homme, les  $\mu$ ORF sont divergentes au niveau de leur tailles (en moyenne 48 nt), leur nombre (entre 1-13 séquences), leur position (proximité à la coiffe ou au codon d'initiation), leur séquence, ou encore leur structure secondaire (224). Selon ces caractéristiques, les  $\mu$ ORF ne vont pas avoir la même activité. Il est estimé aujourd'hui que 50% des ARNm humains contiennent une  $\mu$ ORF (225). Un des exemples les plus connus chez l'homme est l'ARNm *C/EBP $\beta$*  dont j'ai décrit le mode de traduction plus haut (voir paragraphe II.B.3.a).

b) Les éléments cis de la région codante

- Coding Region Determinants (CRD)

Les éléments CRD sont des régulateurs de la stabilité présents dans la région codante de certains gènes comme *c-fos*, *c-myc* et la  $\beta$ -*tubuline*. Ces motifs sont constitués d'une longue séquence nucléotidique riche en purines. Les éléments CRD sont suffisants pour induire une déstabilisation de l'ARNm par clivage endonucléolytique s'ils sont assez éloignés de la queue poly(A) (226) mais aussi pour lier des complexes protéiques qui vont les protéger (227). La liaison d'un complexe protéique sur l'ARNm *c-fos* le protège, par exemple, de la dégradation par les endonucléases favorisant ainsi sa stabilisation. Ces complexes protéiques sont constitués de la protéine de liaison aux domaines CRD, la CRD Binding Protein (CRD-BP ou IGF-II mRNA BP) mais également d'AU-Binding proteins (AUF1), de hnRNPs, de protéines de liaison aux purines (Unr) ainsi que de protéines de liaison à la queue poly(A) dont les protéines PABP et PAIP-1 (PABP Interacting Protein) (228). Ce complexe entraîne la formation d'une boucle entre la queue poly(A) et le domaine CRD à l'origine d'une stabilisation des ARNm et d'une régulation de leur niveau de traduction (229). En effet, après traduction, le complexe se détache du motif CRD tout en restant lié à l'ARNm et entraîne sa dégradation en recrutant notamment la déadénylase PARN (230). L'ARNm est ainsi traduit une seule fois.



Il est intéressant de noter que ces protéines CRD-BPs, qui ne sont pas exprimées dans les cellules adultes normales, sont surexprimées dans les cancers avec notamment une amplification de leurs gènes dans 1/3 des cancers du sein (231).

c) Les éléments cis de la région 3'NT

La région 3'NT regorge d'éléments régulateurs de la stabilité et/ ou de la traduction des ARNm. Voici les éléments les plus répandus et les mieux caractérisés.

- Cytoplasmic Polyadenylation Element (CPE)

Les éléments CPE sont reconnus par des protéines CPEB qui vont moduler la polyadénylation et par conséquent l'initiation de la traduction. Leur activité a tout d'abord été identifiée lors de la gamétogénèse mais des études récentes ont montré leur importance dans la plasticité synaptique et la sénescence (232). En se fixant sur les séquences -UUUUUAU- de certains ARNm matures, elles vont recruter un complexe protéique constitué à la fois de la déadénylase PARN et de la poly(A) polymérase Gld2. Dans ce complexe, la protéine PARN est plus active et dégrade la queue poly(A). Cependant suite à un stress, CPEB est phosphorylée (233) diminuant son affinité pour la protéine PARN qui se détache du complexe. La protéine Gld2 peut alors catalyser la polyadénylation (234-235). Suite au raccourcissement de la queue poly(A), la protéine CPEB qui interagit avec la maskin, interagit avec la protéine eIF4G de la coiffe empêchant ainsi l'initiation de la traduction. A contrario, l'élongation de la queue poly(A) permet le recrutement de la protéine PABP qui déplace la maskin et interagit avec la protéine eIF4G permettant l'initiation de la traduction (236).

- Differentiation Control Element (DICE)

Les éléments DICE ont été identifiés sur de nombreux ARNm comme par exemple l'*α-globin* (237). Ce sont des éléments riches en cytosine et uridine qui sont reconnus par des protéines aux domaines KH telles que hnRNPK et hnRNPE. La fixation de ces protéines entraîne une inhibition de la traduction en empêchant l'association de la sous-unité 60S lors de l'assemblage du ribosome 80S (237). Cette inhibition serait due notamment à l'interaction des protéines hnRNPs avec la protéine eIF4G liée à la coiffe (238). L'affinité des hnRNPs envers leurs cibles et leur effet répresseur sur la traduction est cependant variable selon la séquence et la structure de l'élément DICE ainsi que du niveau de phosphorylation et de la conformation des hnRNPs (239).



- Eléments de réponse au fer (IRE)

L'élément de réponse au fer consiste en une structure tige-boucle constituée d'une tige riche en G-C de 23-27 pb et d'une boucle de 6 nucléotides (228). Cet élément est retrouvé uniquement dans les gènes codant des protéines impliquées dans la régulation des concentrations sériques en fer telles que la transferrine (TfR), une protéine impliquée dans le transport du fer dans les cellules ou encore la ferritine, une protéine de mise en réserve du fer. Cet élément a été rapporté dans la région 3' NT de l'ARNm *TfR* et dans la région 5' NT de l'ARNm *ferritin* (228). Deux protéines de liaison à ces séquences, IRE -Binding Proteins, ont été décrites: IRP1 et IRP2. Comme leur nom l'indique, l'activité de ces protéines va dépendre des concentrations en fer intracellulaire. Cette caractéristique va permettre de réguler finement l'expression de leurs ARNm cibles. Ainsi, en condition de carence en fer, les IRPs se lient à la région 3' NT de l'ARNm *TfR* et induisent sa stabilisation en le protégeant des endonucléases. Le but est d'augmenter l'activité de captage du fer sérique au niveau de la membrane et l'entrée de fer dans la cellule. Parallèlement, les IRPs se fixent sur la séquence IRE localisée dans la région 5'NT de l'ARNm *Ferritin* et inhibent la traduction de cet ARNm (240). Ici, le but est de diminuer le stockage du fer intracellulaire pour qu'il soit mis à la disposition de la cellule. A l'inverse, dans des conditions de fortes concentrations en fer, la protéine IRP2 est dégradée par le protéasome après ubiquitination tandis que la protéine IRP1 est inactivée. Les sites IREs sont alors démasqués, l'ARNm *Ferritin* est traduit, celui de la transferrine est dégradé.

- Eléments tige-boucle des histones

Les ARNm des histones, ne possédant pas de queue poly(A), sont protégés de la dégradation des exonucléases 3'-5' par une structure en tige-boucle présente à la fin de leur région 3' NT (6pb pour la tige, 4b pour la boucle). Une protéine de liaison à cette boucle a été décrite pour réguler l'expression des histones au cours du cycle cellulaire (241).

- Eléments riches en Guanine et Uridine (GREs ou EDEN)

Des éléments GRE ou EDEN (Embryonic Deadenylation Element) présents dans la région 3'NT ont été décrits pour moduler la demi-vie de nombreux ARNm labiles impliqués dans la prolifération cellulaire, l'apoptose et la mobilité cellulaire (242). Ces régions sont reconnues par des protéines de la famille CELF, dont CUGBP1 fait partie, qui se lient spécifiquement au motif-UGUUUGUUUGU- très conservé au cours de l'évolution (243). La liaison de ces protéines sur ces séquence aboutit à une déstabilisation de l'ARNm par déadénylation (244) via le recrutement de la déadénylase PARN (245).



Une des premières cibles de CUGBP1 identifiée a été l'ARNm *c-jun* (246). L'étude de l'interaction de CUGBP1 sur la 3'NT de *c-jun* a révélé que CUGBP1 pouvait aussi se lier à des séquences ARE de classe III riches en Uridines (247) (séquences décrites dans le paragraphe.III.D.1.a).

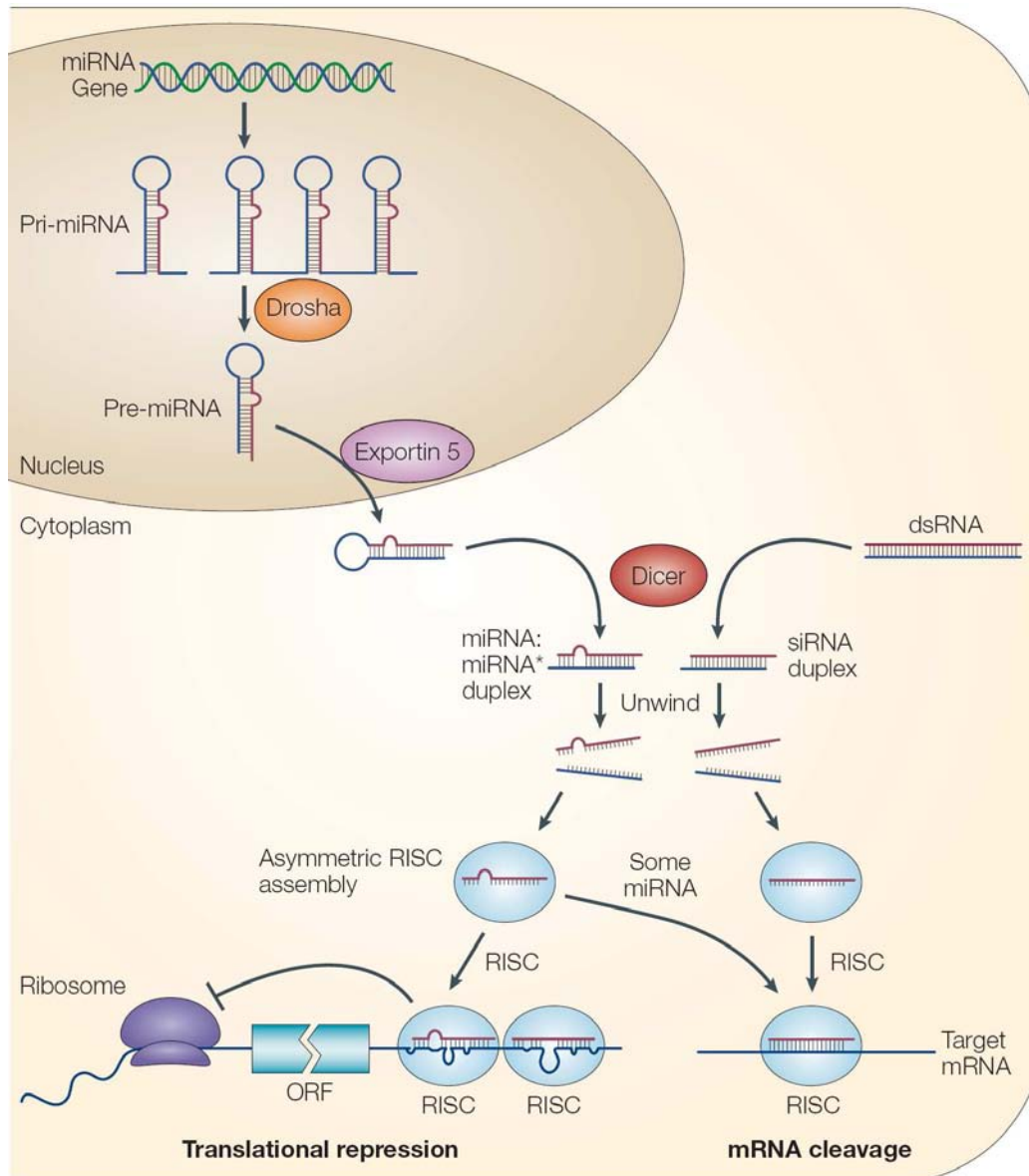
A cet ensemble d'éléments *cis* s'ajoute un motif encore plus répandu et de ce fait mieux caractérisé, l'élément ARE (AU-Rich Elements) (cf. paragraphe.III.D.1.a). Depuis la caractérisation de cet élément, de nombreux facteurs *trans* capables de se lier à ces séquences, les AU-Binding Proteins, ont été identifiés Leur régulation et leur mode d'action ont permis de mieux comprendre le rôle de ces motifs dans la dégradation des ARNm (cf. paragraphe.III.D.2).

De manière intéressante, certains de ces ARNm-ARE sont également ciblés par un autre type de facteur *trans* régulateur que sont les miRNAs (cf. paragraphe.III.C). Dans la suite de cette introduction, je décrirai plus particulièrement les régulations post-transcriptionnelles contrôlées par les miRNAs et les AU-BPs.

### **C. La régulation post-transcriptionnelle via les miRNAs**

Les miRNAs font partie de la famille de ARN non codants (ncRNA) qui régulent négativement l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel. Les miRNAs endogènes, longs de 20-22 nucléotides, sont très bien caractérisés et représentent la classe d'ARN non codant régulateurs la plus abondante. Les miRNAs reconnaissent leurs ARNm cibles par complémentarité de bases. Cependant, ils ne peuvent pas à eux seul réguler négativement l'expression génique de leurs ARNm cibles. Ils ont en effet besoin d'être assemblés dans un complexe appelé RISC (RNA-Induced Silencing Complex). Dans ce complexe, les miRNAs vont déterminer les ARNm à cibler alors que les protéines du composant RISC sont les acteurs de la dégradation ou de l'inhibition de la traduction de ces ARNm. Plus de 900 miRNAs humains sont aujourd'hui répertoriés dans la base de donnée de référence "miRBase" (248) et il est estimé qu'environ 1/3 des gènes sont régulés par les miRNAs (249-251). Les miRNAs régulent ainsi une grande diversité de processus biologiques et de ce fait sont fortement impliqués dans les cancers.





**Figure 27: Biogenèse des miRNAs.**

Les miRNAs sont produits sous forme de longs précurseurs structurés en tige-boucle, les pri-miRNAs. Ces pri-miRNA sont maturés en pré-miRNAs par la RNase Drosha. Les pré-miRNAs sont ensuite exportés au cytoplasme par l'exportine 5 puis pris en charge par la RNase Dicer. Suite à cette étape, les miRNAs se trouvent sous la forme de duplexes miRNA/miRNA\* dont un seul brin est intégré dans le complexe RISC. Ce complexe permet au miRNA de cibler spécifiquement les ARNm par appariement des bases. Si l'appariement est parfait l'ARNm sera clivé puis dégradé à la manière d'un siRNA. Si l'appariement est imparfait, le complexe RISC inhibera la traduction de l'ARNm. (d'après Mráz M.) (252).

## **1. Biogenèse des miRNAs**

Les miRNAs sont transcrits sous la forme d'un long miRNA primaire (pri-miRNA) par l'ARN polymérase II (253) ou, dans certains cas, par l'ARNm polymérase III (254). De nombreux pri-miRNAs sont transcrits à partir de gènes ou d'introns organisés sous la forme de clusters. Les pri-miRNAs sont typiquement constitués d'une boucle terminale et d'une tige d'environ 33 pb aux extrémités flanquantes (255) (Figure 27). La première étape de maturation des pri-miRNAs se fait dans le noyau où un complexe contenant la RNase III, Drosha, dégrade les extrémités flanquantes et une région d'environ 11pb de la tige (256) (Figure 27). Cette étape permet la conversion des pri-miRNA en précurseurs des miRNAs appelés pré-miRNAs. Les pré-miRNAs correspondent à des ARNs en épingle à cheveux longs de 60-70nt qui sont exportés dans le cytoplasme grâce au complexe Exportine-5/RANGTP (257-258) (Figure 27). Dans le cytoplasme, les pré-miRNAs sont pris en charge par un complexe contenant Dicer, une autre RNase III. Dicer coupe la boucle des pré-miRNAs ce qui résulte à des duplexes de miRNAs (miRNA/miRNA\*) longs de 21-25 nucléotides (259) (Figure 27). De ce duplexe miRNA/miRNA\*, seul le brin désigné miRNA, est sélectionné pour intégrer le complexe RISC, l'autre brin, miRNA\*, est rejeté pendant l'assemblage du complexe RISC (Figure 27). Le choix du brin dépend d'une balance d'au moins 3 caractéristiques du duplexe miRNA/miRNA\*: la structure, l'identité du nucléotide en 5' et l'asymétrie thermodynamique (260).

## **2. Mécanismes d'action des miRNAs**

Après leur synthèse, les miRNAs sont donc incorporés dans le complexe RISC qui est constitué des protéines Argonaute dont AGO2, une protéine qui permet la liaison du miRNA à sa cible, et de la protéine GW182, une protéine requise pour l'inhibition de la traduction. La liaison de la protéine AGO2 sur l'ARNm permet à la protéine GW182 d'interagir ensuite avec la protéine PABP. Ainsi en interférant avec cette protéine, les miRNAs pourront inhiber la traduction et/ou induire la dégradation des ARNm. Il est communément rapporté que le devenir de leurs cibles va dépendre de la complémentarité des bases: si l'appariement est partiel, le miRNA inhibera sa traduction, si l'appariement est parfait, l'ARNm sera clivé puis dégradé. Cependant, on sait aujourd'hui que le mécanisme d'action majoritaire des miRNAs dans les cellules mammifères est d'induire la dégradation des ARNm, associée ou non à une inhibition de la traduction (261).

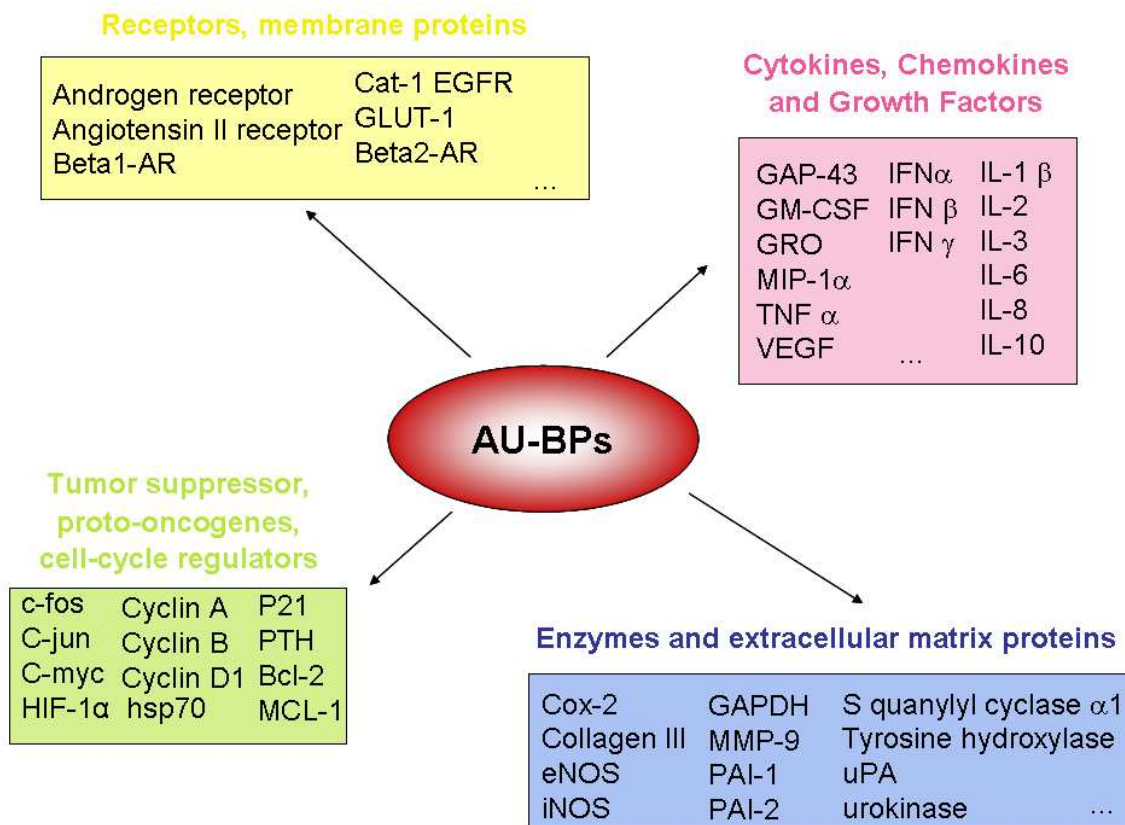


*a) Effet "siRNA"*

L'évidence que les miRNA pouvaient induire une dégradation de leurs ARNm cibles a été déterminée par des analyses de transcriptomes dans lesquelles l'abondance de certains ARNm était inversement corrélée au niveau des miRNAs (262). Les miRNAs peuvent agir en clivant directement leurs ARNm cibles à la manière des siRNAs (263). En effet, la protéine AGO2, qui n'est autre qu'une endonucléase, est capable de cliver les ARNm uniquement lorsque la complémentarité entre le miRNA et sa cible est parfaite (264). Dans certains cas, où l'appariement n'est pas parfait, on peut cependant assister à une dégradation de l'ARNm dans le sens 5'-3'. Dans ce mécanisme, la protéine AGO2 en partenariat avec la protéine GW182 vont induire, dans un premier temps, la déadénylation de l'ARNm cible en recrutant le complexe de déadénylation CCR4/CAF1/NOT et dans un deuxième temps, son décoiffage par les protéines DCP2. L'ARNm est ensuite dégradé par l'exonucléase XRN1 dans le cytoplasme ou dans les P-Bodies (265).

*b) Répression de la traduction par les miRNAs*

Le mécanisme d'inhibition de la traduction par le complexe RISC et ses miRNAs associés est assez controversé. La première controverse concerne le lieu où se fait cette répression de la traduction. En effet, alors que certains travaux démontrent la présence des miRNAs et de leurs ARNm cibles au sein des polysomes (266), d'autres soutiennent que les miRNAs ne co-sédimentent pas avec les polysomes de hauts poids moléculaires (267). Un autre point de controverse concerne la phase de la traduction au cours de laquelle le complexe RISC interviendrait: au moment de la phase d'initiation de la traduction (268) ou lors de la phase d'élongation (266). Parmi les études qui supportent la thèse de la répression de la traduction lors de la phase d'élongation, certaines rapportent que la fixation du complexe RISC n'induirait pas une inhibition directe des facteurs d'élongation de la traduction mais entrainerait plutôt une protéolyse du peptide naissant (269). Malgré cela, un plus grand nombre d'étude semble prôner l'hypothèse de la répression de la traduction lors de la phase d'initiation. Il a été notamment démontré que le complexe RISC pouvait bloquer l'initiation de la traduction en empêchant le recrutement de la sous-unité ribosomale 60S (270) et/ou en interférant avec la coiffe ou le complexe de liaison à la coiffe eIF4F (271). Certaines études démontrent, en effet, que les ARNm qui sont traduits indépendamment de la coiffe sont réfractaires à la répression de leur traduction par les miRNAs. Cette observation suggère donc que les miRNAs réprimeraient uniquement la traduction des ARNm dont l'initiation est dépendante de la coiffe (267).



**Figure 28: Classification par fonctions moléculaires des gènes régulés via les motifs ARE.**

Les ARNm-ARE codent de nombreuses protéines aux multiples fonctions telles que des récepteurs, ou des protéines membranaires, des cytokines, des chimiokines, des facteurs de croissance, des protéines de la matrice extracellulaire ou encore des suppresseurs de tumeurs, des oncogènes et des régulateurs du cycle. (Adapté de Eberhardt W *et al.*) (272).

Finalement, des études associent l'effet répresseur de la traduction du complexe RISC à sa capacité à dégrader les ARNm. Par exemple, le complexe RISC pourrait induire une déadénylation de l'ARNm qui causerait un arrêt de la traduction en bloquant sa circularisation (273) ou encore il pourrait acheminer ses ARNm cibles dans les P-Bodies où ils seraient dégradés ou stockés dans une forme traductionnellement inactive. Cependant, une étude a rapporté que les endonucléases AGO étaient capables de s'associer aussi avec les granules de stress. Les granules de stress étant des lieux de stockage d'ARNm traductionnellement inactifs, ces protéines ne joueraient donc pas leur rôle d'endonucléases mais pourraient participer à la répression de la traduction des ARNm (274).

Ces hypothèses ne seraient pas mutuellement exclusives (275). Le mécanisme d'action des miRNAs reste complexe à étudier. En effet, il est, dans certains cas, difficile d'associer, *in silico*, un miRNA à une cible ARNm, vu le faible taux d'appariement qu'ils partagent. De plus, un miRNA peut cibler plusieurs ARNm, et un ARNm donné peut être la cible de plusieurs miRNAs. Enfin, cette reconnaissance et/ou l'effet du miRNA sur sa cible est conditionnée par des mécanismes particuliers (comme par exemple l'édition des miRNAs lors d'un stress cellulaire), ou encore par l'intervention de cofacteurs protéiques (voir paragraphe sur "régulation coordonnée miRNA/AU-BP: .III.F).

## **D. La régulation post-transcriptionnelle via les AU-BPs**

### **1. Element "Cis" ARE (AU-rich element)**

#### *a) Description des motifs ARE*

C'est en 1986 que Shaw et Kamen (276) décrivent pour la première fois un motif d'instabilité, le motif ARE, riche en résidus Adénine et Uridine. Il a été estimé par une approche bioinformatique que 5 à 8% des ARNm cellulaires contiennent un motif ARE au niveau de leur extrémité 3'NT (277). Ces ARNm proviennent généralement de gènes adaptatifs ou environnementaux qui sont exprimés de façon transitoire dans les cellules, comme les gènes codant les cytokines, les facteurs de croissance, les facteurs de transcription ou certaines enzymes du métabolisme (Figure 28) (277-279).

Group	Motif	Representative transcripts
<b>I</b>	WAUUUAW with U-rich region	c-fos, c-myc
<b>IIA</b>	AUUUAUUUAUUUAUUUAUUUA	GM-CSF, TNF- $\alpha$
<b>IIB</b>	AUUUAUUUAUUUAUUUA	IFN- $\alpha$
<b>IIC</b>	WAUUUAUUUAUUUAW	COX-2, IL-2, VEGF
<b>IID</b>	WWAUUUUUUAWW	FGF2
<b>IIE</b>	WWWWAUUUAWWWW	u-PA receptor
<b>III</b>	U-rich region, non-AUUUA	c-jun

GM-CSF: granulocyte macrophage-colony stimulating factor; TNF: tumour necrosis factor; IFN: interferon; COX: cyclooxygenase; IL: interleukin; VEGF: vascular endothelial growth factor; FGF: fibroblast growth factor; u-Pa: urokinase plasminogen activator. #: proposed classification by Wilusz *et al.*

**Tableau 4: Classement des éléments ARE** (d'après Fan, J *et al.*) (280).

Ces motifs ARE sont également retrouvés dans de nombreux ARNm codant des oncogènes comme *c-fos*, *c-myc* ou *c-jun* (Figure 28) (228). Aussi, la présence de mutations dans les séquences ARE et/ou la modification de l'expression des protéines s'y fixant, peuvent être à l'origine du développement de maladies (inflammation, cancer,...).

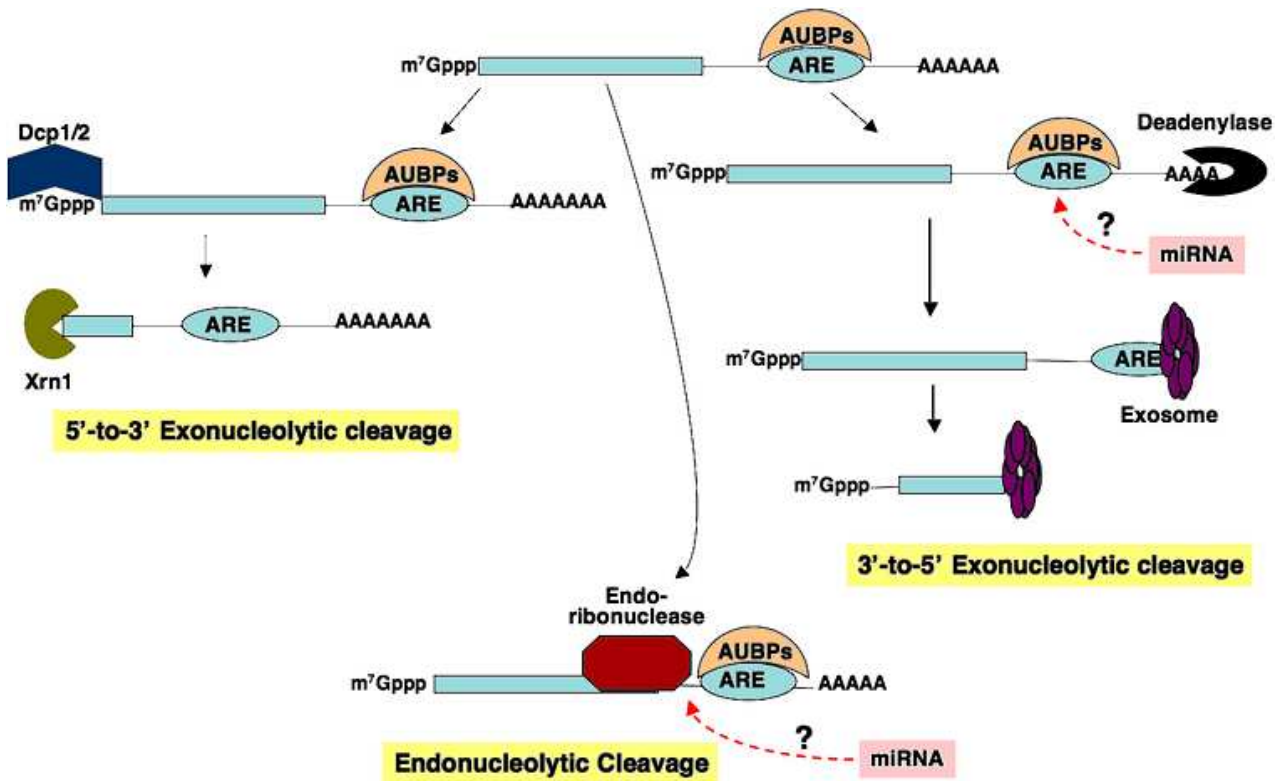
Plusieurs classes d'ARNm-ARE ont été décrites, selon la présence et l'organisation du motif pentamérique AUUUA (Tableau 4). L'absence ou la présence du pentamère AUUUA, isolé ou réitéré, chevauchant ou non, a permis une première classification des ARE en trois catégories (281). La première classe correspond aux séquences contenant un motif pentamérique AUUUA localisé dans ou à proximité d'une région riche en U. La classe II correspond aux séquences contenant de un à plusieurs motifs AUUUA. Enfin la classe III correspond aux séquences contenant une région riche en U mais sans motif AUUUA (282). Ultérieurement, l'analyse bioinformatique des régions 3'NT, fondée sur la recherche du motif WWWU(AUUUA)UWWW (avec W = A ou U), a permis de subdiviser la catégorie II, contenant deux pentamères ou plus, en quatre groupes selon le nombre de pentamères présents (277).

Des études expérimentales et bioinformatiques commencent aujourd'hui à démontrer que la présence d'un motif ARE n'est pas suffisante pour définir les cibles réelles des AU-BPs. La structure des ARNm doit en effet être prise en compte (283). C'est pourquoi, Gruber *et al.* ont récemment réalisé une nouvelle analyse bioinformatique en prenant en compte le contexte structural des sites restreints -WWAUUUAWW- en calculant l'énergie d'ouverture et par conséquent l'accessibilité du site. Cette étude a alors permis d'élever l'estimation de la quantité de cibles potentielles des AU-BPs de 5-8% à environ 16% (284).

a) Mécanisme de dégradation des ARNm-ARE (AMD, ARE Mediated Decay)

L'introduction du motif ARE issu du gène humain codant la cytokine GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) dans la région 3'NT de l'ARNm  $\beta$ -globine du lapin a permis de démontrer, en 1986, l'implication de la séquence ARE dans la dégradation des ARNm (276). A la manière du système de dégradation général des ARNm, la dégradation induite par les motifs ARE (AMD) débute par une déadénylation (285), via la déadénylase PARN, suivie d'une dégradation de la coiffe par les protéines DCP1/2 (286-287).





**Figure 29: Mécanisme de dégradation des ARNm à motifs ARE (ARE Mediated Decay : AMD).**

Trois mécanismes de dégradation des ARNm-ARE ont été décrits. Le premier fait intervenir, à la manière du mécanisme général de dégradation des ARNm, une étape de déadénylation suivie d'une dégradation dans le sens 5'-3'. Le deuxième se fait via une dégradation des ARNm dans le sens 3'-5'. Enfin, le troisième mécanisme impliquerait un clivage endonucléolytique. Certaines de ces étapes feraient intervenir des miRNAs (D'après Von-Roretz et al.) (288).

En effet, la fixation des AU-BPs destabilisatrices au niveau des motifs ARE affecterait, d'une part, le repliement des ARNm en empêchant l'interaction de la protéine PABP avec la queue poly(A) et/ou les protéines de la coiffe (Figure 29). Elle favoriserait, d'autre part, le recrutement de la déadénylase PARN et des protéines de décoiffage (289-290). Le corps de l'ARNm serait ensuite dégradé soit dans le sens 5'-3' par les exonucléases XRN1 et PM-Scl-75 (291-292) soit dans le sens 3'-5' par les exonucléases des exosomes (287). On retrouve par conséquent des "ARNm-ARE à dégrader" à la fois dans les P-Bodies (293) et dans les exosomes (287). Deux protéines de liaisons aux motifs ARE (AU-BPs) destabilisatrices, TTP et BRF1, sont en effet capables d'amener les ARNm-ARE aux P-Bodies. Ce phénomène est observé notamment lors d'une pénurie d'enzymes de dégradation, suggérant que ces protéines favoriseraient la séquestration des ARNm-ARE dans ces granules cytoplasmiques afin de bloquer leur expression en attendant leur dégradation, lorsque le système est ralenti (293). De plus, des ARNm-ARE ont été identifiés au niveau des exosomes. Une étude *in vitro* a permis d'identifier certaines AU-BPs destabilisatrices, comme KSRP, capables de former un complexe avec la déadénylase PARN et la protéine de décoiffage DCP2 au niveau des exosomes (294-295). Ces complexes, constitué de diverses sous unités exonucléases, contiennent aussi des protéines qui sont capables de se lier directement aux motifs ARE. Il a notamment été démontré que l'exonucléase PM-Scl-75 pouvait spécifiquement se lier aux ARE via ses domaines RNase PH (296-297) (Figure 29).

Par ailleurs, des études ont permis de mettre en évidence l'implication d'endonucléases dans le clivage des ARNm-ARE suggérant un nouveau mécanisme moléculaire de dégradation de ces ARNm (298-301). Une de ces endonucléase, G3BP, phosphorylée par la GTPase Ras-GAP, induirait la dégradation de l'ARNm-ARE *c-myc* par clivage endonucléolytique.

### **1. Les principales AU-Binding Proteins: Facteurs "Trans"**

Les mécanismes de régulation de l'expression génique via les motifs ARE ne sont pas totalement connus. Cependant, la fonctionnalité de l'ARE dépend des facteurs *trans* régulateurs qui s'y associent : les AU-Binding Proteins (AU-BPs) (Tableau 5). Certaines AU-BPs favorisent l'activité destabilisante des motifs ARE sur les ARNm, d'autres ont plutôt pour effet de l'inhiber : on observe alors une protection des ARNm cibles contre la dégradation (stabilisation). Ces protéines pourraient également influencer le devenir des ARNm en relocalisant ceux-ci dans les structures cytoplasmiques telles que les P-bodies, les granules de stress ou les polysomes.

Protein	RNA-Binding Motif	Exemple of known ARE-mRNA targets	Functions
AUF1	RRM	C-myc, c-fos, GM-csf, PTH, TNF $\alpha$ , p21, Cyclin D1, interleukin-3	mRNA destabilization/stabilization, translation enhancer
HuR	RRM	C-fos, MyoD, p21, Cyclin A, Cyclin B1, Cyclin D1, GM-CSF, TNF $\alpha$ , NOS III/ iNOS, Cox-2, interleukin-3, VEGF, Myogenin	mRNA stabilization/ Translational enhancer/ repression
HuB	RRM	TNF $\alpha$ , GLUT1, NF-M	mRNA stabilization
HuC/D	RRM	GAP-43	mRNA stabilization, translation enhancer
TIAR	RRM	TNF $\alpha$ , GM-CSF	Translational repression
TIA-1	RRM	TNF $\alpha$ , Cox-2	Translational repression
TTP	Cys-Cys-Cys-His Zinc Finger	TNF $\alpha$ , interleukin-3, GM-CSF, Cox-2, interleukin-2, c-fos	mRNA destabilization
BRF1/2	Cys-Cys-Cys-His Zinc Finger	TNF $\alpha$ , interleukin-3, cIAP2	mRNA destabilization
TINO	KH, RING domain	Bcl-2	mRNA destabilization
Mex3 A/B/C	KH, RING domain	ND	ND
KSRP	KH domain	C-fos, NOS III/iNOS, TNF $\alpha$ , interleukin-2, c-jun	mRNA destabilization
hnRNPA1	RRM	GM-CSF, interleukin-2, c-myc	ND
AUBF	ND	C-fos, interferon, interleukin-3, v-myc, GM-CSF, (AUUUU) <sub>n</sub>	mRNA stabilization
AU-A/B/C	ND	TNF $\alpha$ , GM-CSF, c-myc	mRNA destabilization
NF 90	dsRRM	IL-2, acid beta glucosidase	mRNA stabilization
CUG-BP 1/2	RRM	Cox-2, Apolipoprotein B	mRNA stabilization Translational repression
Nucléoline	CS-RBD	Bcl-2	mRNA stabilization
PAIP2	RRM	VEGF	mRNA stabilization
FXR1	KH domain	TNF $\alpha$	Translational enhancer

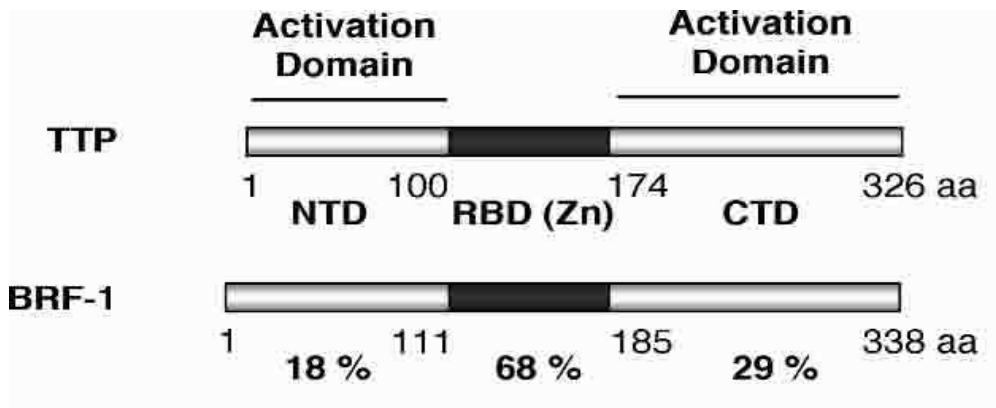
**Tableau 5: Liste des AU-BPs, de leurs ARNm cibles et de leur fonction** (Tableau réalisé d'après l'ensemble des données bibliographiques existant à ce jour).

Parmi les AU-BPs les mieux caractérisées (Tableau 5), certaines comme celles de la famille ELAV/Hu, préservent l'ARNm-ARE de la dégradation (AU-BPs dites "stabilisatrices"), d'autres, telles que KSRP, TTP (Tristetraprolin) ou les protéines apparentées BRF1 (Butyrate Response Factor 1), provoquent sa dégradation (AU-BPs dites "déstabilisatrices") en interagissant avec les enzymes de la voie de dégradation des ARNm (302) (voir paragraphe III.D.1.b) ou par interconnexion avec la voie des miRNAs (voir paragraphe III.F). TIA-1 et TIAR, ne semblent pas intervenir directement dans la (dé)stabilisation des ARNm-ARE mais régulent leur niveau de traduction. AUF1/hnRNPd, quant à elle, peut tantôt jouer un rôle protecteur contre la dégradation, ou au contraire la favoriser, selon le contexte cellulaire. Toutes ces protéines peuvent, en théorie, se fixer à une même séquence ARE et ainsi agir en synergie ou en compétition les unes avec les autres. Selon Keene J.D. (303), les AU-BPs peuvent réguler de manière coordonnée l'expression d'ARNm multiples, codant pour des protéines fonctionnellement proches, appelés "opérons d'ARN". Chaque ARNm peut appartenir à plusieurs opérons formant l'ordre supérieur: "régulons d'ARN" (303).

#### a) Les AU-BPs déstabilisatrices

- TTP (Tristetraprolin) et BRF1 (Butyrate Response Factor 1)

La protéine TTP appartient à la famille Tis11, regroupant des protéines de liaison aux ARNm possédant des domaines en doigts de zinc Cys-Cys-Cys-His (CCCH) (Figure 30). Ce membre, qui possède deux doigts de zinc constitués de 18aa chacun, a été identifié dans une grande variété d'organismes de la levure à l'Homme. Les souris déficientes en Tristetraprolin sont viables mais développent néanmoins un syndrome complexe dont une arthrite inflammatoire, une dermatite, une cachexie, une auto-immunité et une hyperplasie myéloïde (304). Ce phénotype, très ressemblant à celui des souris surexprimant le TNF $\alpha$ , laissait suggérer qu'une surexpression du TNF $\alpha$  était impliquée dans le phénotype des souris TTP<sup>-/-</sup>. Le traitement des souriceaux avec un anticorps neutralisant dirigé contre le TNF $\alpha$  empêche, en effet, le développement de ce phénotype (304). En absence de TTP, les macrophages stimulés sécrétaient non seulement 5 fois plus de TNF $\alpha$  que les souris contrôles mais accumulaient aussi un taux d'ARNm 2 fois plus important à cause notamment d'une augmentation de leur demi-vie. La protéine TTP, en se fixant sur un élément ARE présent dans la région 3'NT de l'ARNm TNF $\alpha$ , est, en effet, capable de provoquer sa dégradation par la machinerie cellulaire (305).



**Figure 30: Structure des protéines TTP et BRF1.**

Les domaines en doigt de zinc sont noircis (RDBZn). Les pourcentages d'homologie de séquence entre TTP et BRF1 sont indiqués en dessous (d'après Lukke-Anderden, *J et al.*) (290).

Des travaux complémentaires ont permis de montrer que TTP est capable de se lier et d'entraîner dégradation d'autres ARNm-ARE, plus particulièrement ceux appartenant à la classe II tels que le *TNF $\alpha$* , *GM-CSF* (306), *IL-2* (307), *IL-10* (308) ou encore *CXCL1* (309) et *COX-2* (310). Elle possède cependant de nombreuses autres cibles puisque l'absence de protéines TTP, dans des lignées fibroblastiques dérivées de souris TTP<sup>-/-</sup>, entraîne la stabilisation d'environ 250 ARNm (311). La liaison de TTP à ses ARNm cibles dépend de l'intégrité de chacun de ses deux doigts de zinc, une mutation de ces sites empêchant totalement TTP de se lier à ses cibles (Figure 30) (312). Ces doigts de zinc montrent une plus grande affinité pour le pentamère entouré d'uridines (UAUUUAU).

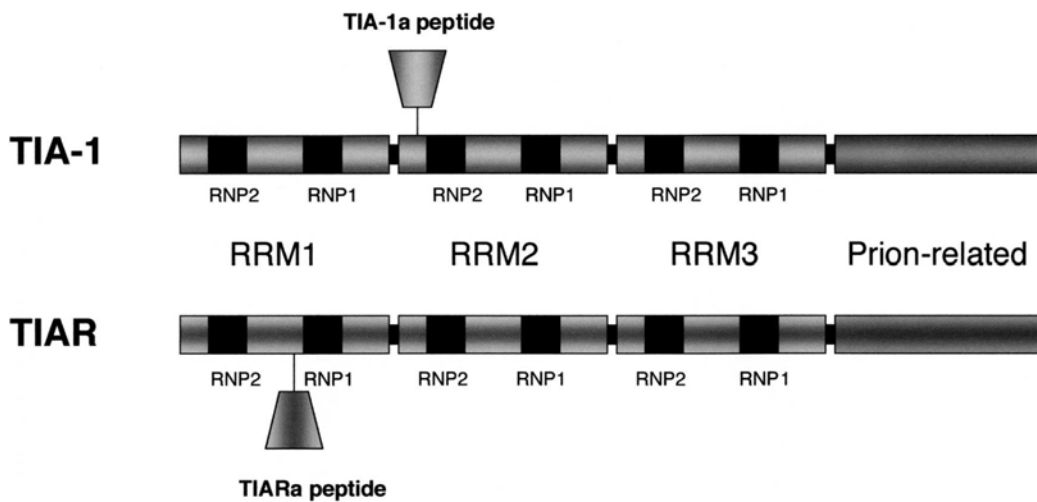
TTP est un gène majeur de la réponse précoce, sa transcription étant induite très rapidement par différents stimuli dont l'insuline (313) ou encore la LPS (314). Une fois produite, TTP est capable de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme grâce notamment à sa séquence d'export nucléaire (NES) dans la région N-terminale et à sa liaison à la protéine CRM1 (Chromosome maintenance 1) (315).

La protéine BRF1, aussi appelée ERF1 ou Berg36 (316-317) fait également partie de la famille Tis11. BRF1 possède deux domaines en doigt de zinc très homologues à ceux de TTP (Figure 30). BRF1, en se liant aux ARNm, induit comme TTP, leur dégradation. Malgré la séquence très conservée des domaines en doigt de zinc, les domaines N- et C- terminaux des protéines TTP et BRF1 sont peu homologues, ce qui permettrait d'expliquer la diversité de leurs cibles et de leur rôle (318). En effet, contrairement à TTP, les souris BRF1<sup>-/-</sup> décèdent au stade embryonnaire (319). De plus, contrairement à TTP, l'expression de BRF1 est restreinte aux organes périphériques tels que le cœur ou le foie lui conférant un rôle potentiel dans la régulation fine des gènes impliqués dans le rythme biologique (320).



**Figure 31: Structure de KSRP.**

KSRP contient 4 domaines "K-Homology" dans sa partie centrale qui permettent sa liaison à l'ADN (d'après Garcia-Mayoral *et al.*) (321).



**Figure 32: Structure des protéines TIA et TIAR.**

TIA et TIAR possèdent 2 domaines RRM et une séquence riche en glutamine. Chacune d'entre elle possède 2 isoformes dont une comprend une "petite séquence peptidique" (TIA-1a/ TIAR-1a peptide) supplémentaire dont la fonction reste inconnue. La région C-Terminale est assimilée à une région "prion" qui permet aux protéines de s'homodimériser. La partie N-terminale de ces 2 protéines est presque identique (entre 79% et 90% d'identité au niveau des domaines RRM) alors que les parties C-terminales ne sont identiques qu'à 50% (d'après Anderson, P; *et al.*) (197).

- *KSRP (K-homology-type slicing regulatory protein)*

KSRP a été initialement décrite comme une protéine appartenant au complexe d'initiation de l'épissage au niveau des neurones (322). Depuis, de nombreux rôles lui ont été assignés notamment dans la localisation des ARNm (323), la biogenèse des miRNAs (324), mais aussi dans la dégradation des ARNm-ARE (289). La partie centrale de KSRP est organisée en 4 domaines de liaisons aux acides nucléiques, appelés domaines KH, responsables de sa liaison sur ses cibles (Figure 31). Seuls 2 domaines KH de KSRP sont requis pour sa liaison aux ARNm-ARE (321). Parmi ses nombreuses cibles, KSRP compte les ARNm *c-fos*, *myoD*, *iNOS*, *p21* et *TNF $\alpha$*  (295). Alors que KSRP est une protéine exprimée de façon ubiquitaire, sa liaison sur ses ARNm cibles dépend fortement du contexte du motif ARE. La présence, par exemple, d'une séquence poly(C) autour du motif ARE empêcherait sa liaison, protégeant ainsi l'ARNm de la dégradation.

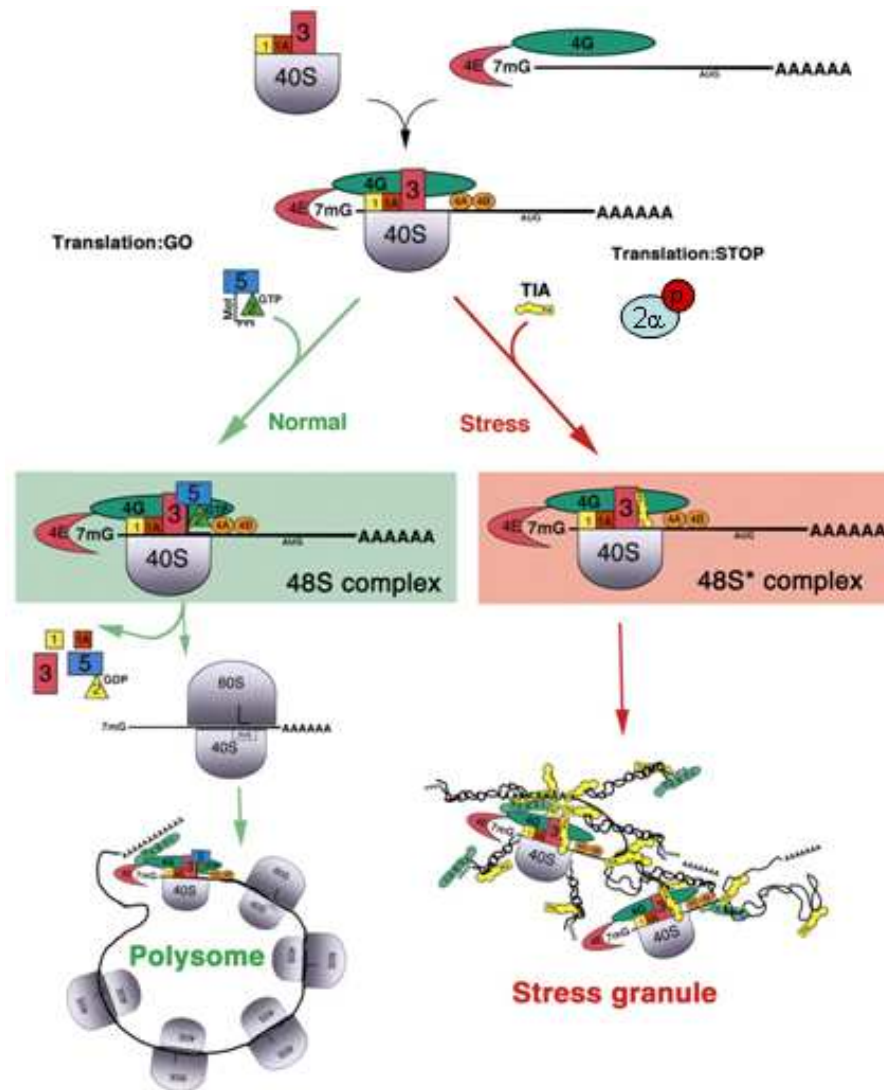
*b) Les AU-BP inhibitrices de la traduction*

- *TIA-1/TIAR*

Les protéines de liaisons aux ARNm, TIA-1 et TIAR, ne sont pas ubiquitaires et sont différenciellement exprimées selon le type cellulaire considéré (325). Elles sont impliquées dans le métabolisme des ARNm notamment dans l'épissage alternatif de pré-ARNm (326-327) et dans le contrôle de la traduction des ARNm-ARE (328-329). Ces protéines disposent de 3 domaines RRM dans leur région N-terminale et d'une riche en glutamine dans la queue C-terminale (Figure 32). Elles possèdent deux isoformes chacune, issues d'un épissage alternatif. Les isoformes TIA-1a et TIAR-1a possèdent une "petite région peptidique" supplémentaire de 11 et 17 aa respectivement qui n'est pas présente dans les isoformes b. La conséquence fonctionnelle de l'insertion de ces mini-exons pourrait être une modulation de leurs propriétés de liaison et plus particulièrement de leur spécificité de liaison envers leurs cibles (325, 330) (Figure 32).

La mutation des domaines RRM de TIA-1 et TIAR a permis de déterminer que les domaines RRM2 et RRM3 permettent leur liaison sur des séquences riches en uridine (331). Cependant, il a été décrit que TIA-1 et TIAR était également capables de se lier à des ARNm portant des motifs ARE de classe II et d'inhiber leur traduction (328-329).





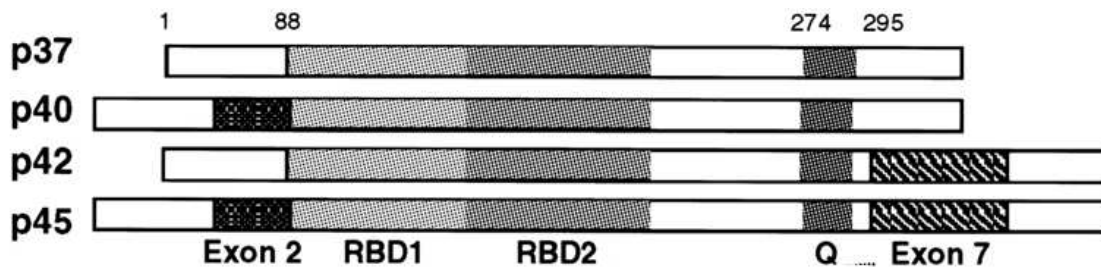
**Figure 33: Régulation de la traduction par les protéines TIA/TIAR.**

Dans des conditions normales (en vert), le complexe d'initiation 48S se forme et scanne l'ARNm jusqu'au premier codon d'initiation où l'ARNt-Met<sub>1</sub> est recruté. La reconnaissance de ce codon entraîne l'hydrolyse de la GTPase eIF<sub>2</sub> et le relargage des protéines du complexe d'initiation qui sont remplacées par la sous-unité ribosomale 60S, qui s'associe à la sous-unité 40S pour former le complexe 80S. Plusieurs ribosomes peuvent ensuite se lier à l'ARNm pour former un polysome. En réponse à un stress (en rouge), la protéine eIF2 $\alpha$  est phosphorylée et inactivée. TIA-1 est alors incluse dans le complexe d'initiation déficient (qui ne contient pas eIF2). TIA-1 s'agrège ce qui entraîne ensuite une accumulation de ces complexes au niveau des granules de stress (d'après Anderson P *et al.*) (332).

Plusieurs cibles de TIA-1 ou TIAR ont été décrites dont les ARNm *TNF $\alpha$*  ((328); (329), *GM-CSF*(328), *COX-2* (333), *MMP13* (334), ou  *$\beta$ -2 adrenergic receptor* (335) ou encore celui de la *caspase 8* (336). Une étude récente a par ailleurs permis de déterminer par des expériences d'immunoprécipitation à partir d'une lignée de macrophages que TIAR était capable de se lier spécifiquement à 779 ARNm dont 37% correspondent à des ARNm-ARE (337).

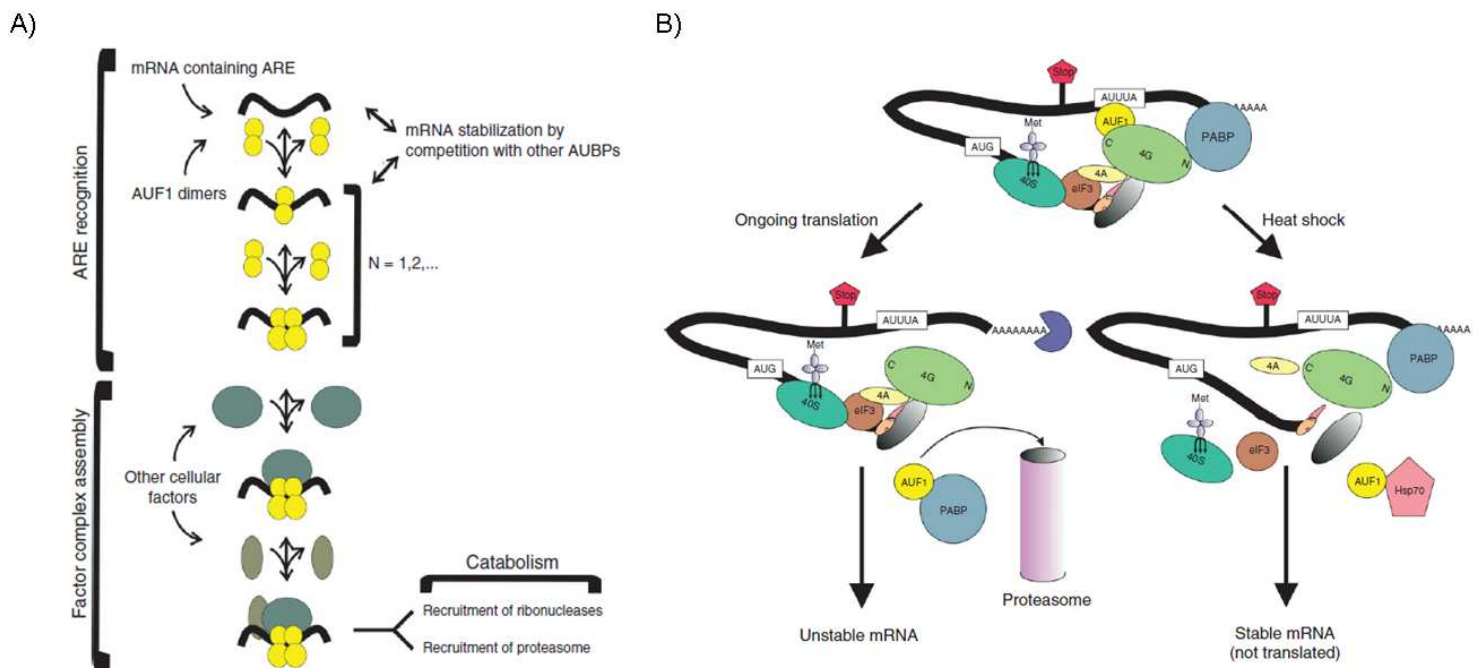
En plus de leur rôle dans la liaison aux ARNm, les domaines RRM vont jouer un rôle dans la localisation subcellulaire de ces protéines. Alors que TIA-1 et TIAR sont concentrées dans le noyau des cellules somatiques, des analyses révèlent qu'elles font la navette entre le noyau et le cytoplasme suite à un stress cellulaire (UV, choc thermique,...). Le domaine RRM2 et la moitié du domaine RRM1 permettraient son accumulation nucléaire alors que le domaine RRM3 permettrait son export au cytoplasme de manière CRM1 indépendante (338). La partie C-terminale (prion-related) permet, quant-à elle, aux protéines de TIA et TIAR s'homodomériser (339). Grâce à ces deux particularités, ainsi qu'à leur capacité à se lier aux ARNm, TIA-1 et TIAR participent à l'adaptation cellulaire face à un stress en s'accumulant au niveau des granules de stress (SGs) (339) (paragraphe III.A.3). Dans ces granules, TIA-1 et TIAR répriment la traduction des ARNm en interagissant notamment avec des protéines du complexe d'initiation de la traduction (48S) eIF-4F, eIF3 et la sous unité 40S (197) (Figure 33). Des études récentes ont montrées que TIA-1, en réprimant la traduction des ses ARNm cibles pouvait également favoriser la dégradation des ARNm (340).

Etant donnée la similarité de séquence entre TIA-1 et TIAR (Figure 32), elles pourraient avoir des effets redondants. Cependant, la divergence des phénotypes des souris TIA<sup>-/-</sup> et TIAR<sup>-/-</sup> laisse présumer que ces deux protéines ont des propriétés distinctes. En effet, alors que l'inactivation de TIAR est létale dans la quasi-totalité des cas, un plus grand nombre de souris TIA<sup>-/-</sup> peuvent survivre (329, 341). Les souris TIA<sup>-/-</sup> ne présentent pas de défaut majeurs et sont fertiles (329), alors que les quelques souris TIAR<sup>-/-</sup> qui survivent, présentent, quant à elle, un défaut de gamétogenèse et sont par conséquent stériles suite à un développement défectueux des cellules germinales (341). La stratégie de surexprimer TIAR à permis de déterminer que c'est une protéine cruciale de l'embryogénèse et que son expression doit être finement régulée de manière à coordonner correctement l'expression de ses gènes cibles (337). En effet, une surexpression trop importante du TIAR entraîne une mort *in utéro* (337).



**Figure 34: Structure des 4 isoformes d'AUF1.**

Les isoformes d'AUF1 possèdent deux domaines RRM ainsi qu'une région riche en glutamine impliquées dans la liaison aux ARNm (d'après Wagner, B.J., *et al.*) (342).



**Figure 35: Mécanisme d'action de AUF1 dans la dégradation/stabilisation des ARNm-ARE.**

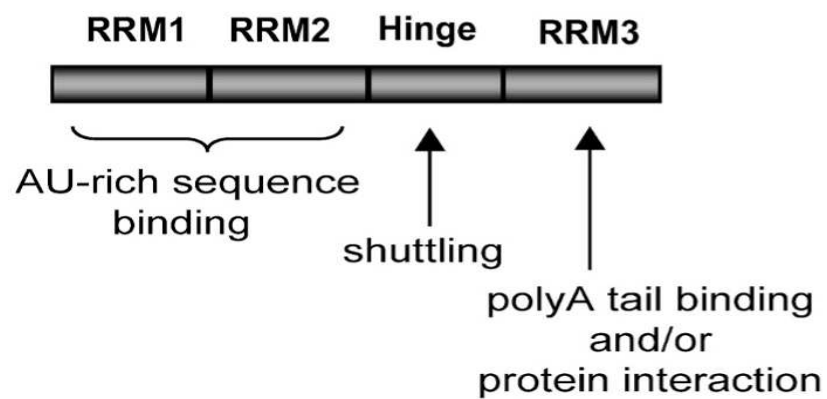
A gauche, est représenté le mécanisme par lequel AUF1 induit la dégradation de ses ARNm cibles suite à sa dimérisation. A droite, est représenté le mécanisme d'action d'AUF1 selon les conditions cellulaires. En absence de stress cellulaire, AUF1 interagit avec la protéine PABP entraînant une ouverture de l'ARNm et l'accessibilité de la queue poly(A) aux déadénylases suivie d'une dégradation des ARNm selon le mécanisme AMD. En réponse à un choc thermique, AUF1 est séquestrée par la protéine chaperonne Hsp70, ce qui permet à l'ARNm de conserver sa conformation circulaire stable, le protégeant de la dégradation. (D'après Gratacos *et al.*) (343).

c) AUF1 : destabilisatrice ou stabilisatrice, selon le contexte cellulaire

AUF1 (AU factor 1), appelée également hnRNPD, est un membre de la famille hnRNP (Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins). Ces protéines exercent un rôle central dans la réparation de l'ADN, la régulation de la transcription et de la traduction. AUF1 est une des AU-BPs les mieux caractérisées parmi celles qui sont impliquées dans le contrôle de la demi-vie des ARNm-ARE (344). Cette protéine possède la structure classique des RBPs avec 2 domaines RRM différents et une région supplémentaire riche en glutamines dans la partie C-terminale (Figure 34). Ces régions sont requises pour sa liaison aux motifs ARE.

L'épissage alternatif du transcrit primaire d'AUF1 permet l'excision ou non de 2 exons: l'exon 2 en 5', long de 19 aa et l'exon 7 en 3', long de 49 aa. Cet épissage alternatif aboutit à l'obtention de 4 isoformes différents  $p37^{AUF1}$ ,  $p40^{AUF1}$ ,  $p42^{AUF1}$ ,  $p45^{AUF1}$  (Figure 34) (342). Ces isoformes vont avoir, en fonction notamment de la présence de l'exon 2, une affinité plus ou moins forte pour leurs ARNm cibles ( $p40 > p45 > p42 > p37$ ) modifiant ainsi l'activité de AUF1 sur ses cibles. AUF1 est capable de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme. Cependant, la présence de ces exons "alternatifs" va également modifier la présence des séquences NLS ou NES. L'épissage de l'exon 7 permet de former une séquence d'import nucléaire dans les isoformes  $p37$  et  $p40$  qui n'apparaît pas dans les isoformes  $p42$  et  $p45$ . L'exon 7 permet cependant d'apporter une séquence d'export cytoplasmique dans ces 2 isoformes (342).

La fonction "déstabilisatrice" d'AUF1 a été la première rapportée (345). Ce rôle a ensuite été confirmé par de nombreuses études via la surexpression ou la diminution de l'expression de cette protéine (346-347), ou bien l'utilisation d'ARNm chimériques (348). Le modèle de dégradation des ARNm-ARE induit par AUF1 fait intervenir sa liaison aux motifs ARE sous la forme d'oligomères grâce à l'association préalable de dimères (349) (Figure 35, gauche). La liaison de ce complexe empêcherait la liaison des AU-BPs stabilisatrices et permettrait de recruter des facteurs *trans* supplémentaires dont le facteur d'initiation de la traduction eIF4G, la PABP ou des protéines chaperonnes comme Hsp27 ou Hsp70 et d'autres protéines encore inconnues formant le complexe ASTRC (AUF1 and signal transduction-regulated complex) (Figure 35, droite) (350). AUF1 favoriserait la dégradation des ARNm via l'AMD en détachant la protéine PABP du complexe exposant ainsi la queue poly(A) aux ribonucléases (Figure 35, droite).



**Figure 36: Structure de l'AU-BP HuR.**

HuR possède trois domaines RRM (RNA recognition motifs). Les domaines RRM1 et RRM2 se lient aux séquences riches en Adénine et Uridine. La région RRM3 se lie à la queue poly(A) et permet d'interagir avec d'autres protéines. La région "Hinge" contient les domaines de localisation nucléaire et d'export nucléaire (d'après Hinman MN. *et al.*) (351).

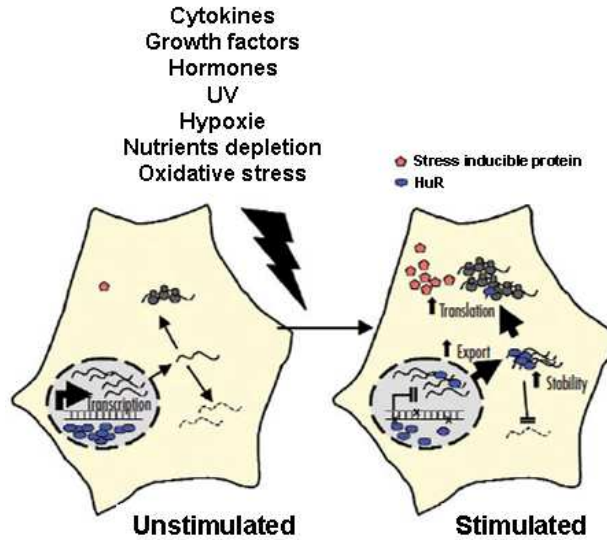
En plus du mécanisme général de dégradation AMD, AUF1 semblerait dégrader ses ARNm cibles par un mécanisme supplémentaire dans lequel AUF1 serait ubiquitinylée puis dégradée par le protéasome en association avec ses ARNm-ARE cibles (352).

Cependant, les effets d'AUF1 sur ses ARNm cibles dépendent essentiellement du contexte cellulaire (353). En effet, de nombreuses études rapportent que l'induction d'un choc thermique ou encore la surexpression des différents isoformes d'AUF1 induisent la stabilisation de ses ARNm-ARE cibles appartenant à différentes classes (353) (classe I ou II selon ARED3 (277)). Un modèle de stabilisation a été rapporté: lors d'un choc thermique, la protéine chaperonne Hsp70 capturerait AUF1 entraînant sa dissociation de la protéine PABP. La protéine PABP, restant ainsi liée aux ARNm, les protégerait de la dégradation et par conséquent les stabiliserait (352) (Figure 35, droite).

## **E. L'AU-Binding Protein HuR (Elavl1)**

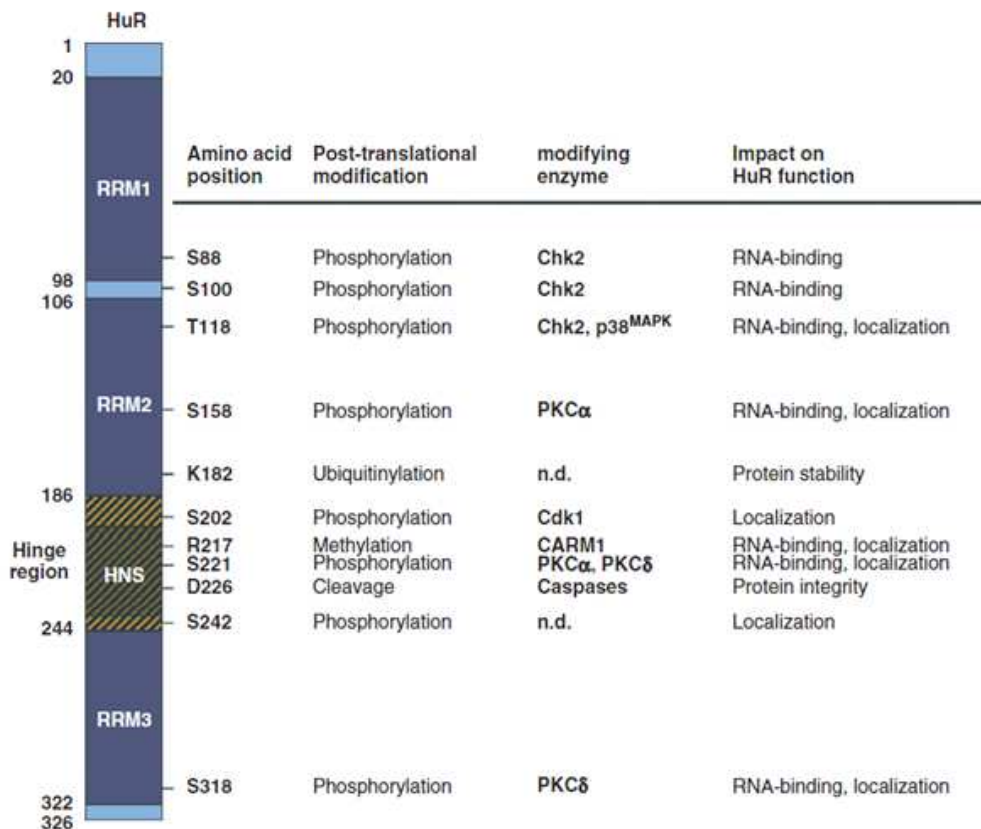
### **1. Structure**

HuR (Hu Antigen R) ou encore ElaV-like1 (Embryonic Lethal Abnormal Vision 1) est le seul membre ubiquitaire de la famille des protéines Hu. Les trois autres membres de cette famille (HuB, HuC, HuD) sont en effet exprimés dans le tissu nerveux (354). Ces protéines possèdent 3 domaines RRM (RRM 1-3) très homologues (>90% d'homologie au niveau de la séquence protéique). La structure cristallographique de HuD montre que les domaines RRM1 et RRM2 (Figure 36) forment un feuillet  $\beta$  commun à de nombreuses protéines de liaison aux ARNm lui permettant de se lier plus spécifiquement aux motifs ARE (355). Cependant, des expériences d'immunoprécipitation de complexes HuR/ARNm, réalisées à partir de cellules de cancers colorectaux humains, ont révélé que HuR pouvait également se lier à des séquences constituées uniquement de résidus uridines, localisées dans la région 3'NT de certains ARNm (356). Le domaine RRM3 permet, quant à lui, l'oligomérisation de la protéine HuR et l'interaction avec d'autres protéines (Figure 36) (357). En plus de ces domaines très conservés, les protéines HuR possèdent entre les domaines RRM2 et RRM3, une région basique appelée Hinge ou HNS (HuR Nucleo-cytoplasmic shuttling sequence) qui leur permet de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme (Figure 36) (358). Récemment, cette région HNS a été décrite pour intervenir également dans la stabilisation des complexes HuR/ARNm (357).



**Figure 37: Schéma représentant les mécanismes de régulation de l'expression géniques en réponse à un stress.**

Alors que dans des cellules non stimulées, la protéine HuR est localisée majoritairement au noyau, un stress extracellulaire (UV, Hypoxie, déplétion en nutriments, cytokines, facteurs de croissances,..) va induire une délocalisation de HuR au cytoplasme ce qui va aboutir à une augmentation de la stabilité et du niveau de traduction d'un grand nombre d'ARNm-ARE ( adapté de Gorospe M *et al.*) (359).



**Figure 38: Modifications post-traductionnelles de HuR.**

La position des résidus spécifiquement impliqués (première colonne) dans des modifications post-traductionnelles (seconde colonne) et les kinases, activées suite à des stress extracellulaires responsables de ces modifications (troisième colonne), sont listées. Les conséquences des modifications de chacun de ces résidus sur l'activité de HuR sont listées dans la quatrième colonne (d'après Abdelmohsen *et al.*) (360).

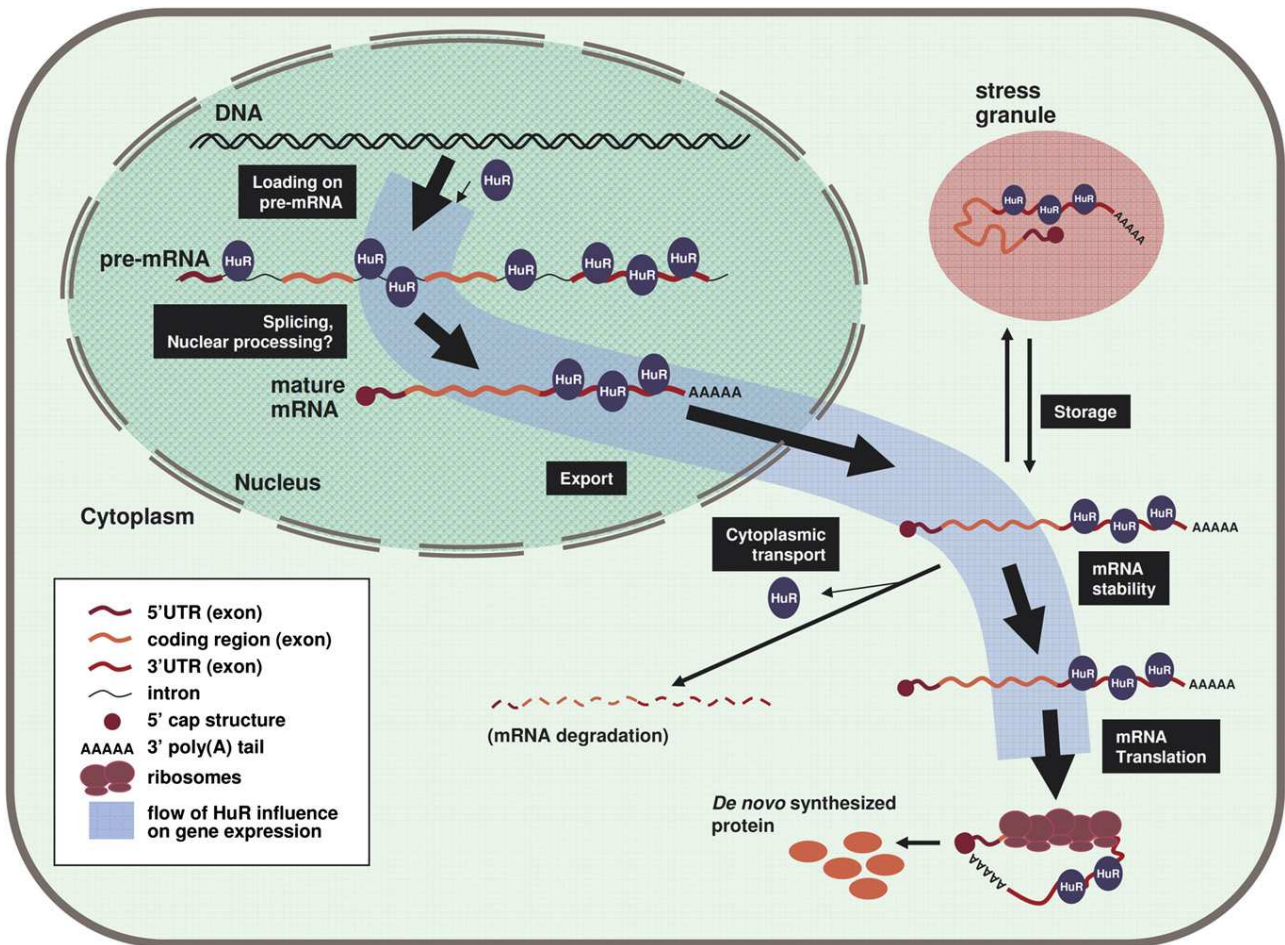
## **2. Modifications post-traductionnelles et modulation des propriétés biologiques de HuR**

Alors que HuR est majoritairement nucléaire, sa translocation au cytoplasme a été reliée à sa capacité à stabiliser et/ ou à moduler le niveau de traduction de ses ARNm cibles (361). L'export nucléaire de HuR est induit par son association avec les protéines nucléaires pp32 et APRIL qui, grâce à des motifs d'exports nucléaires (NES), sont reconnues et prises en charge par la protéine d'export CRM1. A l'inverse, l'import de HuR se fait grâce à son association avec les transportines 1 et 2 (362-364).

La délocalisation de HuR au cytoplasme dépend d'une grande variété de stimuli externes comme les cytokines, les facteurs de croissances, les médiateurs de l'inflammation et les hormones, ou encore l'irradiation aux UV, l'hypoxie, les carences en nutriments et les stress oxydatifs (Figure 37). Tous ces stimuli vont déclencher l'activation de multiples voies de signalisation et aboutir à des modifications post-traductionnelles de HuR à l'origine de ce changement de localisation subcellulaire (Figure 38). Cependant ces modifications post-traductionnelles vont aussi moduler son affinité envers ses ARNm cibles (Figure 39) (365). Une dizaine de modifications post-traductionnelles de HuR modulant ses propriétés biologiques (localisation et affinité envers ses ARNm cibles) a été répertoriée en aval de ces voies. Parmi elles, on retrouve des ubiquitinations, des méthylations, mais surtout des phosphorylations (Figure 38).

La majorité des modifications post-traductionnelles qui vont moduler la localisation subcellulaire de HuR sont celles qui ciblent des résidus sérines ou thréonines localisées dans la région HNS. Parmi elles, la phosphorylation de la Ser 221 (366) par la kinase PKC $\delta$  ainsi que la méthylation de l'arginine R217 par la méthyltransférase CARM1 (367) vont favoriser l'export de HuR au cytoplasme alors que la phosphorylation de la Ser 202 (368) ou encore de la Ser 242 (369) par la kinase Cdk1 vont entraîner la séquestration de HuR au noyau (368). Aucune étude n'a pour l'instant déterminé pourquoi ces modifications sur le domaine HNS n'ont pas les mêmes effets sur le trafic nucléo-cytoplasmique de HuR. La seule différence est la position centrale de la Ser 221 et de l'Arg 217 dans la région HNS par opposition à la localisation plus externe des résidus Ser 202 et Ser 242. Kim et Gorospe ont ainsi suggéré que la position d'une modification post-traductionnelle dans la région HNS s'apparente à un interrupteur pour l'export de HuR (370). Ces modifications post-traductionnelles pourraient alors favoriser ou empêcher la liaison de HuR à ses protéines d'export dont pp32 et APRIL ou entraîner sa liaison à des protéines chaperonnes qui la retiendraient au noyau.





**Figure 39: Fonctions nucléaires et cytoplasmiques de HuR.**

Grâce à sa capacité de liaison à des séquences introniques et exoniques, HuR régule l'expression génique depuis l'épissage du pré-ARNm jusqu'à la traduction de l'ARNm mature, en passant par les processus de stabilisation/dégradation (d'après Srikantan S. *et al.*) (371).

C'est par exemple le cas de la phosphorylation de HuR sur la Ser 202 par la kinase Cdk1 qui induit sa rétention au noyau via sa liaison à la protéine chaperonne 14.3.3.(368).

Ces modifications post-traductionnelles peuvent également altérer l'abondance de la protéine HuR une fois localisée dans le cytoplasme. Par exemple, l'ubiquitination de HuR sur le résidu proline, K182, entraîne sa dégradation par le protéasome. Lors d'un choc thermique, cette ubiquitination est inhibée par la kinase Chk2 permettant ainsi de conserver une quantité importante de protéines HuR dans le cytoplasme et de favoriser *in fine* la survie cellulaire (372).

Des phosphorylations dans les domaines RRM1, RRM2 et RRM3 ont également été décrites. Alors que l'impact de ces modifications sur la localisation de HuR n'est pas claire, leur rôle sur l'affinité de HuR pour ses ARNm cibles est plus documenté. Par exemple, la phosphorylation du domaine RRM3 au niveau de la Ser 318 par la PKC $\delta$  augmente la liaison de HuR sur ses ARNm cibles *Cyclin D1*, *Cyclin A* ou encore *Cox-2* (366). Néanmoins ces phosphorylations peuvent également et, à l'inverse perturber l'affinité de HuR pour ses cibles. C'est le cas, par exemple, de la phosphorylation de HuR sur la Ser 100 par la kinase du checkpoint Chk2, activée suite à un stress oxydatif, qui induit une dissociation du complexe ARNm *SIRT1*/HuR associée une déstabilisation de cet ARNm (373).

### **3. Fonctions**

La protéine HuR module l'expression génique à plusieurs niveaux depuis l'épissage du pré-ARNm jusqu'à la traduction de l'ARNm mature, en passant par les processus de stabilisation/dégradation (Figure 39). Deux études récentes ont en effet montré, qu'en plus de se lier au niveau de la région 3'NT des ARNm, HuR pouvait se fixer au niveau des exons et des introns des pré-ARNm (374-375), cette caractéristique suggérant que HuR pourrait être impliquée dans le couplage de la maturation et de la stabilité des ARNm (374-375).

Target mRNA	Binding Site	Influence on mRNA	Function
Cyclin D1	3'UTR	Stability ↑	Proliferation
Cyclin E1	3'UTR	Stability ↑	Proliferation
Cyclin A2	3'UTR	Stability ↑ Translation ↑	Proliferation
Cyclin B1	3'UTR	Stability ↑	Proliferation
p27	5'UTR	Translation ↓	Proliferation, survival
EGF	3'UTR	↑ (n.d.)	Proliferation, survival
eIF4E	3'UTR	Stability ↑	Proliferation, survival
ProT $\alpha$	3'UTR	Translation ↑	Proliferation, survival
Bcl-2	3'UTR	Stability ↑ Translation ↑	Survival
Mcl-1	n.d.	Stability ↑	Survival
SIRT1	3'UTR	Stability ↑	Survival
p21	3'UTR	Stability ↑	Proliferation, survival
Mdm-2	n.d.	Stability ↑	Survival
c-Myc	3'UTR	Translation ↓	Proliferation, survival
HIF-1 $\alpha$	5'UTR, 3'UTR	Stability ↑	Angiogenesis, survival
VEGF	3'UTR	Stability ↑ Translation ↑	Angiogenesis, proliferation
COX-2	3'UTR	Stability ↑	Angiogenesis
TSP1*	3'UTR	Translation ↑	Angiogenesis
TGF- $\beta$	3'UTR	↑ (n.d.)	Immunity/inflammation
Snail	3'UTR	Stability ↑	Invasion
MMP-9	3'UTR	Stability ↑	Invasion
uPA	3'UTR	Stability ↑	Invasion
UPAR	3'UTR	Stability ↑	Invasion
BRCA1	3'UTR	↓ (n.d.)	Tumor suppression
Wnt5a	3'UTR	Translation ↓	Oncogenesis
c-fms	3'UTR	Stability ↑	Oncogenesis
ARHI	3'UTR	Stability ↑	Tumor suppression

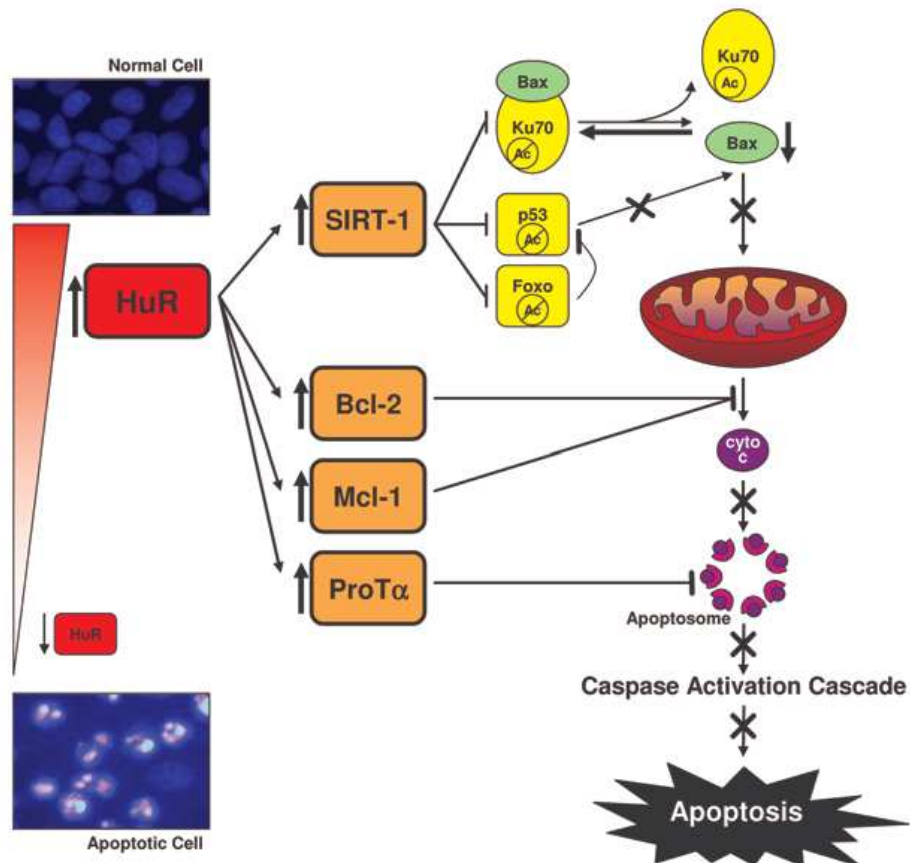
**Tableau 6: Exemples d'ARNm dont la stabilité et le niveau de traduction sont modulés par HuR (d'après Abdelmohsen *et al.*) (360)**

a) Fonctions nucléaires de HuR

Dans le noyau, HuR fonctionne comme régulateur de l'épissage alternatif (376) et de la polyadénylation des ARNm (377). Des travaux ont en effet démontré qu'en se liant au niveau d'éléments répresseurs de l'épissage des exons (URE6) (375), HuR permet le recrutement de protéines de l'épissage (U2AF65) et favorise l'excision de l'exon 6 du pré-ARNm codant le récepteur Fas (376). Par ailleurs, HuR, en se liant sur certains pré-ARNm au niveau de motifs riches en uridines, empêcherait le clivage et la polyadénylation des ARNm nouvellement synthétisés en interagissant et en empêchant la liaison de protéines CstF64 et CSPF160 impliquées dans la polyadénylation (377-378). Etant donné la caractéristique de HuR à se lier sur des séquences introniques et l'origine intronique de la majorité des miRNAs, un groupe a déterminé l'impact d'une déplétion de HuR sur l'expression des petits ARNs non codants (375). Ainsi, Lebedeva *et al.* (375) ont très récemment séquencé l'ensemble des miRNAs exprimés dans des cellules Hela invalidées ou non pour l'expression de HuR. Dans ces cellules, l'expression du *miRNA-7* est apparue fortement diminuée en absence de HuR. L'identification d'un site de liaison de HuR au niveau de l'intron et de l'exon encadrant le locus de ce miRNA a permis de suggérer que la liaison de HuR pouvait directement favoriser l'excision de l'intron du gène *HNRNPK* réfugiant le précurseur du *miRNA-7* (375) (Figure 39).

b) Fonctions cytoplasmiques de HuR

Une fois dans le cytoplasme et selon le contexte cellulaire, HuR va moduler la stabilité et le niveau de traduction de nombreux ARNm-ARE (Tableau 6) et par conséquent influencer leur localisation subcellulaire notamment au niveau des P-Bodies ou des granules de stress (Figure 39). En régulant de manière coordonnée l'expression d'ARNm fonctionnellement apparentés (Tableau 6), HuR exerce ainsi une régulation globale des fonctions biologiques de la cellule. En voici quelques exemples :



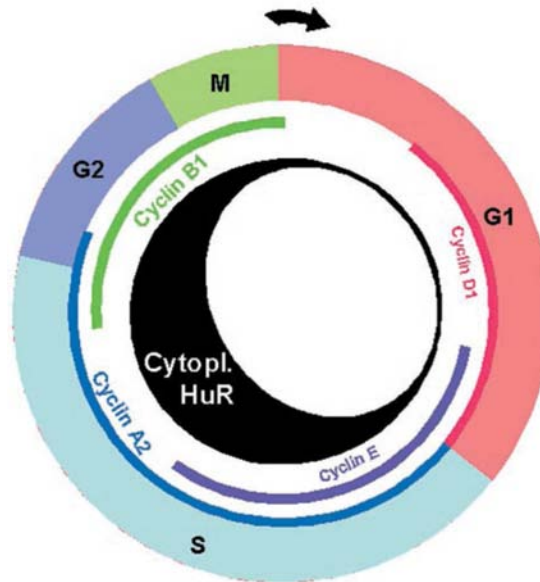
**Figure 40: Représentation schématique de l'influence de HuR sur l'apoptose.**

En réponse à un stress, la quantité de HuR augmente dans le cytoplasme et provoque une accumulation de protéines anti-apoptotiques (en orange). Parmi elles, SIRT-1 va empêcher la perméabilisation de la membrane mitochondriale induite par Bax en déacétylant des effecteurs (protéines jaunes), BCL-2 et MCL-1 vont empêcher le relarguage du cytochrome c et enfin, la prothymosin  $\alpha$  va inhiber la formation de l'apoptosome (d'après Abdelmohsen, K. *et al.*) (379).

- Survie cellulaire

L'inactivation du gène *HuR* est létale au stade embryonnaire notamment à cause d'un défaut de morphogénèse et de vascularisation du placenta dans les souris *HuR*<sup>-/-</sup> (380). Cependant, l'utilisation d'un modèle de souris transgéniques CRE-lox inducible au tamoxifène a permis d'identifier l'impact d'une délétion de *HuR* dans des souris après leur naissance. Cette délétion entraîne une atrophie des organes hématopoïétiques, une perte importante des villosités intestinales, une entérocolite obstructive entraînant la mort des souriceaux aux alentours du 10<sup>ème</sup> jour. Ce phénotype est le résultat d'une entrée en apoptose des cellules en prolifération telles que les cellules progénitrices de la moelle osseuse, du thymus et de l'intestin (381), suggérant que *HuR* a donc un rôle crucial dans la survie des cellules en cycle.

En effet, en contrôlant l'expression de facteurs pro- et anti- apoptotiques, *HuR* peut induire ou inhiber la mort cellulaire programmée. En réponse à un stress sévère, *HuR* augmente l'apoptose, alors qu'en condition de faibles stress, *HuR* favorise la survie cellulaire. Ainsi, dans le cytoplasme, *HuR* peut agir en aval de la mitochondrie en favorisant par exemple la stabilisation et la traduction de l'ARNm *SIRT1* (373) qui code une déacétylase. *SIRT1* induit une déacétylation des facteurs pro-apoptotiques Ku70, p53 et FOXO-3a, ce qui empêche la perméabilisation de la membrane mitochondriale induite par Bax. De plus, la protéine *HuR*, en induisant la stabilisation des ARNm *Bcl-2* (B-cell lymphoma-2) (382) et *Mcl-1* (Myeloid cell leukemia-1) (379) codants des facteurs anti-apoptotiques, va indirectement empêcher la libération du cytochrome C. Enfin, *HuR* va participer à l'inhibition de la formation de l'apoptosome en augmentant la traduction de l'ARNm *ProTα* (Prothymosin  $\alpha$ ) (383). Dans des conditions de stress très important, comme par exemple des UVC, *HuR* peut, au contraire, augmenter la traduction des ARNm codants des protéines pro-apoptotiques tels que p53 (384), le cytochrome c (385) ou encore p27(386) pour entraîner la mort cellulaire programmée (Figure 40).



**Figure 41: Influence de la localisation cytoplasmique de HuR et de la régulation des protéines du cycle cellulaire.**

La quantité de protéines HuR dans le cytoplasme augmente à la fin de la phase G1. Elle atteint un pic d'expression lors de la phase S et la phase G2/M durant lesquelles HuR stabilise les ARNm codant les cyclines A2 et B1 respectivement. L'expression de HuR est ensuite à nouveau diminuée en entrée de phase G1. HuR stabilise aussi les ARNm codants les cyclines D1 et E mais, en raison de sa faible expression pendant la phase G1, ce mécanisme est moins clair. Les différentes phases du cycle ainsi que les cyclines actives à chaque phase sont indiquées en couleur dans le schéma (d'après Kim, H *et al.*) (370).

- Contrôle du cycle cellulaire

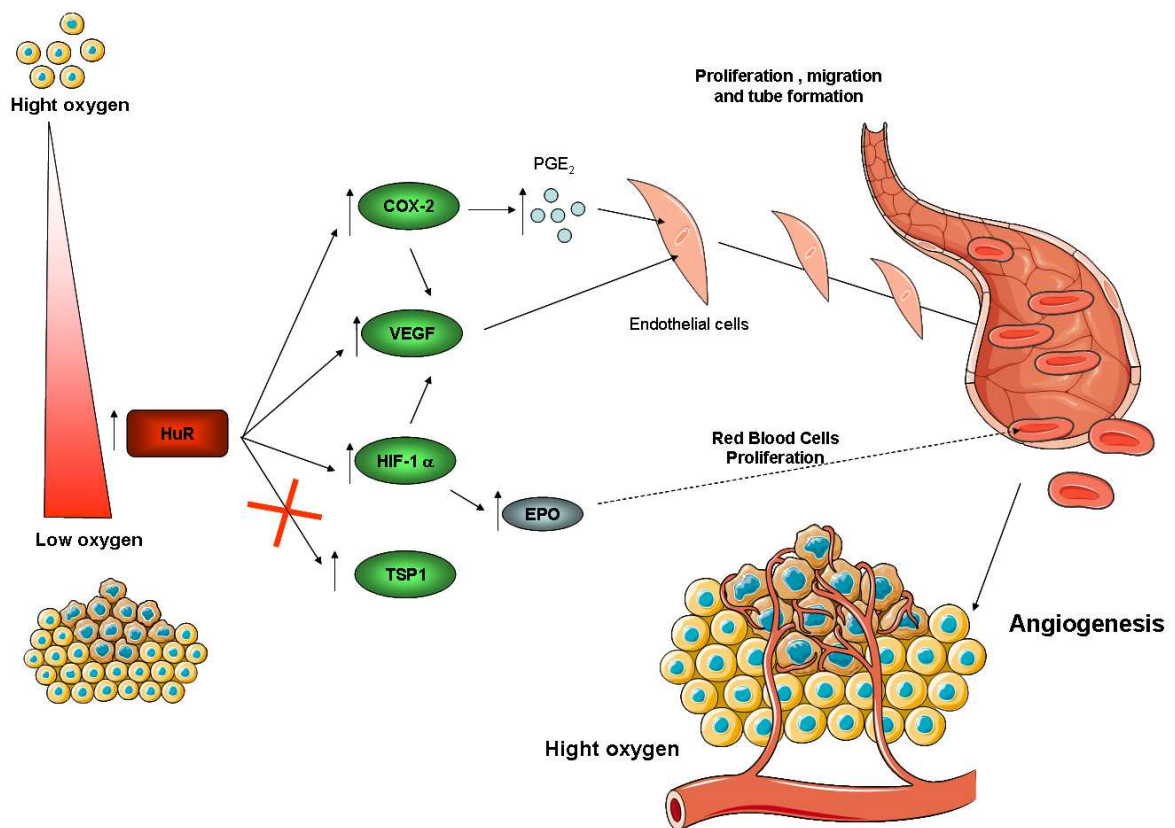
L'abondance de la protéine HuR dans le cytoplasme est fortement régulée lors du cycle cellulaire. En effet, alors que de faibles taux d'HuR sont rapportés dans le cytoplasme de cellules synchronisées en phase G1, la protéine HuR s'accumule abondamment dans le cytoplasme durant la phase S et la phase G2/M. La localisation subcellulaire de HuR durant le cycle ne dépend pas d'une exposition à un stress particulier. Cependant, il est probable que ce soit les mêmes kinases et par conséquent les mêmes modifications post-traductionnelles qui soient impliquées dans cette délocalisation cyclique (paragraphe III.E.2) (370) (Figure 41).

Lors d'un cycle, la protéine HuR va réguler la stabilité d'ARNm codants des protéines cruciales dans la régulation du cycle cellulaire. En effet, HuR induit la stabilisation des ARNm codants la cycline A2 (nécessaire pour la progression des phases S et G2) et la cycline B1 (dans la transition G2/M) (387). De plus, HuR empêche la dégradation des ARNm de la cycline D1 (388) (responsable de la progression jusqu'à la phase G1) et de la cycline E (389) (active pendant les phases G1 et S) dans des lignées de cancer du sein (Figure 41). Par ailleurs, HuR est capable d'inhiber la traduction d'ARNm codants des inhibiteurs des cyclines (CDK) comme par exemple *p27* (386). Cette protéine étant aussi pro-apoptotique, la diminution de son expression favorise donc à la fois la prolifération et la survie cellulaire.

- L'angiogenèse

L'angiogenèse est un processus permettant la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins (néovascularisation) à partir de vaisseaux préexistants. C'est un processus physiologique normal, que l'on retrouve notamment lors du développement embryonnaire. Mais c'est aussi un processus pathologique, primordial dans la croissance des tumeurs malignes et le développement des métastases. Cette néovascularisation est induite par des facteurs proangiogéniques sécrétés par des cellules qui présentent des carences en oxygène (hypoxie) ou en nutriments. Or en condition d'hypoxie, HuR est délocalisée au cytoplasme et va favoriser la formation de néo-vaisseaux en augmentant la production des facteurs proangiogéniques et en diminuant celle des facteurs anti-angiogéniques (Figure 42). Par exemple, HuR favorise la traduction de l'ARNm codant pour le facteur de transcription HiF-1 $\alpha$  (390-391). HiF-1 $\alpha$  entraîne la transcription de nombreux ARNm dont celui codant pour le VEGF et l'érythropoïétine (EPO) (391).





**Figure 42: Représentation schématique de l'influence de HuR sur l'angiogénèse.**

En condition d'hypoxie, la quantité de protéines HuR augmente dans le cytoplasme. Elle va moduler la stabilité et/ou le niveau de traduction des ARNm codant des protéines proangiogéniques (VEGF, Cox-2, HIF-1 $\alpha$ ) et des protéines anti-angiogéniques, dont TSP-1 (en vert). Ces protéines vont indirectement favoriser d'une part, la prolifération des cellules endothéliales des vaisseaux préexistants, leur migration et la formation de nouveaux vaisseaux et d'autre part, vont entraîner la production des hématies. L'ensemble de ces événements va favoriser la néovascularisation et permettre l'apport d'oxygène et de nutriments aux cellules initialement hypoxiques (Schéma réalisé d'après les données bibliographiques).

De manière coordonnée, HuR va favoriser la stabilisation et la traduction des ARNm *VEGF* (392) et *cyclooxygénase-2* (*Cox-2*) (393). *Cox-2* va ensuite permettre la sécrétion de prostaglandines E2 (PGE2) (394). La prostaglandine E2 et le VEGF sécrétés vont induire la prolifération et la migration des cellules endothéliales des vaisseaux préexistants pour former de nouveaux vaisseaux à proximité des cellules hypoxiques (395). L'EPO sécrétée, va quant à elle, induire la prolifération des hématies qui favoriseront l'apport de nutriments et d'oxygène à ces cellules (391). Enfin, la perte d'affinité de HuR pour l'ARNm *TSP1* (thrombospondin-1), qui code pour une protéine anti-angiogénique, va entraîner une diminution de sa traduction et par conséquent n'empêchera pas la formation de néovaisseaux (396) (Figure 42).

- L'inflammation

Des nombreuses études ont permis de déterminer que HuR est impliquée dans la stabilisation d'ARNm codant des cytokines pro-inflammatoires telles que le  $TNF\alpha$  (397), IL-4 (398) GM-CSF(399) , IL-6, IL-8 (400) et des médiateurs de l'inflammation tel que *Cox-2* (401). Cependant, l'analyse de souris transgéniques surexprimant la protéine HuR montre que la régulation des cytokines par HuR est plus complexe (402). Comme l'on pouvait s'y attendre compte tenu du rôle de cette AU-BP, il y a bien une augmentation de la stabilité des ARNm *TNF $\alpha$*  et *Cox2* dans les cellules myéloïdes qui surexpriment le transgène. Cependant, malgré cette stabilisation, HuR, en synergie avec la protéine TIA-1, inhibe la traduction de ses deux ARNm cibles (*TNF $\alpha$*  et *Cox2*) ne permettant pas l'induction de la réponse inflammatoire. HuR serait donc finalement un modulateur négatif de la réponse inflammatoire (402).

- La migration cellulaire

La migration cellulaire est un phénomène fondamental qui correspond au mouvement des cellules au sein de leur environnement. La migration permet la mise en place des tissus et des organes au cours du développement des organismes, l'acheminement des cellules immunitaires vers les lieux d'infections, la cicatrisation des tissus lésés ou encore la dissémination des cellules tumorales au cours des métastases. Ce processus implique des changements d'interaction avec le microenvironnement et l'augmentation de l'activité des protéases extracellulaires. En réponse à un stress oxydatif, il a été décrit que HuR pouvait induire la stabilisation de l'ARNm *Snail*, codant un facteur de transcription responsable de la transition épithélio-mésenchymateuse, étape favorisant la migration (403). Par ailleurs, HuR favorise la stabilisation d'ARNm codant des protéases impliquées dans la digestion de la matrice extracellulaire nécessaire à la migration: MMP9 (404) et Urokinase A et son récepteur (uPA et uPAR), (405).



#### 4. Mécanisme d'action

Les mécanismes par lesquels HuR induit la stabilisation et augmente l'efficacité de traduction de ses ARNm cibles ne sont aujourd'hui pas clairement établis même si plusieurs hypothèses sont proposées. Il est aujourd'hui bien établi que les AU-BPs peuvent se lier sur des sites ARE-communs. Des études de FRET démontrent, par exemple, que la protéine HuR et la protéine destabilisatrice AUF1 peuvent être liées simultanément à un même ARNm-ARE (406). Cette observation permet donc d'imaginer un premier modèle dans lequel HuR serait capable d'antagoniser les effets destabilisateurs des AU-BPs en recrutant les protéines de la traduction et/ou en empêchant le recrutement de la machinerie de dégradation (406). Or, le second modèle voudrait que HuR entraîne la stabilisation de ses ARNm cibles en empêchant la fixation d'AU-BPs destabilisatrices. En effet, HuR est capable de s'homodimériser (406) puis de former des oligomères via son domaine RRM3 (357, 407). Une étude avait déjà montré que l'absence de la région RRM3 affectait la fonction stabilisatrice de HuR. Dans cette étude, HuR, ne pouvant pas s'oligomériser, était incapable de se lier à ses ARNm cibles ce qui aboutissait à leur destabilisation (408). Ces données laissent donc penser que la liaison de HuR sous la forme d'oligomères sur les ARNm-ARE pourrait potentiellement bloquer la liaison des protéines destabilisatrices.

A contrario, quelques articles décrivent un effet "destabilisateur" de HuR sur certaines cibles (409). Cet effet serait dû à des mécanismes de collaboration avec des miRNAs (décrit paragraphe III.F) ou avec des AU-BPs destabilisatrices. Une étude récente montre, par exemple, que HuR et AUF1 collaborent pour induire la destabilisation de l'ARNm *p16INK4* (409). Dans cet exemple, la destabilisation de cet ARNm se fait grâce à l'intervention du complexe RISC (409).

En ce qui concerne son effet sur le niveau de traduction des ARNm-ARE, HuR peut soit agir en tant qu'activateur soit en tant que répresseur. D'une part, HuR favorise la traduction en se liant soit sur la région 3'NT (*cytochrome c* (385) ou *p53* (384)) soit sur la région 5'NT (*HIF-1 $\alpha$*  (390)) de ses cibles. Sans affecter la stabilité de ces ARNm-ARE, HuR va ainsi favoriser leur engagement dans les polysomes et induire l'initiation de leur traduction.



D'autre part, HuR peut diminuer l'efficacité de traduction de ses ARNm cibles. Les exemples les mieux caractérisés impliquent la liaison de HuR sur la région 5'NT de certaines de ses cibles. HuR a été décrite pour se lier par exemple au niveau de la région 5'NT de l'ARNm *p27* et d'en inhiber la traduction (386). Suite à une inhibition de l'initiation de la traduction dépendante de la coiffe par un stress intracellulaire (inhibiteur de PI3K), HuR se lie à des séquences riches en uridine sur l'ARNm *p27* provoquant une inhibition de sa traduction initiée au niveau des éléments IRES (386). L'inhibition de la traduction initiée par les IRES pourrait s'expliquer par l'impossibilité du complexe de pré-initiation de la traduction à se lier aux séquences IRES lorsque HuR est fixée dessus. On peut noter que l'initiation de la traduction IRES-dépendante favorisée par HuR n'a encore jamais été rapportée. La liaison de HuR sur la région 3'NT des ARNm peut elle, aussi aboutir à une répression de la traduction, comme dans le cas de l'ARNm *Wnt-5a* (410). Or ce mécanisme d'inhibition de la traduction n'a pas été détaillé.

Enfin, HuR va dans certains cas réguler à la fois la stabilité et le niveau de traduction d'un même ARNm-ARE. Par exemple, en condition de privation en acide aminés, HuR induit la stabilisation et favorise la traduction de l'ARNm *CAT-1* (411). Par contre, il semblerait qu'il puisse aussi stabiliser des ARNm tels que *TNF $\alpha$*  et *Cox-2* et inhiber leur traduction ensuite pour avoir un effet négatif global sur leur expression (402).

## **5. HuR dans les cancers**

### **a) Altération du niveau d'expression de HuR dans les cancers**

Une surexpression de HuR a été rapportée dans de nombreux cancers (colon, ovaire, sein, prostate, pancréas, gastriques, ORL) par rapport aux tissus sains correspondants (360). La majorité des études menées sur le rôle de HuR dans les cancers a rapporté l'existence de corrélations entre le niveau d'expression de HuR et celui de certaines protéines oncogéniques (360). Par exemple, l'expression élevée de la protéine Cox-2 est corrélée à une surexpression de HuR dans les cancers du colon (412) ou encore dans les cancers ovariens (413). Néanmoins des études récentes ont recherché l'existence dans différents cancers de corrélations possibles entre le niveau d'HuR dans les tissus et le grade de la tumeur mais aussi la possible valeur diagnostique, pronostique et thérapeutique de l'expression de cette protéine. L'expression de HuR a ainsi été associée à des grades élevés de cancers du sein invasifs, de mauvais pronostic et avec un taux de survie faible (414).



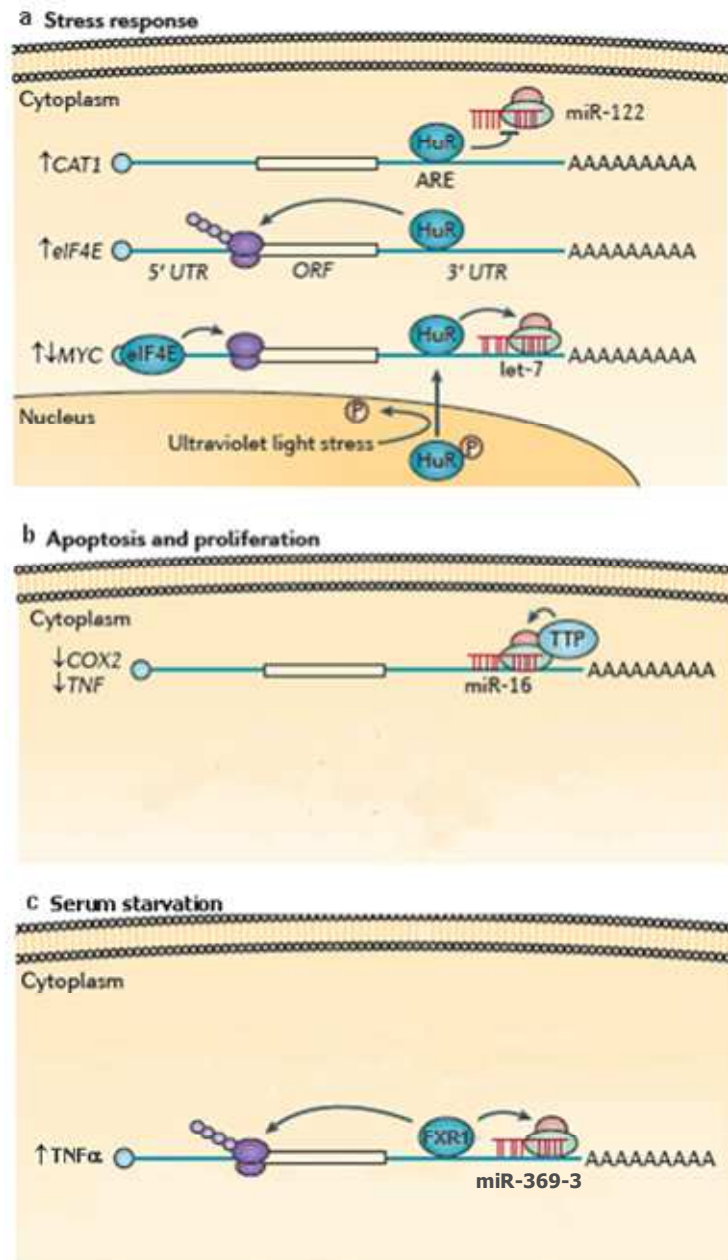
Les origines de l'augmentation des niveaux protéiques de HuR dans les cancers ne sont pas réellement connues. Trois études ont cependant permis de montrer que l'expression abondante de HuR dans les cancers était inversement corrélée à l'expression de 3 miRNAs: *miR-125a* (415), *miR-16* (416) et *miR-519* (417). Il s'est avéré que ces 3 miRNAs étaient effectivement capables d'inhiber la traduction de HuR, de diminuer la croissance des cellules cancéreuses et la tumorigenèse (415-416, 418). De plus, la surexpression de HuR, dans les cancers gastriques, a été corrélée à une activation du facteur de transcription NFκB par la voie PI3K/AKT (419). Enfin, l'expression de HuR serait sous le contrôle d'une boucle d'auto-régulation (420). En effet, la surexpression ectopique de la protéine HuR entraîne une augmentation du taux de protéines HuR endogène dans les cellules HeLa. HuR possède, dans sa région 3'NT, un site ARE sur lequel les protéines HuR sont capables de se lier de manière à exporter l'ARNm dans le cytoplasme et à l'acheminer aux polysomes où il est traduit (420).

#### **F. La régulation post-transcriptionnelle coordonnée par les miRNAs et les AU-BPs**

Il existe une très forte connectivité entre les miRNAs et les AU-BPs: ces deux classes de molécules sont en effet des acteurs clés de la régulation de l'expression génique au niveau post-transcriptionnel. Ces molécules partagent non seulement leur mode d'action (répression traductionnelle et/ou une dégradation de l'ARNm), mais elles nécessitent également le recrutement de machineries cellulaires identiques (enzymes intervenant dans l'enlèvement de la coiffe ou la dégradation du corps de l'ARNm). Aussi, des actions "concertées" (collaboration ou compétition) entre miRNA et AU-BP sur un même ARNm cible ont été rapportées.

Un exemple de ce type d'interconnexion est le cas du *miR-122* et de la protéine HuR (411). Dans des lignées de carcinomes hépatocellulaires, l'ARNm *CAT1* (Cationic Aminoacid Transporter 1) s'accumule dans les P-bodies et sa traduction est inhibée par le *miR-122*. En réponse à un stress cellulaire, la protéine HuR est transloquée du noyau vers le cytoplasme et, en se liant dans la partie 3'NT de l'ARNm *CAT1*, permet de relocaliser l'ARNm des P-bodies vers les polysomes où il sera traduit (Figure 43, panel a).





**Figure 43: Exemples de mécanismes de régulation de l'expression génique coordonnée par les miRNAs et les AU-BPs.**

Suite à divers stress extracellulaires, certains ARNm vont être régulés à la fois par les miRNA et les AU-BPs de manière coordonnée. Des mécanismes de compétition pour un ARNm commun ont été décrits entre HuR et *miR-122* pour leur cible commune *CAT-1*. A contrario, des mécanismes de collaboration entre miRNA et AU-BPs ont été rapportés dont la collaboration entre HuR et *miR let-7* pour moduler l'expression de l'ARNm *c-myc* ou encore TTP et *miR-16* qui vont diminuer l'expression de *COX-2* et *TNF $\alpha$* . (adapté de van Kouwenhove M et al.) (421)

Contrairement à cette étude, l'inhibition de la traduction de l'ARNm *c-Myc* nécessite la fixation simultanée de HuR et du *miR let-7* sur des sites proches de la 3'NT de l'ARNm *c-Myc* (422). Dans ce cas, HuR favoriserait le recrutement de la protéine AGO2 sur cet ARNm (Figure 43, panel a). A la manière de HuR, une autre AU-BP, la protéine TTP assisterait le *miR-16* en interagissant avec la protéine AGO2 pour favoriser la dégradation des ARNm *TNF $\alpha$*  et *COX2* (Figure 43, panel b) (423). Ainsi, ces deux derniers exemples prouvent que les endonucléases Argonautes (AGO), initialement impliquées dans la répression de l'expression des gènes induite par les miRNAs (voir paragraphe III.C.2), interviennent également dans le mécanisme de dégradation des ARNm-ARE (AMD). D'une part, elles sont capables d'interagir avec les AU-BPs sur des ARNm cibles communs pour favoriser leur dégradation. D'autre part, ces endonucléases co-localisent clairement avec les AU-BPs au niveau des P-Bodies et des granules de stress (paragraphe III.A.3 et III.C.2.b).

Cependant, alors que la majorité des études démontrent que les miRNAs induisent une répression de la traduction de leurs ARNm cibles, une étude montre que les miRNAs peuvent en collaboration avec les AU-BPs favoriser la traduction d'ARNm-ARE en réponse à une privation en sérum (424). Ce mécanisme nécessite une complémentarité parfaite entre la séquence du *miR-369-3* et celle de l'ARNm ainsi que la fixation de la protéine AGO2 du complexe RISC et d'une protéine de liaison aux motifs ARE, FXR1 (fragile X retardation related protein 1) (Figure 43, panel c) (424). La protéine FXR1 semblerait être la protéine régulatrice de ce nouveau mécanisme, même si des études complémentaires doivent le confirmer (424).



# OBJECTIFS



Il est connu depuis de nombreuses années que le pouvoir oncogénique de la protéine de fusion NPM-ALK réside dans sa capacité à activer de manière constitutive de multiples voies de signalisation telles que les voies JAK/STAT, PLC $\gamma$ , PI3K/AKT/mTOR ou encore MAP Kinase. Ces voies confèrent aux cellules tumorales un avantage de prolifération et de survie cellulaire (23). De nombreuses études se sont en effet attachées à identifier les protéines partenaires de NPM-ALK impliquées dans la signalisation ainsi que les cibles en aval, qui, pour la plupart, sont impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et la survie des LAGC (23). Des travaux récents ont, cependant, souligné l'importance de la régulation post-transcriptionnelle dans les cancers (193). La découverte d'interactions entre NPM-ALK et des protéines de liaisons aux ARNm (RNA-Binding protein, RBPs) (74-75), nous a donc poussé à émettre l'hypothèse, qu'outre son effet sur la transcription, la tyrosine kinase oncogénique NPM-ALK pouvait également moduler l'expression génique au niveau post-transcriptionnel.

Dans ce contexte, l'objectif central de ma thèse a été de valider cette hypothèse en m'appuyant sur l'exemple du contrôle de l'expression du gène *C/EBP $\beta$* , au niveau post-transcriptionnel, par une protéine appartenant à une classe particulière de RBP, l'AU-BP (AU-Binding Protein) HuR dans les LAGC ALK<sup>+</sup>. Ce choix a été guidé par les données suivantes : 1/ D'après l'analyse du transcriptome des LAGC, le gène *C/EBP $\beta$*  figure parmi les quatre gènes les plus discriminants entre tumeurs ALK<sup>+</sup> et ALK<sup>-</sup>, avec une quantité d'ARNm de 2 à 5 fois plus importante dans les cellules exprimant l'oncogène NPM-ALK par rapport à celles ne l'exprimant pas (63); 2/ L'ARNm *C/EBP $\beta$*  code un facteur de transcription dont le rôle majeur dans la croissance tumorale et la survie des LAGC est aujourd'hui reconnu (64, 425); 3/ Cet ARNm avait été décrit comme étant une cible de l'AU-BP HuR dans les adipocytes (124, 426).

Ainsi, nous avons tout d'abord souhaité déterminer si l'augmentation du taux d'ARNm *C/EBP $\beta$*  dans les LAGC ALK<sup>+</sup> était due, tout au moins en partie, à une augmentation de la demi-vie des ARNm. Nous avons ensuite cherché à vérifier la liaison de HuR sur l'ARNm *C/EBP $\beta$*  et l'influence de NPM-ALK sur la formation de ce complexe. Après avoir montré que NPM-ALK augmentait l'affinité de HuR pour ses ARNm cibles, nous avons déterminé l'impact d'une perte d'expression de HuR sur le recrutement aux polysomes de l'ARNm *C/EBP $\beta$*  et par conséquent sur son niveau de traduction ainsi que sur la viabilité des LAGC. L'oncogène NPM-ALK modulant l'activité biologique de HuR vis-à-vis de son ARNm-cible *C/EBP $\beta$* , nous avons dans un deuxième temps, cherché à savoir à quel niveau il pouvait

intervenir: Modulait-il le niveau d'expression de HuR? Modifiait-il sa localisation subcellulaire? Ou encore entraînait-il des modifications post-traductionnelles de HuR?

Après avoir montré que NPM-ALK ne modifiait pas le niveau d'expression de HuR mais favorisait son recrutement aux polysomes et induisait une phosphorylation originale de HuR sur résidu tyrosine, nous avons cherché à identifier le (ou les) résidu(s) tyrosine de HuR phosphorylés. Les données bibliographiques indiquant qu'un grand nombre de tyrosine kinases effectrices sont activées en aval de l'oncogène NPM-ALK, nous avons en parallèle cherché à identifier la tyrosine kinase à l'origine de cette phosphorylation. Enfin, nous avons déterminé la conséquence de cette nouvelle modification post-traductionnelle sur l'affinité de HuR envers ses ARNm cibles. Il reste aujourd'hui à préciser le rôle de ces phosphorylations dans l'adressage de HuR et de ses cibles aux polysomes. Enfin, il faut démontrer la relevance fonctionnelle de cette phosphorylation sur l'émergence et le maintien des LAGC ALK<sup>+</sup>.

Parallèlement à ce projet qui a été au centre de ma thèse, j'ai également participé à un travail de l'équipe qui a permis de mettre en évidence l'implication de la tyrosine kinase NPM-ALK dans le contrôle de l'expression d'un miRNA, par méthylation de son promoteur. Ce travail s'est basé sur l'exemple du contrôle de l'expression de la protéine anti-apoptotique Mcl1 par le miR-29a. Il est aujourd'hui clair que NPM-ALK active de nombreuses voies de signalisation qui favorisent *in fine* l'expression de protéines impliquées dans des mécanismes clés de la lymphomagenèse dont la prolifération et la survie cellulaire. Parmi ces protéines, MCL-1 (myéloid cell leukemia-1), une protéine aux propriétés anti-apoptotiques de la famille BCL-2, est surexprimée dans les LAGC ALK<sup>+</sup>. Alors que certaines études ont rapporté que la surexpression de MCL-1 était due à une régulation qui s'exerçait au niveau transcriptionnel et traductionnel, via notamment les voies JAK/STAT et PI3K, d'autres ont montré que l'expression de *Mcl1* pouvait être régulée au niveau post-transcriptionnel par les miRNAs, en particulier par les membres de la famille *miR-29*. Dans ce contexte, nous avons dans un premier temps, cherché à déterminer le niveau d'expression des membres de la famille *miR-29*. *miR-29a* se révélant sous-exprimé dans les LAGC ALK<sup>+</sup> par rapport aux LAGC ALK<sup>-</sup>, nous avons cherché à caractériser l'impact de l'expression de NPM-ALK dans la sous-expression du *miR-29a*. Nous avons ensuite cherché à savoir si *miR-29a* pouvait moduler le taux de protéines MCL-1 dans les LAGC ALK<sup>+</sup>. L'expression de la protéine anti-apoptotique MCL-1 étant régulée par *miR29a*, nous avons évalué l'impact d'une surexpression de ce miRNA dans l'apoptose et dans la croissance tumorale de LAGC ALK<sup>+</sup>.

# **RESULTATS EXPERIMENTAUX**





# Résultats expérimentaux

## Article n°1

**HuR contrôle la stabilité et le niveau de  
traduction de l'ARNm *C/EBPβ*  
dans les Lymphomes Anaplasiques  
à Grandes Cellules ALK<sup>+</sup>**



Notre équipe est en étroite collaboration avec le laboratoire d'anatomie et cytologie pathologiques du CHU Purpan, responsable de l'analyse immunomorphologique et moléculaire des patients porteurs de LAGC. Nous bénéficions à ce titre d'une grande expertise de cette pathologie et d'un recrutement privilégié de cas (échantillons congelés, inclus en paraffine, prélèvement de sang et de moelle). Dans le cadre du programme CIT (Carte d'Identité des Tumeurs) initié par la Ligue Nationale contre le Cancer, nous avons établi la signature moléculaire des LAGC. Cette étude transcriptomique nous a permis d'identifier les gènes dont l'expression varie entre les tumeurs exprimant la tyrosine kinase oncogénique NPM-ALK (LAGC ALK<sup>+</sup>) et celles n'exprimant pas cette kinase (LAGC ALK<sup>-</sup>). Le gène *C/EBPβ* fait partie des cinq gènes les plus discriminants entre tumeurs ALK<sup>+</sup>/ALK<sup>-</sup> ( $p < 10^{-7}$ ), avec un taux d'ARNm de 2 à 5 fois plus important dans les LAGC ALK<sup>+</sup>. Plusieurs études indépendantes ont décrit que la transcription du gène *C/EBPβ* était dépendante du facteur de transcription STAT3 dans les LAGC ALK<sup>+</sup>. Cependant, l'ARNm *C/EBPβ* possède également, dans sa région 3' non traduite, une séquence riche en résidus Adénine et Uridine (motifs ARE) dont l'interaction avec la protéine de liaison aux ARNm, HuR a été démontrée dans un modèle de différenciation adipocytaire. Aussi, étant donné les liens reliant le gène *C/EBPβ* à NPM-ALK ainsi que ceux reliant l'ARNm *C/EBPβ* à HuR, ce premier travail a consisté à démontrer, par l'intermédiaire de cet "ARNm prototype" *C/EBPβ*, l'implication de NPM-ALK dans le contrôle post-transcriptionnel des ARNm à motif ARE via HuR.

Nous avons, dans un premier temps, montré que l'augmentation de la stabilité et du niveau de traduction de l'ARNm *C/EBPβ* contribuent à l'accumulation de ce facteur de transcription dans les LAGC ALK<sup>+</sup>. Nous avons prouvé que HuR, en se liant aux ARNm *C/EBPβ*, était à l'origine de cette augmentation d'expression. En effet, une perte d'expression de la protéine HuR, par l'utilisation de petits ARN interférents (siRNAs), entraîne une diminution à la fois de la stabilité et du recrutement de l'ARNm *C/EBPβ* dans les polysomes, ces deux événements aboutissant à une réduction du niveau protéique de *C/EBPβ* et plus particulièrement de l'isoforme oncogénique LIP. Nous avons également démontré que cette diminution d'expression de HuR modulait la stabilité et le recrutement aux polysomes d'autres ARNm-ARE cibles de HuR (dont l'ARNm *VEGF*) et affectait considérablement la viabilité des LAGC ALK<sup>+</sup>. Nous avons, dans un deuxième temps, démontré que l'activité tyrosine kinase de NPM-ALK modulait les propriétés biologiques de HuR (augmentation de son affinité envers ses ARNm cibles et recrutement plus efficace aux polysomes).

Pour expliquer ce phénomène, nous avons mis en évidence une interaction et une colocalisation de NPM-ALK et HuR dans des granules cytoplasmiques ainsi qu'une phosphorylation de HuR sur résidus tyrosine dans les LAGC ALK<sup>+</sup>.

Ainsi, ce travail a permis de démontrer que la tyrosine kinase oncogénique NPM-ALK, en plus de son rôle reconnu dans la régulation de l'expression génique au niveau transcriptionnel, contrôle l'expression du gène *C/EBPβ* au niveau post-transcriptionnel en modulant les propriétés biologiques de la protéine HuR, suite à sa phosphorylation sur résidu tyrosine.

## Signaling and Regulation

HuR-Mediated Control of *C/EBP $\beta$*  mRNA Stability and Translation in ALK-Positive Anaplastic Large Cell LymphomasJulie Bergalet<sup>1</sup>, Mohamad Fawal<sup>2</sup>, Celine Lopez<sup>1</sup>, Cecile Desjobert<sup>1</sup>, Laurence Lamant<sup>1,4</sup>, Georges Delsol<sup>1,3,4</sup>, Dominique Morello<sup>2</sup>, and Estelle Espinos<sup>1,4</sup>

## Abstract

The CCAAT/enhancer-binding protein  $\beta$  (*C/EBP $\beta$* ) plays a major role in the pathogenesis of anaplastic large cell lymphomas (ALCL) that express the nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase (NPM-ALK) tyrosine kinase (ALK<sup>+</sup>). Although ALK-mediated *C/EBP $\beta$*  transcriptional activation has been reported, *C/EBP $\beta$*  mRNA possesses U- and AU-rich domains in its 3'-untranslated region (3'-UTR) that might be privileged targets for posttranscriptional control in ALK<sup>+</sup> ALCLs. The purpose of this study was to explore this possibility. By using human ALCL-derived cells and a murine model of ALK-transformed cells, we show that the AU-binding protein HuR binds to the 3'-UTR of *C/EBP $\beta$*  mRNA, as previously reported in adipocytes, and that NPM-ALK enhances this interaction. Interaction between HuR and *C/EBP $\beta$*  mRNA impacts on *C/EBP $\beta$*  gene expression at both the mRNA and protein levels. Indeed, *C/EBP $\beta$*  mRNA stability following HuR silencing is reduced and reaches the value observed in ALK-inactivated cells. Remarkably, HuR expression is not modified by NPM-ALK, but its association with actively translating polysomes is dramatically increased in ALK<sup>+</sup> cells. HuR/polysomes association diminishes when NPM-ALK activity is inhibited and is accompanied by a concomitant decrease of *C/EBP $\beta$*  mRNA translation. Finally, we show that HuR and NPM-ALK colocalized in cytoplasmic granules and HuR is phosphorylated on tyrosine residues in ALK<sup>+</sup> ALCL cells. Our study thus demonstrates that *C/EBP $\beta$*  is indeed regulated at the posttranscriptional level by HuR in ALK<sup>+</sup> cells, leading us to propose that part of NPM-ALK oncogenic properties relies on its ability to modify HuR properties in the cytoplasm and hence to alter expression of key actors of transformation. *Mol Cancer Res*; 9(4): 485–96. ©2011 AACR.

## Introduction

Oncogenic tyrosine kinases are implicated in the pathogenesis of a wide array of malignancies and are in many cases generated as the result of chromosomal translocations. Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase (NPM-ALK) is one such kinase produced by the t(2;5)(p23;q35) reciprocal chromosomal translocation, fusing the N-terminal region of NPM to the entire intracytoplasmic portion of ALK (1).

NPM-ALK-positive anaplastic large cell lymphomas (ALCL) are high-grade lymphomas of T or null phenotype that account for 5% to 10% of non-Hodgkin lymphomas. Evidence has been accumulating that NPM-ALK is a causative agent of ALCLs and its transforming potential leads to oncogenicity (2). The data available so far suggest that NPM-ALK exerts its transforming capacity through the phosphorylation and activation of several cellular pathways such as PLC $\gamma$ , Janus activated kinase/STAT, phosphoinositide 3-kinase/AKT/mTOR, and Ras/MEK/ERK (3). Nonetheless, their individual contribution to ALK-mediated transformation remains quite unclear, leaving open the possible involvement of additional regulatory mechanisms and players.

In a recent study, we found the *C/EBP $\beta$*  gene, a member of the CCAAT/enhancer-binding protein (*C/EBP*) transcription factors family, to be overexpressed in ALK<sup>+</sup> ALCLs (4). Our results were reinforced by concomitant studies, demonstrating that *C/EBP $\beta$*  expression is indeed required to induce ALK<sup>+</sup> ALCLs transformation and sustain their growth and survival (5). Like most other members of the *C/EBP* family, *C/EBP $\beta$*  is an intronless gene. It is transcribed as a single mRNA that can produce at least 3 isoforms: a 38-kDa liver-enriched activating protein (LAP\*), a 35-kDa protein (LAP), and a 21-kDa liver-enriched inhibitory protein (LIP)—the LAP and LIP forms

**Authors' Affiliations:** <sup>1</sup>CRCT, INSERM UMR1037; <sup>2</sup>CBD, CNRS UMR5547, Université Paul Sabatier, and <sup>3</sup>Laboratoire d'Anatomie Pathologique, CHU Purpan, Toulouse, France; and <sup>4</sup>European Research Initiative on ALCLs (ERIA), Vienna, Austria

Current address for M. Fawal: Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO)/Spanish National Cancer Research Centre, Madrid, Spain

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

**Corresponding Author:** Estelle Espinos, CPTP, INSERM UMR1043, Bâtiment B CHU Purpan, BP 3028, 31024 Toulouse Cedex 3, France. Phone: 33-5-62744541; Fax: 33-5-62744558. E-mail: estelle.espinos@inserm.fr or Dominique Morello, UMR 5547, CBD, 118 route de Narbonne, Université Paul Sabatier, 31062 Toulouse Cedex 4, France. E-mail: morello@cict.fr

doi: 10.1158/1541-7786.MCR-10-0351

©2011 American Association for Cancer Research.

constituting the major polypeptides produced in cells (6). *C/EBPβ* gene expression is regulated at various levels following physiologic or pathologic contexts in response to a number of factors including hormones, mitogens, cytokines, nutrients, and certain toxins. Consistent with a role in cellular proliferation, aberrant expression of the truncated LIP isoform has been reported in several epithelial tumors such as breast tumors (7), ovarian carcinoma (8), and colorectal carcinoma (9), where its expression level is associated with the more aggressive tumors. Despite these advances, little information concerning the involvement of *C/EBPβ*, in lymphoid neoplasms and the molecular mechanisms controlling its expression in such tumors is available.

The dependence of *C/EBPβ* gene transcription on the STAT3 signaling pathway in ALK<sup>+</sup> ALCLs has recently been shown in 3 independent studies (5, 10, 11), consistent with the notion that the *C/EBPβ* promoter is targeted by several transcription factors, including CREB/ATF and Sp1 proteins, *C/EBP* family members, and STAT3, albeit indirectly, in response to a variety of stimuli (12). However, *C/EBPβ* mRNA also possesses a 3'-untranslated region (3'-UTR) that contains U- and AU-rich elements (ARE), that has been shown to bind the AU-binding protein (AUBP) HuR in adipocytes (13). HuR is a ubiquitously expressed protein of 36 kDa that belongs to the Hu/embryonic lethal abnormal vision (ELAV) family of proteins. Although HuR is predominantly nuclear, its translocation to the cytoplasm has been proposed to modulate its ability to stabilize and/or control the translation of its target mRNAs, although the underlying molecular mechanisms remain poorly understood (14).

Given the links between NPM-ALK and the *C/EBPβ* gene and between *C/EBPβ* mRNA and HuR, we were interested in testing if NPM-ALK, in addition to its recognized role in *C/EBPβ* transcriptional activation, could exert, *via* HuR, a posttranscriptional control on *C/EBPβ* gene expression. We report here that increased *C/EBPβ* mRNA stability and translation contribute to the high level of *C/EBPβ* transcription factor found in ALK<sup>+</sup> cells. In addition, we show that HuR binds to *C/EBPβ* mRNA, leading to enhanced *C/EBPβ* gene expression. Small interfering RNA (siRNA)-induced reduction of HuR effectively reduces *C/EBPβ* mRNA stability and translation and thus, *C/EBPβ* abundance. Expression of NPM-ALK increases the binding of HuR to *C/EBPβ* mRNA and its association with polysomes. Taken together, our findings show that NPM-ALK upregulates *C/EBPβ* gene expression at the posttranscriptional level and implicate HuR, phosphorylated on tyrosine residues, in this event.

## Materials and Methods

### Cell culture, reagent, and antibodies

The ALK<sup>+</sup> COST cell line was generated in our laboratory (15). The ALK<sup>+</sup> SU-DHL1 and the ALK<sup>-</sup> FE-PD cell lines were gifts from Dr. K. Pulford (Oxford University, Oxford, UK). The ALK<sup>-</sup> Mac-2A cell line was

kindly provided by O. Merkel as a gift (Paracelsus Medical University, Salzburg, Austria). These cell lines were grown in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) supplemented with 15% fetal calf serum (FCS). Stable empty vector or NPM-ALK-transfected NIH-3T3 fibroblast clones were obtained and cultivated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) as stated (16). Actinomycin D (Sigma-Aldrich) was added to a final concentration of 3 μg/mL for the indicated times. Racemic PF-2341066 [3-[1-(2,6-dichloro-3-fluoro-phenyl)-ethoxy]-5-(1-piperidin-4-yl-1H-pyrazol-4-yl)-pyridin-2-ylamine] was synthesized according to the method described in the patent international application WO 2006/021881 and used at a final concentration of 100 nmol/L. Monoclonal anti-HuR (3A2), polyclonal anti-HuR, polyclonal anti-lamin B (C-20), and polyclonal anti-*C/EBPβ* (C19) antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology. Monoclonal anti-phosphotyrosine (P-Tyr; 4G10), monoclonal anti-glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase (GAPDH), polyclonal anti-Rho-GDI antibodies, and mouse IgG were obtained from Upstate Biotechnology (Millipore). The ALK1 monoclonal antibody (mAb) and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse and anti-rabbit secondary antibodies were purchased from Dako. The mAb against the cytoplasmic part of ALK (ALKc) was kindly provided by Dr. B. Falini (Perugia University, Perugia, Italy). Polyclonal anti-phospho-ALK (Y1604) and S6 antibodies were obtained from Cell Signalling Technology. Recombinant ALK GST-tagged protein was purchased from Invitrogen.

### RNA interference

For RNAi experiments, COST cells were electroporated at 950 μF to 260 V in 400 μL IMDM medium containing 5 μL of a 100-μmol/L stock solution of either a negative control siRNA (Eurogentech) or siRNAs directed to the coding region (CR) of *HuR*: 5'-AAGAGGCAATTAC-CAGTTTCA-3' or of *ALK*: 5'-GGGCGAGCTACTATAGAAA-3'. Following the shock, cells were rapidly resuspended in 5 mL of IMDM supplemented with 15% FCS.

### Binding assays: immunoprecipitation of ribonucleoprotein complexes and biotin pull down

Immunoprecipitation (IP) of endogenous HuR-mRNA complexes [ribonucleoprotein-immunoprecipitation (RNP-IP)] was used to assess the association of endogenous HuR with endogenous target mRNAs. The assays were performed as previously described (17). Briefly, 100 μL of a 50% (v/v) suspension of protein G-Sepharose beads were preincubated for 1 hour at 4°C in NT2 buffer (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, and 0.05% Nonidet P-40) with 5 μg bovine serum albumin (BSA) and 5 μL of RNase OUT (40 U/mL, Invitrogen). Cytoplasmic lysates (1 mg) were divided into 2 equal parts and incubated (1 hour at 4°C) with the BSA-saturated protein G-Sepharose beads in the presence of 30 μg each of mouse IgG or HuR mAbs. Supernatant was removed and

beads were washed 4 times with NT2 buffer. The amount of immunoprecipitated HuR was analyzed by Western blotting from 10  $\mu$ L of beads.

For *in vitro* synthesis of biotinylated transcripts, the sequence corresponding to the CR or the 3'-UTR region of *C/EBPβ* or *GAPDH* mRNA was PCR-cloned into pGEM vectors (Promega). Recombinant plasmids were used as templates for the synthesis of the corresponding biotinylated RNAs by using T7 RNA polymerase and biotin-CTP (MaxiScript T7 kit; Ambion, Invitrogen). Biotin pull-down assays were carried out by incubating either cytoplasmic lysates or *in vitro* translated HuR proteins (TNT Quick Coupled Transcription/Translation System, Promega) with purified biotinylated transcripts (25  $\mu$ g lysate, 1  $\mu$ g RNA) for 1 hour at 25°C. Complexes were isolated with paramagnetic streptavidin-conjugated Dynabeads (Dyna, Invitrogen) and bound proteins in the pull-down material were analyzed by Western blotting using HuR mAb.

#### IP, co-IP, and Western blotting assays

For IP assays,  $10 \times 10^6$  cells were washed in ice-cold PBS and lysed on ice in 750  $\mu$ L lysis buffer (20 mmol/L Tris HCl, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 4 mmol/L EDTA, 1% Triton X-100, and 0.2% SDS) containing 1 mmol/L  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mmol/L NaF, 1 mmol/L phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), and protease inhibitor cocktail. After 30 minutes on ice, cells lysates were sonicated 3 times for 10 seconds, clarified by centrifugation at  $12,000 \times g$  for 15 minutes at 4°C and precleared at 4°C for 30 minutes using 50  $\mu$ L protein G-Sepharose beads (50% v/v). Clear lysates were then incubated with 5  $\mu$ g of the appropriate antibodies and 30  $\mu$ L protein G-Sepharose (Sigma-Aldrich) from 1 hour to overnight at 4°C on a rocking platform. Mouse IgGs were used in IP control reactions. After 5 washes with ice-cold lysis buffer, immune complexes were denatured, fractionated by SDS-PAGE, and analyzed by Western blotting.

For co-IP assays,  $25 \times 10^6$  cells were used and lysed on ice in 750  $\mu$ L lysis buffer (without SDS) containing 1 mmol/L  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mmol/L NaF, 1 mmol/L PMSF, and protease inhibitor cocktail. The next steps were the same as described for the IP procedure.

For Western blot analysis, lysates were size fractionated (10% SDS-PAGE) and transferred onto nitrocellulose membranes. Following incubation (16 hours, 4°C) with primary mAbs, blots were washed and incubated with appropriate HRP-conjugated secondary antibodies for 1 hour. Signals were detected by enhanced luminescence (Amersham Biosciences, GE Healthcare). When indicated, cells were pretreated with 500  $\mu$ mol/L of sodium orthovanadate for 1 hour at 37°C before lysis, to inhibit the activity of tyrosine phosphatases: such treatment leads to rapid accumulation of tyrosine-phosphorylated proteins.

#### Real-time quantitative PCR analysis of RNA

RNA from whole cell lysates, polysomes, or IP material was isolated by TRIzol extraction and subjected to reverse transcription using oligodT, random hexamers, and Super-

script III Reverse Transcriptase (Invitrogen) followed by conventional or real-time (RT) quantitative PCR (qPCR) analyses using gene-specific primer pairs. Primers can be found in Supplementary Table S1. qPCR analyses were performed using SYBER Green Jumpstart Taq Ready Mix kit (Sigma-Aldrich) on ABI7300 (Applied Biosystems, Invitrogen). Each reaction was carried out in duplicate and 3 independent experiments were run. *RPS14* or *GAPDH* cDNAs served as internal controls.

#### Proliferation assay

HuR-silenced or control cells were seeded in 96-well plates at low density ( $5 \times 10^4$  cells/mL) and cultivated overnight at 37°C in IMDM, supplemented with 15% FCS. The day after, they were switched to low serum medium (5% FCS). Cell growth was monitored after 24, 48, 72, and 96 hours using a CellTiter 96 Aqueous One solution Cell Proliferation Assay (Promega) by following the manufacturer's instructions. The formation of formazan through a cleavage of the MTS tetrazolium compound in metabolically active cells was measured as absorbance at 490 nm by using a spectrophotometer. All assays were performed as triplicates and data given are mean values  $\pm$  SEM of 3 independent results.

#### Cell fractionation

Whole-cell lysates (WE) were prepared using RIPA (radioimmunoprecipitation assay) buffer. For the preparation of cytoplasmic (CE) and nuclear extracts (NE),  $1 \times 10^7$  cells were lysed in 200  $\mu$ L of cytoplasmic lysis buffer (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , and 1 mmol/L DTT) containing a protease inhibitor cocktail (Roche), PMSF (1 mmol/L), and phosphatase inhibitors:  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (2 mmol/L), NaF (20 mmol/L), and 7.5  $\mu$ L NP-40 were added to the lysate and mixed using a vortex. Lysates were centrifuged at 13,000 rpm (1 minute, 4°C) and supernatants were removed and stored, at -80°C, as the soluble cytosolic fractions. Pellets were washed 4 times with the same buffer before adding nuclear lysis buffer (50 mmol/L Tris, pH 7.5, 500 mmol/L NaCl, 1% NP-40, and 0.1% SDS) containing protease and phosphatase inhibitors. After sonication, lysates were centrifuged at 13,000 rpm (1 minute, 4°C) to obtain the nuclear fractions.

#### Polysome analysis

A total of  $40 \times 10^6$  cells at approximately 70% confluence were used per sucrose gradient. Cells were incubated for 10 minutes with 0.1 mg/mL cycloheximide at 37°C per mL, and then, washed in a PBS buffer (Gibco) containing 0.1 mg/mL cycloheximide, harvested, and centrifuged. Pellets were lysed mechanically using glass beads (Sigma-Aldrich) in 500- $\mu$ L ice-cold polysome buffer (20 mmol/L HEPES-KOH, pH 7.5, 100 mmol/L KCl, 10 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 0.25% NP-40, 100  $\mu$ g/mL cycloheximide, 100 units/mL RNase inhibitor, and protease inhibitor cocktail). Lysates were precleared by centrifugation at  $3,000 \times g$  for 10 minutes and loaded on top of a linear 15% to 50%



sucrose gradient, prepared using "Biocomp's gradient master." Gradients were centrifuged at 39,000 rpm for 3 hours at 4°C in a Beckman SW41 rotor. Fractions were collected by using the ISCO Foxy Jr. fraction collector and subjected to UV densitometric analysis at 254 nm. Each fraction of the sucrose gradient was precipitated with trichloroacetic acid 10%/deoxycholate 0.2% or TriZol and used for Western blot analysis or RNA extractions, respectively. For Western blotting, equal volumes of each fraction were added to 3× protein dye mix (400 mmol/L dithiothreitol, 40% glycerol, 200 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8, 8% SDS, and 0.01 mg of bromophenol blue per mL), boiled, and electrophoresed through SDS-10% PAGE. For RT-qPCR analysis, equal volumes of purified RNA from each fraction were used.

### Immunofluorescence

COST and NIH-3T3 cells were fixed, permeabilized, and stained as described in the work of Fawal and colleagues (18). Polyclonal anti-HuR and monoclonal anti-ALK1 antibodies were used. The secondary antibodies were goat anti-rabbit or goat anti-mouse antibodies (Alexa Fluor 555 and Alexa Fluor 488, respectively; Molecular Probes/Invitrogen). Slides were mounted in Mowiol (Calbiochem/EMD bioscience) and analyzed with a Leica TCS-SP2 confocal microscope (Leica) equipped with helium–neon lasers, appropriate filter combinations, and a 63/1.32 numeric aperture (NA) objective. Images were processed using Leica confocal software and Adobe Photoshop (Adobe Systems).

### Immunohistochemistry

Immunostaining was performed on paraffin sections of patients with systemic ALK<sup>+</sup> or ALK<sup>-</sup> ALCLs, as previously described (4). Sections were stained with the monoclonal anti-HuR antibody (clone 3A2, 1/50 dilution). Antibody binding was detected using the streptavidin–biotin–peroxidase complex (ABC) method and the Dako StreptABCComplex/HRP Duet (mouse) kit (DakoCytomation). HuR staining was detected using a Leica differentially methylated region (DMR) microscope equipped with the DFC300FX camera, a 200×/0.85 NA objective lens. Image processing was performed using the IM50 software from Leica.

### HuR phosphorylation assays

HuR protein was recovered from ALK<sup>-</sup> (NIH-3T3) cells by IP with HuR mAb, as described earlier. Sepharose-bound immune complexes were washed and resuspended in kinase buffer (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, and 2.5 mmol/L MnCl<sub>2</sub>) in the presence of 15 μmol/L ATP and increasing amount of recombinant glutathione S-transferase (GST)-tagged ALK protein (0, 100 ng, 1 μg). Reaction mixtures were incubated at 28°C for 30 minutes, and then, resolved by SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane, and analyzed with anti-P-Tyr, anti-HuR, or anti-phospho-ALK (Y1604) antibodies.

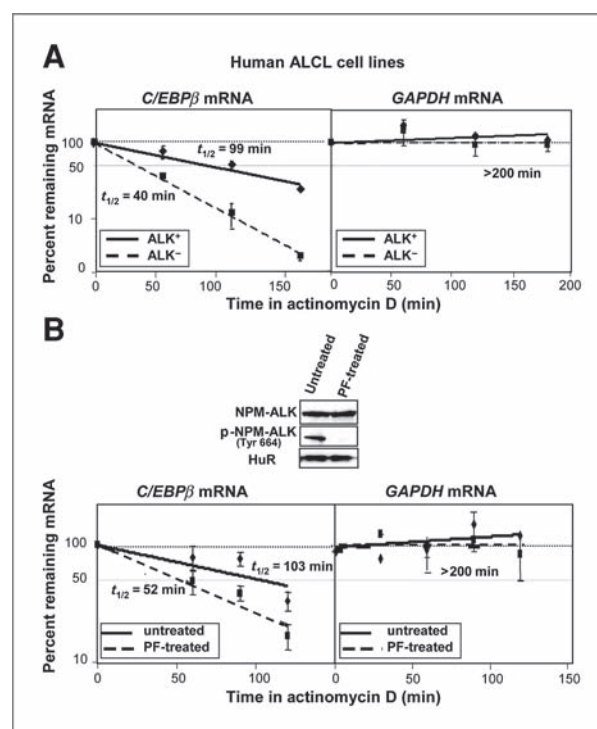
### Statistics

Values are means ± SE from 3 to 6 samples. Autoradiographic and immunoblotting results were repeated 3 times. The significance of the difference between means was determined by analysis of variance. The level of significance was determined by *t*-tests calculations using the GraphPad Prism software (La Jolla).

### Results

#### Stability of the *C/EBPβ* mRNA increases in NPM-ALK expressing cells

We recently discovered through ALK<sup>+</sup> and ALK<sup>-</sup> ALCLs transcriptome analysis that *C/EBPβ* mRNA steady-state levels were 2 to 5 times higher in ALK<sup>+</sup> than in ALK<sup>-</sup> ALCL tumors (4). To test whether increased *C/EBPβ* mRNA expression corresponded to increased



**Figure 1.** Increased stability of *C/EBPβ* mRNA in human ALK<sup>+</sup> ALCL cells. Half-lives of *C/EBPβ* and *GAPDH* (control) mRNAs in (A) the ALK<sup>+</sup> (COST) and ALK<sup>-</sup> (FE-PD) human ALCL-derived cell lines, or (B) untreated versus PF-treated COST cells. The half-lives were measured by incubating cells with actinomycin D (3 μg/mL), extracting total RNA at the times shown, and measuring *C/EBPβ* and *GAPDH* mRNA levels by RT-qPCR analyses. The data were normalized to *RPS14* mRNA levels and represented as a percentage of the mRNA levels measured at time 0, before adding actinomycin D, using a semilogarithmic scale. The half-lives were calculated as the time required for each mRNA to decrease to 50% of its initial abundance (dotted line). Data represent the mean ± SEM from 3 independent experiments. The inhibition of NPM-ALK tyrosine kinase activity was assessed by measuring its tyrosine phosphorylation level by Western blot analysis using the anti-phospho-ALK polyclonal antibody.

mRNA stability, the *C/EBPβ* mRNA half-life ( $t_{1/2}$ ) was analyzed by RT-qPCR in ALCL-derived cells treated with actinomycin D to inhibit *de novo* transcription. *C/EBPβ* mRNA half-life ( $t_{1/2}$ ) is 40 minutes in ALK<sup>-</sup> ALCL cells and increases to about 100 minutes in ALK<sup>+</sup> ALCL cells, whereas  $t_{1/2}$  of control *GAPDH* and *RPS14* mRNAs stayed unchanged (Fig. 1A and data not shown).

To investigate whether increased *C/EBPβ* mRNA  $t_{1/2}$  relied on the constitutive NPM-ALK tyrosine kinase activity, we treated ALK<sup>+</sup> cells with an ALK-specific inhibitor (PF-2341066; ref. 19) that resulted in the abolition of NPM-ALK autophosphorylation (Fig. 1B, Western blotting) and observed a 2-fold decrease of *C/EBPβ* mRNA  $t_{1/2}$  in PF-treated cells (103 min vs. 52 minutes in treated cells; Fig. 1B, bottom). Similarly, in a murine model of ALK-transformed cells where NIH-3T3 cells stably expressed the NPM-ALK fusion protein (16), *C/EBPβ* mRNA was found to be more stable in NPM-ALK-expressing cells (ALK<sup>+</sup>) than in the parental (ALK<sup>-</sup>) NIH-3T3 cells ( $t_{1/2}$  of  $\approx$ 90 min vs. 55 minutes; Supplementary Fig. S1).

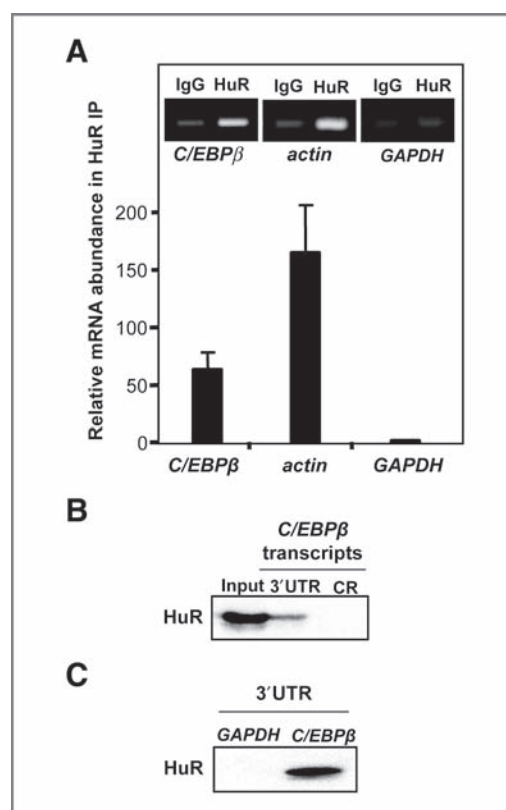
### *C/EBPβ* 3'-UTR is a target of the RNA-binding protein HuR in human ALCLs

Previous studies performed in murine adipocytes revealed that *C/EBPβ* 3'-UTR contains an AUUUA motif that constitutes a binding site for HuR (13). To determine whether HuR also binds to *C/EBPβ* mRNA in ALK<sup>+</sup> ALCLs, we performed RNP-IP assays using anti-HuR antibodies under conditions that preserved the RNP complexes integrity. We observed that *C/EBPβ* mRNA was selectively retained by anti-HuR antibodies but not control IgGs, similarly to  $\beta$ -actin mRNA, a well-established HuR target (17) used here as an internal positive control (Fig. 2A). In this study, the housekeeping transcript *GAPDH* was used as a negative control to normalize sample input since it lacks an HuR-binding site but is present as a low-level contaminant in the IP materials, as reported previously (20). Biotin pull-down assays using ALK<sup>+</sup> cell lysates indicated that *C/EBPβ* 3'-UTR, but not its CR, was specifically bound by HuR (Fig. 2B). Direct interaction between HuR and *C/EBPβ* 3'-UTR was further shown using *in vitro* translated HuR and biotinylated *C/EBPβ* 3'-UTR transcripts (Fig. 2C). The specificity of this interaction was validated using biotinylated *GAPDH* 3'-UTR transcripts that did not retain any HuR protein.

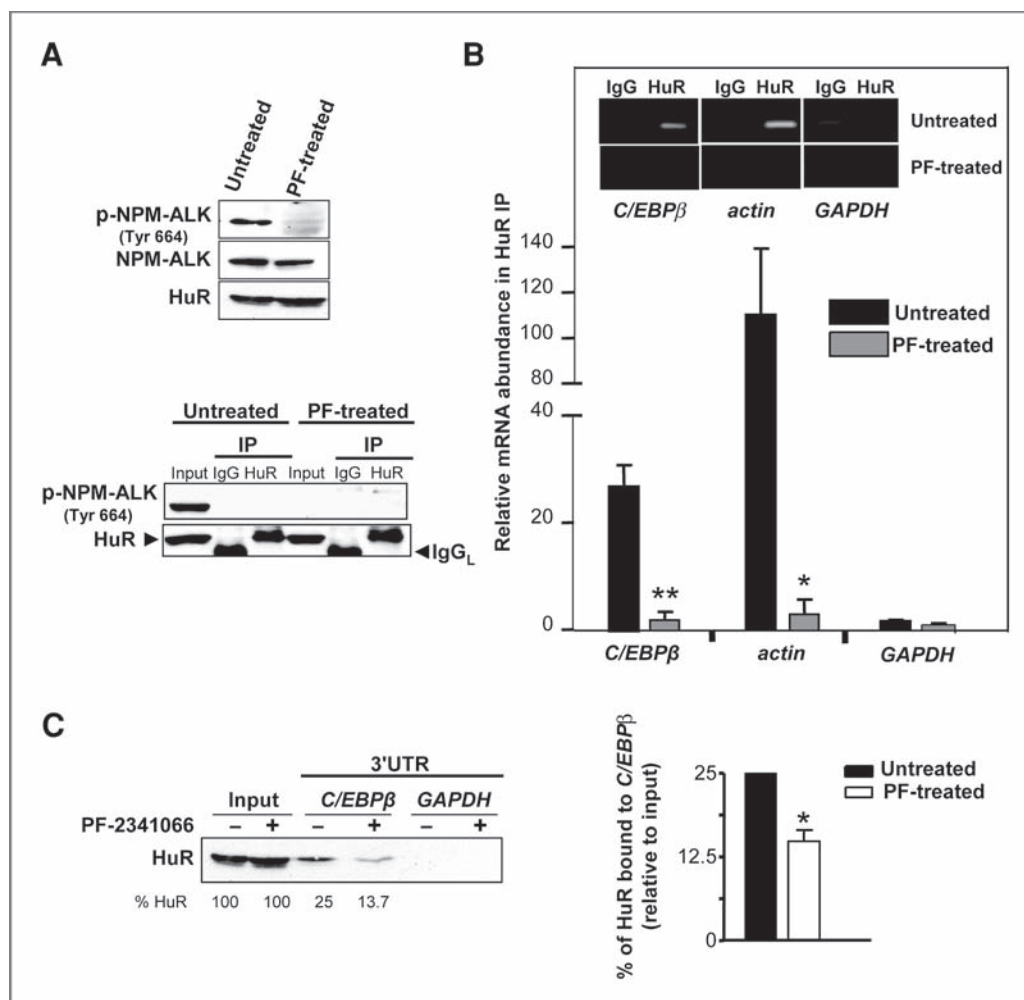
### Binding of HuR to *C/EBPβ* mRNA is enhanced in ALK<sup>+</sup> ALCLs

To find out whether the activity of NPM-ALK impacts on the binding of HuR to *C/EBPβ* mRNA, we performed RNP-IP assays on cytoplasmic lysates prepared from ALK<sup>+</sup> ALCL-derived cells that were either untreated or treated with the ALK-specific inhibitor (PF-2341066; Fig. 3A and B) or transfected with control (ctrl) or ALK siRNAs (Supplementary Fig. S2A and B) and compared the amount of *C/EBPβ* mRNA bound to HuR protein in the different

situations. The treatments alter neither HuR level of expression nor HuR IP efficiency (Fig. 3A, PF treatment and Supplementary Fig. S2A, ALK siRNAs) but strongly reduced (>85%) the association of *C/EBPβ* or *actin* mRNAs (as well as the *VEGF* mRNA, data not shown) with HuR, as revealed by conventional RT-PCR experiments and quantified by RT-qPCR analysis (Fig. 3B, PF treatment and Supplementary Fig. S2B, ALK siRNAs). Together, these findings indicate that NPM-ALK in its active phosphorylated form controls the efficiency of HuR binding to its target mRNAs.



**Figure 2.** HuR binds to the 3'-UTR of *C/EBPβ* mRNA in human ALCLs. A, cytoplasmic lysates of ALK<sup>+</sup> (COST) cells were used to perform IP of RNA-protein complexes (RNP-IP assays) using either anti-HuR antibodies or control IgGs. The levels of *C/EBPβ*, *actin*, and *GAPDH* mRNAs in the IP material were examined by RT-PCR (inset) and RT-qPCR analyses (bar chart). Inset, representative RT-PCR products visualized in ethidium bromide-stained agarose gels. Bar chart, results are presented as fold differences in abundance of a given mRNA in the HuR IP compared with IgG IP. Low-level amplification of *GAPDH* (housekeeping mRNA lacking an HuR motif) served as negative control, whereas *actin* mRNA, a well-known HuR target, was used as a positive control. Data represent the mean  $\pm$  SEM from at least 3 independent experiments. B and C, biotin pull-down assays measuring the ability of endogenous HuR to bind to the 3'-UTR region of *C/EBPβ* biotinylated transcripts. Biotinylated transcripts were prepared as described in the experimental procedure and their associations with HuR were tested using (B) protein lysates from ALK<sup>+</sup> cells or (C) an *in vitro* translated HuR protein. The presence of HuR in the pull-down material was assessed by Western blotting. The data shown are representative of 3 independent experiments.

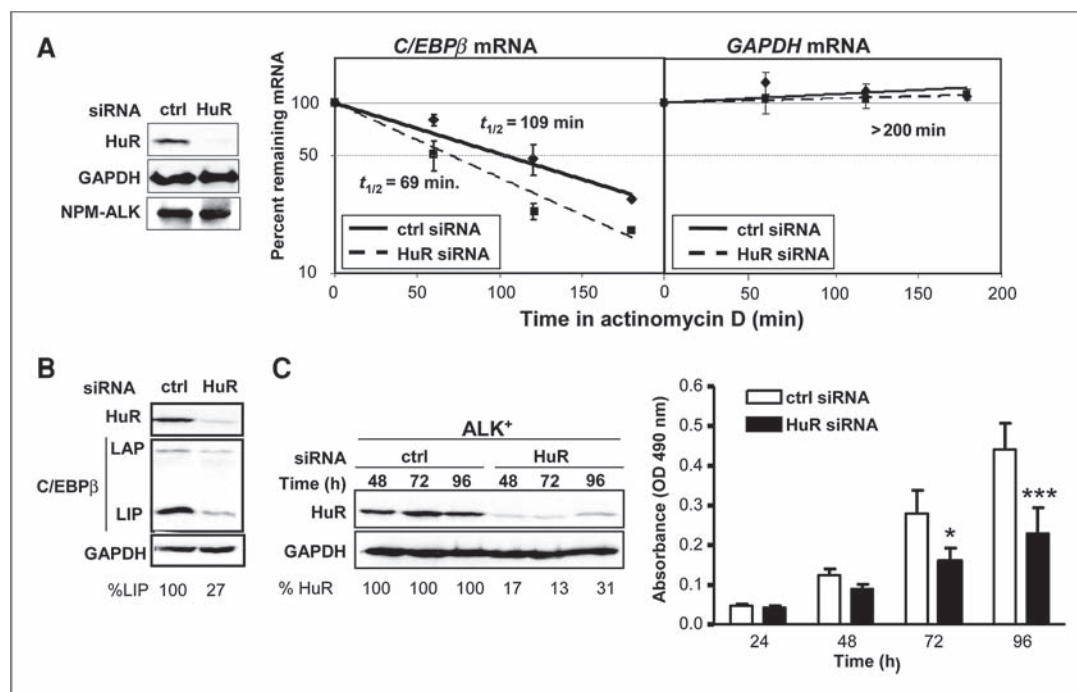


**Figure 3.** HuR binding to *C/EBPβ* mRNAs is enhanced in ALK<sup>+</sup> cells. Cytoplasmic lysates were prepared from ALK<sup>+</sup> (COST) cells that were either untreated or treated with the ALK-specific inhibitor (PF-2341066). A, the inhibition of NPM-ALK tyrosine kinase activity was assessed by measuring its tyrosine phosphorylation level by Western blot analysis using the anti-phospho-ALK polyclonal antibody (top). The efficiency and specificity of HuR IP were assessed by Western blot analysis using the HuR antibody (bottom). IgG<sub>L</sub>, light IgG chain. B, the amount of *C/EBPβ*, *actin*, and *GAPDH* mRNAs bound to endogenous HuR protein was assessed by RNP-IP, as described in Figure 2A. Results are presented as fold differences in abundance of the corresponding mRNAs in the HuR IP compared with IgG IP. Data represent the mean  $\pm$  SEM from at least 3 independent experiments. \*,  $P < 0.05$  and \*\*,  $P < 0.005$  compared with untreated cells. C, biotin pull-down assays using biotinylated transcripts spanning the *C/EBPβ* or *GAPDH* 3'-UTR and cytoplasmic lysates prepared from untreated or PF-treated cells. Left, the data shown are representative Western blotting signals using the anti-HuR antibody. Numbers below the blot represent the amount of HuR bound to *C/EBPβ* or *GAPDH* 3'-UTR from densitometric analysis using the GeneTools software from Syngene. Right, quantification of endogenous HuR bound to the 3'-UTR of *C/EBPβ* transcripts. Data represent the mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. \*,  $P < 0.05$  compared with untreated cells.

To strengthen this conclusion, we performed RNA pull-down assays using biotinylated transcripts spanning the *C/EBPβ* or *GAPDH* 3'-UTR and cytoplasmic lysates prepared from either untreated/PF-treated cells or siCtrl/siALK-transfected cells. As detected by Western blot analysis, HuR readily associated with *C/EBPβ* 3'-UTR when control cell extracts were used, but the amount of HuR retained on *C/EBPβ* 3'-UTR decreased dramatically when lysates from PF-treated (Fig. 3C) or ALK siRNA-transfected cells (Supplementary Fig. S2C) were applied.

#### HuR enhances the stability and the translation of *C/EBPβ* mRNA in ALK<sup>+</sup> ALCLs

To determine whether increased *C/EBPβ* mRNA stability in ALK<sup>+</sup> ALCL cells involved HuR, we compared *C/EBPβ* mRNA half-life in control and HuR-silenced cells. In parallel, as a positive control, we measured the half-life of *VEGF* mRNA whose stability has been shown to be directly affected by HuR (21). *C/EBPβ* and *VEGF* mRNA  $t_{1/2}$  were significantly reduced following HuR knockdown (Fig. 4A and Supplementary Fig. S3, respectively). At the protein level, we observed a strong decrease in the expression of



**Figure 4.** HuR enhances the stability and the translation of *C/EBPβ* mRNA in ALK<sup>+</sup> ALCLs. Its depletion greatly affects the proliferation of ALK<sup>+</sup> ALCL cells. The ALK<sup>+</sup> (COST) cells were transiently transfected with control (ctrl) or HuR siRNAs (100 nmol/L). A, effect of HuR depletion on *C/EBPβ* mRNA half-life. Left, HuR protein levels were determined by Western blotting 48 hours following transfection to control HuR silencing efficiency. Equal loading of proteins was determined by measuring GAPDH protein levels. Right, half-lives of *C/EBPβ* and *GAPDH* mRNAs were measured as described in Figure 1. Data represent the mean  $\pm$  SEM from 3 independent experiments. B, levels of *C/EBPβ*, isoforms in control (ctrl) and HuR-silenced cells, determined by Western blot analysis, 48 hours following transfection. The percentage of remaining LIP isoform is indicated at the bottom of the figure. C, effect of HuR depletion on the proliferation of ALK<sup>+</sup> ALCL cells. Left, the efficiency of HuR knockdown was followed from 48 to 96 hours posttransfection by Western blot analysis. Equal loading of proteins was determined by measuring GAPDH protein levels. Numbers below the blot represent the amount of remaining HuR protein found in siHuR-transfected cells compared with control (ctrl) cells from densitometric analysis by using the GeneTools software. Right, cell growth was measured in control (ctrl) and HuR-depleted cells using the MTS assay. Data represent the mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. \*,  $P < 0.05$  and \*\*\*,  $P < 0.001$  compared with control cells.

*C/EBPβ* encoded proteins (Fig. 4B), particularly of the LIP isoform that has been shown to be strongly expressed in ALK<sup>+</sup> ALCL cells (12). Correlatively, HuR silencing led to a sharp decrease of the proliferation of ALK<sup>+</sup> ALCL cells (Fig. 4C).

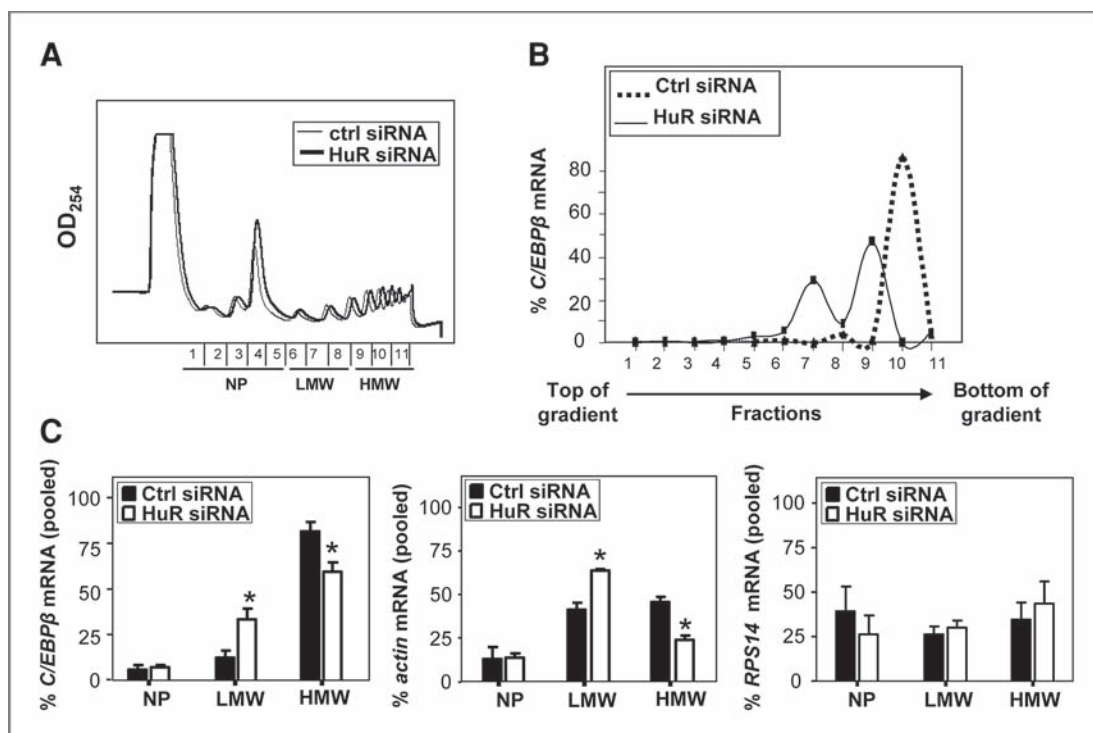
The dramatic reduction of *C/EBPβ* gene expression in HuR-silenced cells prompted us to test whether in addition to its mRNA stabilizing effect, HuR could control *C/EBPβ* mRNA translation. To test this hypothesis, we used sucrose gradient fractionation to compare *C/EBPβ* mRNA association with the translational machinery between control and HuR-silenced ALK<sup>+</sup> ALCL cells. No significant modification of absorbance profile at 254 nm was observed upon HuR silencing (Fig. 5A), showing that HuR does not control global mRNA translation. However, although in control cells, *C/EBPβ* mRNA was present mostly in high molecular weight (HMW) fractions corresponding to actively translating polysomes, it shifted toward lighter fractions [low-molecular weight (LMW)] of the gradient in HuR-silenced cells (Fig. 5B and C for RT-qPCR quantification). Similar results were obtained with either *actin* or *VEGF* mRNA, taken as positive controls, whereas in contrast, the profiles of the negative *RPS14* or *GAPDH* mRNA

controls were not significantly affected by HuR silencing (Fig. 5C and data not shown). These results strongly suggest that less *C/EBPβ* mRNAs are engaged in translation upon HuR silencing, and thus confirm that HuR efficiently contributes to *C/EBPβ* mRNA translation.

#### HuR cosedimentation with polysomes is enhanced in ALK<sup>+</sup> cells

Different possibilities could explain how HuR enhances *C/EBPβ* mRNA stability and translation in ALK<sup>+</sup> ALCL cells. First, the level of HuR protein could be higher in ALK<sup>+</sup> than in ALK<sup>-</sup> cells. However, as reported earlier, we found that HuR expression was identical in control and PF-treated (Fig. 3A) or ALK-silenced (Supplementary Fig. S2A) cells. Similarly, ALK<sup>+</sup> and ALK<sup>-</sup> ALCL-derived cells or NPM-ALK-expressing (ALK<sup>+</sup>) and parental (ALK<sup>-</sup>) NIH-3T3 cells expressed similar levels of HuR (Fig. 6A), showing that NPM-ALK does not regulate the level of HuR expression. Second, the subcellular distribution of HuR could be different in ALK<sup>+</sup> and ALK<sup>-</sup> cells. To test this hypothesis, we analyzed a series of ALK<sup>+</sup> and ALK<sup>-</sup> ALCL tumors and observed that HuR localized both in the nucleus and the cytoplasm of these cells, independently of NPM-ALK





**Figure 5.** *C/EBPβ* mRNAs are associated with high molecular weight, actively translating polysomes in ALK<sup>+</sup> ALCL cells. Cytoplasmic lysates from control (ctrl) or HuR-silenced ALK<sup>+</sup> (COST) cells were fractionated through sucrose gradients to separate unbound mRNA from mRNA bound to polysomes of increasing size. A, representative polysome profiles. B and C, the levels of *C/EBPβ*, *RPS14*, and  $\beta$ -actin mRNAs in each gradient fraction were measured by RT-qPCR and plotted as a percentage of the corresponding mRNA levels in that fraction (as shown for *C/EBPβ* mRNA in B). The bar charts represent average data obtained in three independent experiments where the fractions were pooled according to translational activity: untranslated (fractions 1–5 = NP, nonpolysomal), moderately translated (6–8 = LMW), or actively translated (9–11 = HMW) fractions. Data represent the mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. \*,  $P < 0.05$  compared with control cells.

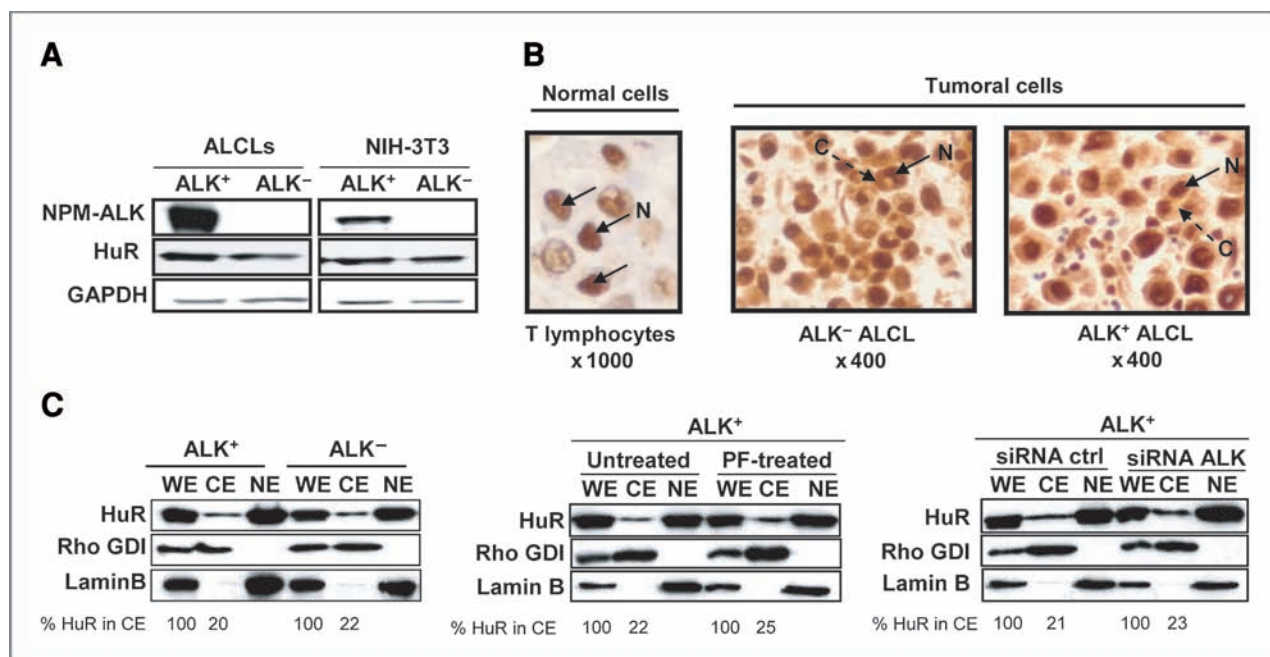
expression (Fig. 6B, right). In contrast, HuR was mainly detected in the nucleus of normal T lymphocytes surrounding the tumor cells (Fig. 6B, left). Cell fractionation experiments were performed on ALK<sup>+</sup>/ALK<sup>-</sup> ALCL-derived cells, untreated/PF-treated ALK<sup>+</sup> cells, or Ctrl/ALK siRNA-transfected ALK<sup>+</sup> cells to confirm these data and quantify the nucleocytoplasmic ratios of HuR. As shown in Figure 6C, the cytoplasmic amount of HuR in ALCL cells is identical in all the situations and thus does not depend on the presence or activity of the tyrosine kinase NPM-ALK. Together, these findings show that the ALK status of the tumoral cells impacts neither on HuR level of expression nor on its nuclear and cytoplasmic distribution.

However, comparable accumulation of HuR in the cytoplasm of ALK<sup>+</sup> and ALK<sup>-</sup> cells did not rule out the possibility that HuR exhibits different fine cytoplasmic subcellular localization. We tested this third hypothesis by analyzing the profiles of HuR throughout sucrose gradient fractions obtained using untreated or PF-treated ALK<sup>+</sup> ALCL cells. We observed that HuR association with the densest fractions including numerous polysomes decreased upon PF treatment (Fig. 7A). Similar results were obtained when ALK-transformed NIH-3T3 cells were treated with the ALK inhibitor (Fig. 7B). In that case, HuR profile throughout the gradient resembled the one observed

in parental (ALK<sup>-</sup>) NIH-3T3 cells, HuR being more abundant in low-density fractions (Fig. 7B). Altogether, our data show that HuR is recovered with polysomes in cells expressing an active form of NPM-ALK. This strongly suggests that HuR binding to its target mRNAs not only contributes to their protection from degradation but also favors their translation in NPM-ALK expressing cells.

#### HuR is a substrate of the tyrosine kinase NPM-ALK

Our data indicate that HuR stabilizing properties, together with its association with the translational apparatus, increased in NPM-ALK expressing cells. On the basis of emerging literature showing that posttranslational modifications of RNA-binding proteins (RBP) impact on their properties (22) and knowing that NPM-ALK is a tyrosine kinase, we decided to test whether HuR could be phosphorylated on tyrosine residues upon NPM-ALK interaction. First, to study possible NPM-ALK and HuR interaction, we performed co-IP assays using either anti-HuR or anti-ALK antibodies and analyzed whether HuR and NPM-ALK were present within the same complex. NPM-ALK was detected in HuR-IP from ALK<sup>+</sup> ALCL cell extracts (Fig. 8A, left), and conversely, HuR was detected in ALK-IP samples (Fig. 8A, right). Association of NPM-ALK to HuR was further confirmed by confocal analysis that showed colocalization of both proteins in small



**Figure 6.** Effect of NPM-ALK expression on the level of HuR and its subcellular distribution. A, NPM-ALK expression does not modulate HuR protein levels. HuR and NPM-ALK protein levels were assessed by Western blotting using HuR and ALKc mAbs. Equal loading of proteins was determined by measuring GAPDH protein levels. B, HuR is found exclusively in the nucleus of normal T lymphocytes (left), whereas it relocalizes in the cytoplasm of tumor cells, independently of the ALK status of the ALCL cases (right). Two representative cases of human ALK<sup>+</sup> and ALK<sup>-</sup> ALCLs with similar cytoplasmic distribution of HuR are shown. C, representative immunoblots of HuR in different subcellular fractions isolated from ALK<sup>+</sup> (COST) or ALK<sup>-</sup> (Mac-2A) cells (top), untreated or PF-treated ALK<sup>+</sup> (COST) cells (bottom left) and control (ctrl) or ALK-silenced cells (bottom right). Whole-cell (WE, 10 μg), cytoplasmic (CE, 30 μg), and nuclear (NE, 30 μg) extracts were subjected to Western blotting to monitor the expression of HuR. Sequential hybridizations with antibodies against Rho-GDI (a cytoplasmic protein) and lamin B (a nuclear protein) were carried out to assess the quality of the fractionation process and the uniformity in loading and transfer of samples. The levels of HuR present in the CE fractions were quantified from densitometric readings and expressed relative to the one found in input samples.

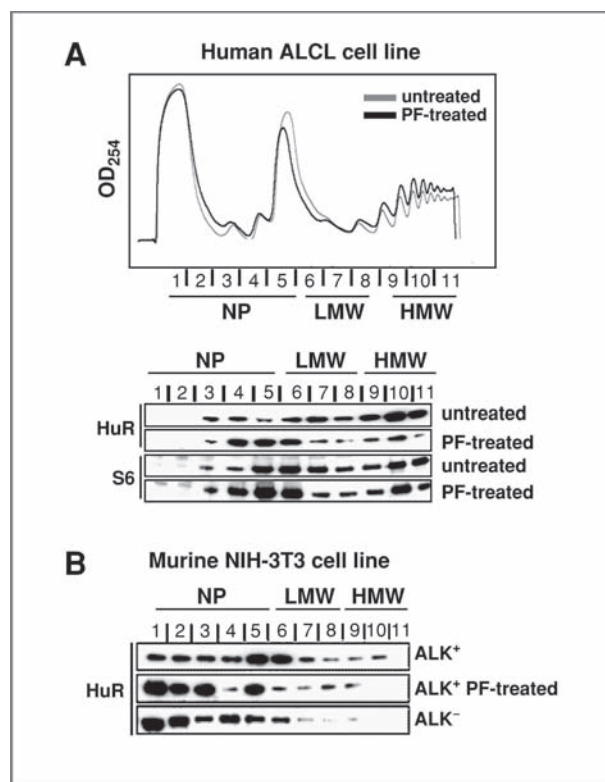
cytoplasmic granules observed in ALK<sup>+</sup> ALCLs and NIH-3T3 cells (Fig. 8B). The physical association between HuR and the NPM-ALK tyrosine kinase suggested that NPM-ALK could directly phosphorylate HuR. *In vitro* kinase assay indicated that the ALK kinase domain endowed with (auto) phosphorylation capacity was indeed able to phosphorylate HuR (Fig. 8C). Comparative analysis of HuR phosphorylation in ALK<sup>+</sup> and ALK<sup>-</sup> ALCL-derived cells revealed that HuR was phosphorylated on tyrosine residues in ALK<sup>+</sup> cells (Fig. 8D). The NPM-ALK signals found in P-Tyr-IP served as internal positive control of the quality and efficiency of the IP. Altogether, these data indicate that NPM-ALK and HuR are associated within the same protein complex and HuR is phosphorylated on tyrosine residues upon NPM-ALK signaling.

## Discussion

The *C/EBPβ* is a multifunctional transcription factor that plays important roles in proliferation and differentiation of a variety of cell types including B and T cells. Its aberrant expression has been implicated in the pathogenesis of several epithelial tumors (7–9) and more recently, in NPM-ALK lymphoid transformation (5, 10, 11). In ALK<sup>+</sup> ALCLs, *C/EBPβ* expression depends on the tyrosine kinase activity

of NPM-ALK and is transcriptionally induced through the STAT3 signaling pathway, although no STAT3-specific binding sites have been observed in the *C/EBPβ* promoter region (5, 10, 11). On the other hand, *C/EBPβ*, has been intensely studied for its critical role in adipocyte differentiation. During this process, *C/EBPβ* gene expression has been shown to be regulated at the posttranscriptional level by a mechanism involving the formation of a nuclear HuR/*C/EBPβ* mRNA complex that determines the amount of message reaching the cytosol (23, 24). In this study, we have established a link between these different analyses and have shown that in ALK<sup>+</sup> ALCLs, NPM-ALK exerts a posttranscriptional control on *C/EBPβ* gene expression that implicates HuR, and leads to increased *C/EBPβ* mRNA stability and translation.

In concordance with previous studies (13, 23), we found that *C/EBPβ* mRNA is a target of HuR in human ALCLs. Moreover, we showed that the kinase activity of NPM-ALK enhances the binding of HuR to *C/EBPβ* mRNA, and more generally, as exemplified by *actin* and *VEGF*, to ARE-bearing mRNAs. Consequently, NPM-ALK depletion or inhibition of its kinase activity resulted in reduced interaction of HuR with its target mRNAs. In agreement with previous study that used *C/EBPβ* mRNA mutants lacking the HuR-binding site (23), we showed that



**Figure 7.** Association of HuR with actively translating polysomes in ALK<sup>+</sup> cells. **A**, top, representative polysome profiles obtained from ALK<sup>+</sup> (COST) ALCL cells that were either untreated or treated with PF-2341066 (100 nmol/L, 15 hours) and fractionated through sucrose gradients. Bottom, representative Western blot analysis depicting HuR levels in each fraction. Also shown are S6 ribosomal protein signals, used as control to monitor differences in loading and transfer of samples. Data represent the average of 3 independent experiments showing similar results. **B**, representative Western blot analysis depicting HuR levels in each fraction of sucrose gradients obtained from NIH-3T3 ALK-transformed cells that were either untreated or treated with PF-2341066 (100 nmol/L, 15 hours).

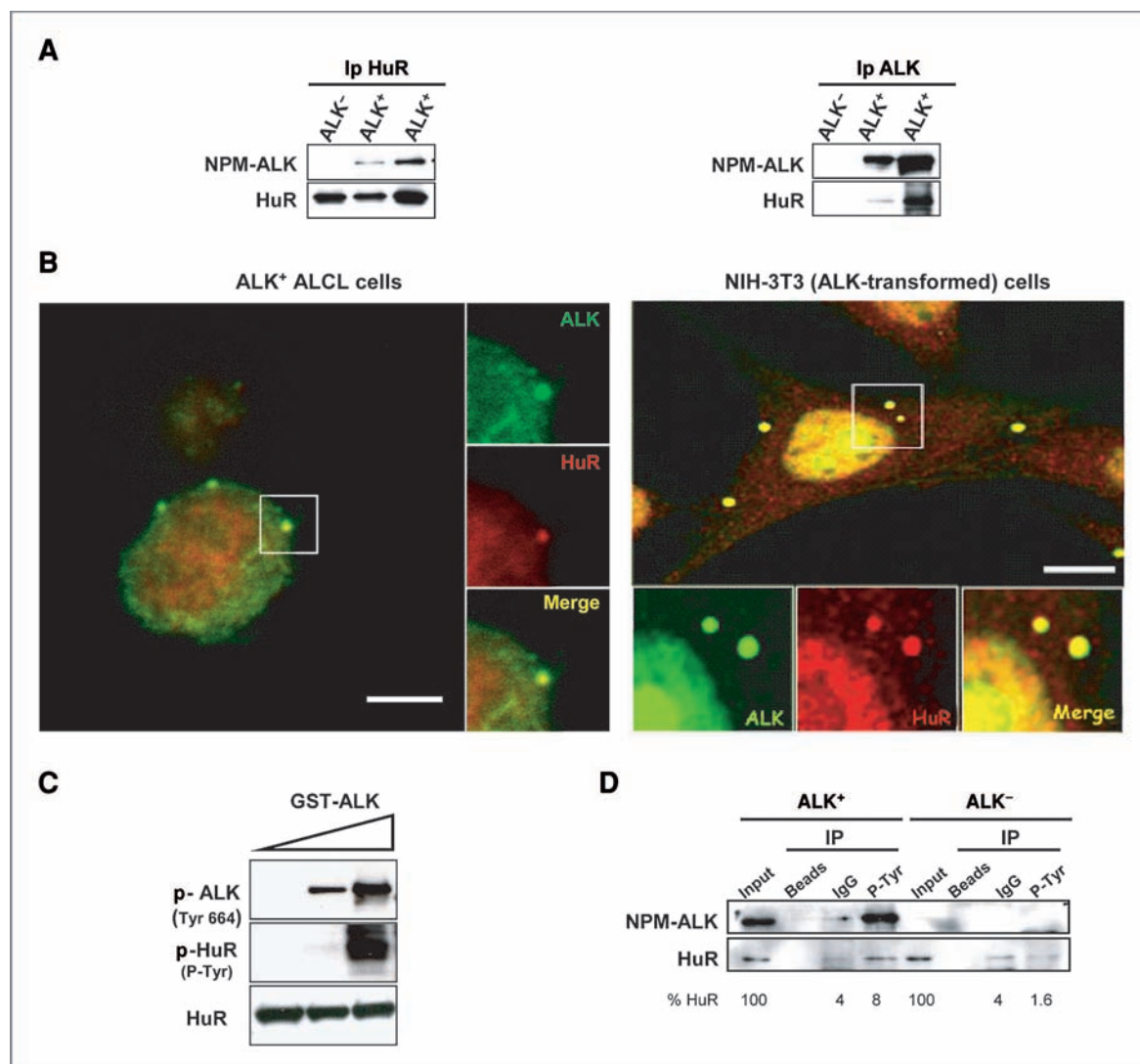
HuR/*C/EBPβ* mRNA interaction impacts on *C/EBPβ* mRNA stability, as revealed by a significant reduction of *C/EBPβ* mRNA  $t_{1/2}$  following HuR knockdown. Finally, we found that the strong NPM-ALK-mediated interaction between HuR and *C/EBPβ* mRNA enhances not only *C/EBPβ* mRNA stability but also its translation, leading to increased amount of the transcriptional activator LIP in NPM-ALK expressing cells.

To understand how NPM-ALK modulates HuR properties, we first examined whether HuR was overexpressed in ALK-transformed cells, like in several types of cancer in which HuR increase is associated with poor outcomes and cancer progression (25). In agreement with those studies, we noticed an augmented HuR level in ALCL tumor cells compared with nontransformed cells (data not shown). Yet, NPM-ALK was not responsible for this increase, as similar levels of HuR were observed in ALK<sup>+</sup>- and ALK<sup>-</sup>-transformed cells. Second, we tested whether NPM-ALK expression could modify HuR subcellular localization, as

suggested by several studies relating HuR translocation from the nucleus to the cytoplasm upon a variety of stimuli (26). We observed that although HuR was mainly nuclear in nontransformed cells, it was abundant in the cytoplasm of ALCL tumor cells. This characteristic did not, however, correlate with NPM-ALK expression, because cytoplasmic abundance of HuR was similar in ALK<sup>+</sup> and ALK<sup>-</sup> ALCLs and was not diminished by ALK inhibitor treatment or ALK knockdown. Increased abundance of HuR in the cytoplasm of ALCL cells compared with nontransformed cells might thus rely on their tumorigenic properties. On the basis of an increasing literature establishing a correlation between posttranslational modifications of RBPs and acquisition of new biological properties (22), we next compared HuR phosphorylation status between ALK<sup>+</sup> and ALK<sup>-</sup> cells. Indeed, besides methylation and ubiquitylation (27, 28), HuR has been shown to be phosphorylated on serine and threonine residues in response to proliferation signals or damaging stimuli (26). Thus, phosphorylation of HuR by the serine-threonine kinases cdk1, PKC $\delta$ , or pKC $\alpha$  has been reported to induce HuR translocation into the cytoplasm and modulate its RNA-binding properties (26). Since HuR is present in the cytoplasm of ALCL-derived cells, such modifications could take place in ALCLs where different serine-threonine kinases are at work (29, 30), but again, they would not rely specifically on the expression of NPM-ALK. The specificity brought about by the oncogenic tyrosine kinase NPM-ALK is reflected by enhanced binding of HuR to its target mRNAs and increased engagement of HuR into actively translating polysomes. On the basis of the observation that NPM-ALK and HuR belong to the same protein complex and are associated in small cytoplasmic granules (18) that concentrate different RBPs, such as the polyA-BP, the AUBP AUF1, and polyadenylated mRNAs (31), we postulated that NPM-ALK phosphorylates HuR on tyrosine residues. As a first step toward testing this model, we employed various *in vitro* and *in vivo* approaches and showed that HuR is indeed phosphorylated on tyrosine residue in ALK<sup>+</sup> cells and that this phosphorylation required an active NPM-ALK protein. Whether tyrosine phosphorylation is directly executed by NPM-ALK or carried out by its associated tyrosine kinases, such as pp60c-src and Lyn (32, 33), remains to be elucidated. Also, since HuR contains 10 tyrosine residues that are all potential targets for tyrosine kinases, in-depth studies will be necessary to precisely map the phosphorylated tyrosine residue(s), and evaluate their potential impact on serine and/or threonine residue phosphorylation.

Whatever the case, our study reveals that NPM-ALK, in addition to its known STAT3-mediated transcriptional control of the *C/EBPβ* gene, exerts a posttranscriptional control on *C/EBPβ* gene expression. It highlights a novel level of regulation of cancer-related genes in ALK<sup>+</sup> ALCLs that lead to increased mRNA stability and translation. Involvement of the RBP HuR in this process, as evidenced by the dramatic decrease of ALK<sup>+</sup> cell proliferation upon HuR silencing, underscores the contribution of





**Figure 8.** HuR is a substrate of the tyrosine kinase NPM-ALK. A, left, HuR was immunoprecipitated from ALCL-derived cells [Mac-2A (ALK<sup>-</sup>), COST or SU-DHL1 (ALK<sup>+</sup>)] using HuR mAb in conditions that preserve protein/protein associations. The presence of NPM-ALK in HuR-IP fractions was assessed by Western blot analysis using ALKc mAb. The ALK<sup>-</sup> cell line served as negative control to underscore the specificity of the NPM-ALK/HuR interaction. Right, NPM-ALK was immunoprecipitated from the same ALCL-derived cells using ALK1 mAb. The presence of HuR in ALK-IP fractions was assessed by Western blot analysis using HuR mAb. B, confocal analysis of HuR and ALK proteins in the ALK<sup>+</sup> (COST) ALCL cells (left) or in the NIH-3T3 ALK-transformed cells (right). Permeabilized cells were incubated with ALK mAb and/or polyclonal anti-HuR, as indicated. The merge view shows colocalization of HuR and NPM-ALK within cytoplasmic granules. The scale bars represent 8  $\mu$ m. C, *in vitro* kinase assays showing that HuR is a substrate of the tyrosine kinase ALK. HuR-IP fractions obtained from ALK<sup>-</sup> cells were incubated with increasing amount of recombinant GST-ALK protein in a cell-free phosphorylation system in the presence of ATP. HuR tyrosine phosphorylation was assessed by Western blot analysis using P-Tyr mAb. Incubation of the membrane with anti-P-Tyr antibody reveals increased phosphorylation of HuR and ALK on tyrosine residues following increased ALK amount, whereas the amount of HuR protein stays invariant, as shown after incubation with HuR mAbs. The results shown are representative of 3 independent experiments. D, HuR is differentially phosphorylated on tyrosine residue in ALCL-derived cells. Total cell lysates prepared from ALK<sup>+</sup> (COST) and ALK<sup>-</sup> (Mac-2A) ALCL-derived cells were subjected to IP assays using the P-Tyr mAb (4G10) and beads or mouse IgGs as negative controls. Input samples correspond to 1 of 10 of the IP lysates loaded on each indicated column. The presence of HuR in the IP material was assessed by Western blot analysis using HuR mAbs. Hybridization with the ALKc antibody was carried out to assess IP efficiency. Numbers below the blot represent the amount of HuR found in P-Tyr-IP complexes relative to the input after densitometric analysis. Cells were pretreated with 500  $\mu$ mol/L of sodium orthovanadate for 1 hour at 37°C before lysis. These data are representative of 3 independent experiments showing similar results.

mRNA-protein interactions in malignant phenotypes. As illustrated in this study, *C/EBPβ* mRNA is a bona fide target of HuR and its deregulated expression largely impacts on ALK<sup>+</sup> tumorigenesis (5). However, in view of the large panel

of HuR target mRNAs (17), it is highly probable that NPM-ALK-mediated HuR modifications affect not only *C/EBPβ* expression, as detailed in this study, but also *actin* and *VEGF*, and more widely, other ARE- or U-containing mRNAs.



## Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

## Acknowledgments

The authors thank A. Kruczynski (P. Fabre, Toulouse) for the synthesis of PF-23041066 and M. Faubladiet (LBME, UMR 5099, Toulouse) for her technical assistance with sucrose gradients and polysomes analysis.

## References

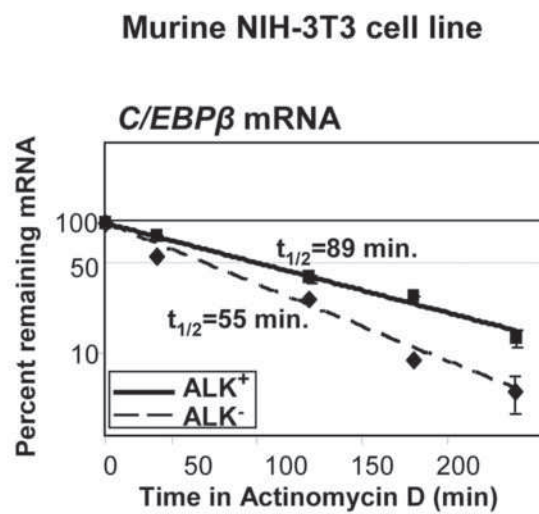
- Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, et al. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 1994;263:1281-4.
- Chiarle R, Voena C, Ambrogio C, Piva R, Inghirami G. The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nat Rev Cancer* 2008;8:11-23.
- Palmer RH, Vernersson E, Grabbe C, Hallberg B. Anaplastic lymphoma kinase: signalling in development and disease. *Biochem J* 2009;420:345-61.
- Lamant L, de Reynies A, Duplantier MM, Rickman DS, Sabourdy F, Giuriato S, et al. Gene-expression profiling of systemic anaplastic large-cell lymphoma reveals differences based on ALK status and two distinct morphologic ALK+ subtypes. *Blood* 2007;109:2156-64.
- Anastasov N, Bonzheim I, Rudelius M, Klier M, Dau T, Angermeier D, et al. C/EBP(beta) expression in ALK+ anaplastic large cell lymphomas (ALCL) is required for cell proliferation and is induced by the STAT3 signaling pathway. *Haematologica* 2010;95:760-7.
- Descombes P, Schibler U. A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA. *Cell* 1991;67:569-79.
- Zahnow CA. CCAAT/enhancer binding proteins in normal mammary development and breast cancer. *Breast Cancer Res* 2002;4:113-21.
- Sundfeldt K, Ivarsson K, Carlsson M, Enerback S, Janson PO, Brannstrom M, et al. The expression of CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) in the human ovary *in vivo*: specific increase in C/EBPbeta during epithelial tumour progression. *Br J Cancer* 1999;79:1240-48.
- Rask K, Thorn M, Ponten F, Kraaz W, Sundfeldt K, Hedin L, et al. Increased expression of the transcription factors CCAAT-enhancer binding protein-beta (C/EBPbeta) and C/EBZeta (CHOP) correlate with invasiveness of human colorectal cancer. *Int J Cancer* 2000;86:337-43.
- Piva R, Pellegrino E, Mattioli M, Agnelli L, Lombardi L, Boccalatte F, et al. Functional validation of the anaplastic lymphoma kinase signature identifies CEBPB and BCL2A1 as critical target genes. *J Clin Invest* 2006;116:3171-82.
- Quintanilla-Martinez L, Pittaluga S, Miething C, Klier M, Rudelius M, Davies-Hill T, et al. NPM-ALK-dependent expression of the transcription factor CCAAT/enhancer binding protein beta in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Blood* 2006;108:2029-36.
- Ramji DP, Foka P. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J* 2002;365:561-75.
- Jones H, Carver M, Pekala PH. HuR binds to a single site on the C/EBPbeta mRNA of 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;355:217-20.
- Hinman MN, Lou H. Diverse molecular functions of Hu proteins. *Cell Mol Life Sci* 2008;65:3168-81.
- Lamant L, Espinos E, Duplantier M, Dastugue N, Robert A, Allouche M, et al. Establishment of a novel anaplastic large-cell lymphoma-cell line (COST) from a "small-cell variant" of ALCL. *Leukemia* 2004;18:1693-8.
- Armstrong F, Duplantier MM, Tremat P, Hieblot C, Lamant L, Espinos E, et al. Differential effects of X-ALK fusion proteins on proliferation, transformation, and invasion properties of NIH3T3 cells. *Oncogene* 2004;23:6071-82.
- Lopez de Silanes I, Zhan M, Lal A, Yang X, Gorospe M. Identification of a target RNA motif for RNA-binding protein HuR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:2987-92.
- Fawal M, Armstrong F, Ollier S, Dupont H, Touriol C, Monsarrat B, et al. A "liaison dangereuse" between AUF1/hnRNPd and the oncogenic tyrosine kinase NPM-ALK. *Blood* 2006;108:2780-8.
- Christensen JG, Zou HY, Arango ME, Li Q, Lee JH, McDonnell SR, et al. Cyto-reductive antitumor activity of PF-2341066, a novel inhibitor of anaplastic lymphoma kinase and c-Met, in experimental models of anaplastic large-cell lymphoma. *Mol Cancer Ther* 2007;6:3314-22.
- Abdelmohsen K, Pullmann R Jr., Lal A, Kim HH, Galban S, Yang X, et al. Phosphorylation of HuR by Chk2 regulates SIRT1 expression. *Mol Cell* 2007;25:543-57.
- Levy NS, Chung S, Furneaux H, Levy AP. Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem* 1998;273:6417-23.
- Lopez de Silanes I, Quesada MP, Esteller M. Aberrant regulation of messenger RNA 3'-untranslated region in human cancer. *Cell Oncol* 2007;29:1-17.
- Cherry J, Jones H, Karschner VA, Pekala PH. Post-transcriptional control of CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBPbeta) expression: formation of a nuclear HuR-C/EBPbeta mRNA complex determines the amount of message reaching the cytosol. *J Biol Chem* 2008;283:30812-20.
- Gantt K, Cherry J, Tenney R, Karschner V, Pekala PH. An early event in adipogenesis, the nuclear selection of the CCAAT enhancer-binding protein {beta} (C/EBP{beta}) mRNA by HuR and its translocation to the cytosol. *J Biol Chem* 2005;280:24768-74.
- Lopez de Silanes I, Lal A, Gorospe M. HuR: post-transcriptional paths to malignancy. *RNA Biol* 2005;2:11-13.
- Doller A, Pfeilschifter J, Eberhardt W. Signalling pathways regulating nucleo-cytoplasmic shuttling of the mRNA-binding protein HuR. *Cell Signal* 2008;20:2165-73.
- Abdelmohsen K, Srikantan S, Yang X, Lal A, Kim HH, Kuwano Y, et al. Ubiquitin-mediated proteolysis of HuR by heat shock. *Embo J* 2009;28:1271-82.
- Li H, Park S, Kilburn B, Jelinek MA, Henschen-Edman A, Aswad DW, et al. Lipopolysaccharide-induced methylation of HuR, an mRNA-stabilizing protein, by CARM1. Coactivator-associated arginine methyltransferase. *J Biol Chem* 2002;277:44623-30.
- Lim MS, Carlson ML, Crockett DK, Fillmore GC, Abbott DR, Elenitoba-Johnson OF, et al. The proteomic signature of NPM/ALK reveals deregulation of multiple cellular pathways. *Blood* 2009;114:1585-95.
- Wu F, Wang P, Zhang J, Young LC, Lai R, Li L. Studies of phosphoproteomic changes induced by nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase (ALK) highlight deregulation of tumor necrosis factor (TNF)/Fas/TNF-related apoptosis-induced ligand signaling pathway in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Mol Cell Proteomics* 2010;9:1616-32.
- Fawal M, Jean-Jean O, Vanzo N, Morello D. Novel mRNA-containing cytoplasmic granules in ALK-transformed cells. *Mol Biol Cell* 2011 Jan 13. [Epub ahead of print].
- Colomba A, Courilleau D, Ramel D, Billadeau DD, Espinos E, Delsol G, et al. Activation of Rac1 and the exchange factor Vav3 are involved in NPM-ALK signaling in anaplastic large cell lymphomas. *Oncogene* 2008;27:2728-36.
- Cussac D, Greenland C, Roche S, Bai RY, Duyster J, Morris SW, et al. Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase of anaplastic large-cell lymphoma recruits, activates, and uses pp60c-src to mediate its mitogenicity. *Blood* 2004;103:1464-71.

## Grant Support

This work was supported by the "INSERM," the "Université Paul Sabatier" and by grants from the "Ligue Régionale contre le Cancer" (comité Haute Garonne), the "Fondation de France," and the "Association pour la Recherche sur le Cancer" (ARC). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

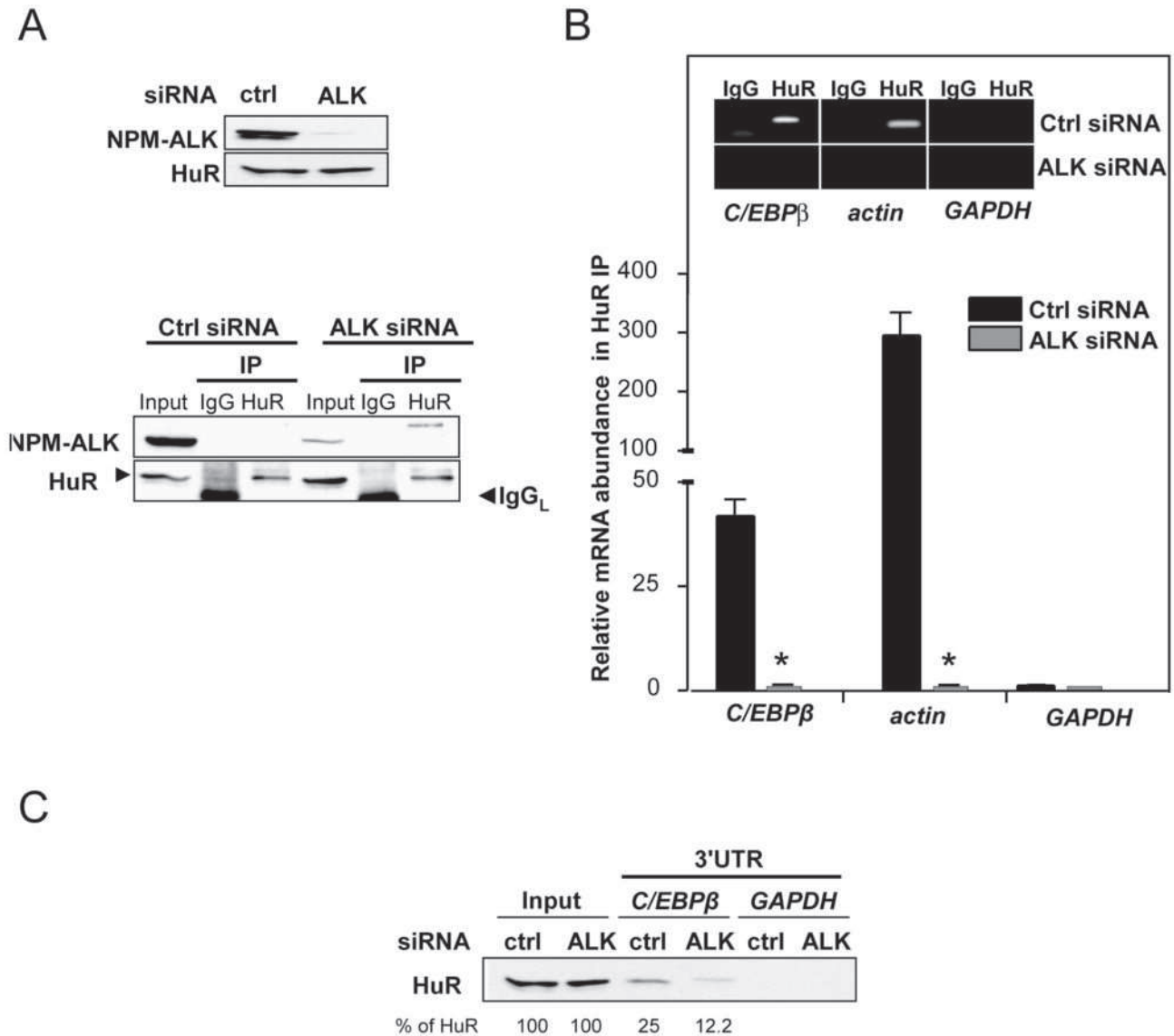
Received August 2, 2010; revised January 19, 2011; accepted February 3, 2011; published OnlineFirst February 22, 2011.

## Figure S1



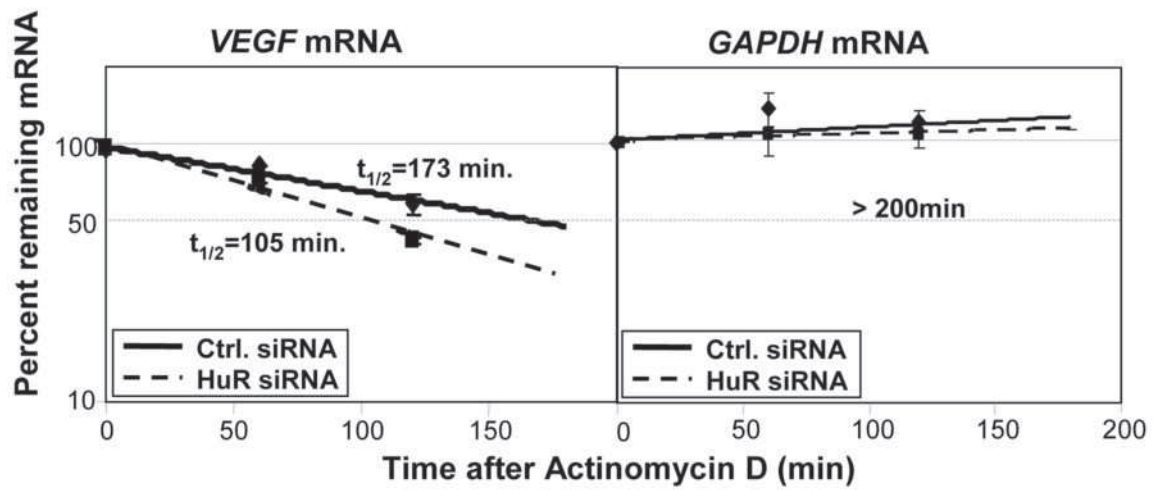
**Supplementary Figure S1: Increased stability of *C/EBP $\beta$*  mRNA in the murine model of ALK-transformed cells.** Half-life of *C/EBP $\beta$*  mRNA in the murine NIH-3T3 cell line stably transfected by an empty vector (ALK<sup>-</sup>) or a vector expressing NPM-ALK (ALK<sup>+</sup>). The half-life was measured as described in Fig. 1. Data represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments.

Figure S2



**Supplementary Figure S2: HuR-binding to *C/EBPβ* 3'-UTR is decreased in ALK-silenced cells.** Cytoplasmic lysates were prepared from ALK<sup>+</sup> (COST) cells that were transfected by either control or ALK-specific siRNAs. (A) ALK and HuR protein levels were determined by Western blot analysis 48h following transfection to control ALK silencing and HuR IP efficiencies, respectively. IgGL, light IgG chain. (B) The amount of *C/EBPβ*, *actin* and *GAPDH* mRNAs bound to HuR protein was assessed by RNP IP as described in Fig. 3. Results are presented as fold differences in abundance of the corresponding mRNAs in the HuR IP compared with IgG IP. Data represent the mean ± SEM from at least three independent experiments. \*, p<0.05 compared with control cells. (C) Biotin pull-down assays were performed as described in Fig. 3. The data shown are representative Western blotting signals using the anti-HuR antibody. Numbers below the blot represent the amount of HuR bound to *C/EBPβ* or *GAPDH* 3'-UTR from densitometric analysis using the GeneTools software from Syngene (United Kingdom).

Figure S3



**Supplementary Figure S3: Effect of HuR depletion on VEGF mRNA half-life.**

ALK<sup>+</sup> (COST) ALCL-derived cells were electroporated with control (ctrl) or HuR siRNAs. The half-life of VEGF mRNAs was measured as described in Fig.1. Data represent the mean  $\pm$  SEM from three independent experiments.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

**Table S1 : Primers used for RT-qPCR detection of mRNA after immunoprecipitation of RNP complexes and reverse transcription**

Name	Oligo Sequence
CEBPF1	5 '- AAACTCTCTGCTTCTCCCTCTGC-3 '
CEBPR1	5 '- CTGACAGTTACACGTGGGTTGC-3 '
GAPDHF	5 '- ACTGCCAACGTGTCAGTGG-3 '
GAPDHR	5 '- CACCCTGTTGCTGTAGCCA-3 '
RPS14F	5 '- ATCAAACCTCCGGGCCACAGGA-3 '
RPS14R	5 '- CTGCTGTCAGAGGGGATGGGG-3 '
Actin R	5 '- TCCCTGGAGAAGAGCTACGA-3 '
Actin F	5 '- AGGAAGGAAGGGTGGAAAGAG-3 '
VEGF R	5 '- TGATCCGCATGATCTGCATGG-3 '
VEGF F	5 '- GAGATAGAGTACATCTTCAAGC-3 '

# Résultats expérimentaux

## Suite de l'article n°1

**Travaux en cours...**  
(Article en préparation)



Comme d'autres RBPs, les AU-BPs subissent des modifications post-traductionnelles qui modulent leurs propriétés biologiques (localisation subcellulaire, capacité à lier et à contrôler le devenir de leurs ARN cibles). Par exemple, il a été montré qu'HuR est phosphorylée sur différents résidus sérine ou thréonine et que, suivant le résidu considéré, sa phosphorylation entraîne une rétention d'HuR dans le noyau ou au contraire son export vers le cytoplasme. Certaines des sérine/thréonine kinases responsables de la phosphorylation d'HuR, activées en réponse à un stress ou à des signaux de prolifération, ont été identifiées: il s'agit principalement des sérine-thréonine kinases Chk2, cdk1, PKC $\alpha$  et PKC $\delta$ . Alors que la protéine HuR possède 10 résidus tyrosine qui pourraient être des cibles potentielles de protéines à activité tyrosine kinase, aucun travail équivalent n'a été publié concernant la phosphorylation de HuR sur résidus tyrosine, ni sur le rôle de telles modifications dans l'émergence ou le maintien des tumeurs.

Dans notre premier article, nous avons démontré que la tyrosine kinase oncogénique NPM-ALK, en plus de son rôle reconnu dans la régulation de l'expression génique au niveau transcriptionnel, contrôle l'expression d'ARNm-ARE au niveau post-transcriptionnel en modulant les propriétés biologiques de la protéine HuR. Une explication à ce phénomène serait sa phosphorylation originale sur résidu tyrosine observée uniquement dans les LAGC ALK<sup>+</sup>.

Afin de valider cette hypothèse, nous avons donc, dans cette deuxième partie du travail, cherché à :

- **Identifier le(s) résidu(s) tyrosine de HuR phosphorylé(s) dans les cellules ALK<sup>+</sup>**
- **Déterminer la (ou les) tyrosines kinases (NPM-ALK ou ses effecteurs) à l'origine de cette phosphorylation originale de HuR**
- **Caractériser l'impact de ce type de phosphorylation sur les propriétés biologiques de HuR (affinité pour ses ARNm et recrutement aux polysomes)**
- **Etablir le rôle fonctionnel de cette modification post-traductionnelle dans la tumorigénèse des cellules ALK<sup>+</sup>.**





## Introduction

Anaplastic lymphoma kinase-positive (ALK<sup>+</sup>) anaplastic large cell lymphoma (ALCL) is now recognized as a distinct entity in the World Health Organization (WHO) classification of hematopoietic tumors (6) and is characterized by the expression of an oncogenic fusion protein involving the ALK tyrosine kinase receptor (19, 427). The pathways well studied of this constitutively activated chimeric tyrosine kinase have been shown to control key cellular processes such as proliferation, survival and cell migration in ALK<sup>+</sup> ALCL (for review see Chiarle et al. (43)).

We have recently shown that NPM-ALK, in addition to its recognized role in transcriptional activation exerts a post-transcriptional control on gene expression via HuR (428). HuR belongs to the family of the RNA-binding proteins (RBPs) collectively named AU-BPs (AU rich Binding Proteins) (429) that interact with U- and AU-rich elements (ARE), located in the 3' untranslated region (3'-UTR) of a broad range of mRNAs (277). These ARE-mRNAs, that represent approximately 8% of coding RNAs (277), usually harbour a relatively short half-life (~20-40min) and encode oncogenes (c-Myc, c-Fos), regulators of cell cycle (p21, Cycline D1), cytokines (GM-CSF, IL-3) or growth factors (VEGF). AREs /AU-BP interactions guarantee intrinsic short half-life of most ARE-mRNAs and ensure their transient accumulation in response to a variety of stimuli such as those acting during development, inflammatory or stress response (430-431). Most AU-BPs identified so far, including AUF1, BRF1, TTP, and KSRP, promote ARE-mRNA decay (205, 289, 352, 432). They are believed to recruit components of the mRNA degradation machinery, such as decapping enzyme and exonucleases, and drive ARE-mRNA degradation in dedicated sites, including exosome bodies or processing bodies (287, 292-293). Only a few AU-BPs protect their ARE-target mRNAs from the degradation. The four members of the Elav/Hu proteins are representative examples of such "stabilizing" proteins (351). While HuB, HuC, HuD are primarily neuronal, HuR is ubiquitously expressed (433-434). Studies performed in a variety of cell types have not only highlighted HuR stabilizing role in physiological or pathological situations, but also its capacity to modulate translation efficiency, although the precise mechanism underlying both effects on its target mRNAs remains to be elucidated (351, 383-385, 390, 435). Many HuR target mRNAs encode proliferation-related proteins, including several proteins that influence cell cycle progression (e.g., cyclins A2, B1, D1, p21, p27), growth factor function (e.g., IGF-1R VEGF, EGF, TGF- $\beta$ , GM-CSF), and transcription factor activity (e.g., c-fos, c-myc, c-jun, p53, myogenin, MyoD, ATF-2)(379). Given HuR's influence on the expression of

key proliferative proteins, HuR was proposed to play a central role in oncogenesis (396, 436), a proposal that recently led to anti-HuR therapeutic strategies (437).

It is now well established that, AU-BPs, like other RBPs, undergo post-translational modifications that alter their biological properties (subcellular localisation and ability to bind and control the fate of their target mRNAs). For instance, HuR phosphorylations on serine or threonine residues have been reported, that lead either to nuclear retention of HuR or, on the contrary, its export to the cytoplasm, according to the residue considered (438). Some of the serine/threonine kinase responsible of HuR phosphorylation in stress conditions or in response to proliferation signals have been identified: it is mainly the kinase Chk2 (373), cdk1 (368), PKC $\alpha$  and PKC $\delta$  (438-439). Yet HuR contains 10 tyrosine that could be potential targets of tyrosine kinases and whose phosphorylation could contribute to HuR modified properties, and hence, of tumors.

We recently observed that HuR was phosphorylated on tyrosine residues in Anaplastic Large Cell Lymphoma (ALCL) characterized by the constitutive expression of the oncogenic NPM-ALK tyrosine kinase (428). We also demonstrated that HuR interaction with its target mRNAs together with its association with actively translating polysomes was dramatically increased in ALK expressing cells. By testing different point mutated versions of HuR, we have now identified that the Tyr 26 within the RNA recognition motif (RRM) 1 is essential for NPM-ALK-mediated HuR binding to ARE-mRNAs. Using specific tyrosine kinase inhibitors *in vivo* experiments, and *in vitro* kinase assays, we also demonstrated that NPM-ALK, but not its associated effectors pp60Src or Lyn, is responsible of the tyrosine phosphorylation of HuR in ALK<sup>+</sup> cells.

## Material and Methods

### Cell Culture, Reagent and antibodies

Stable empty vector- or NPM-ALK-transfected NIH-3T3 fibroblast clones were obtained and cultivated in DMEM as stated (38). Racemic PF-2341066 [3-[1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)-ethoxy]-5-(1-piperidin-4-yl-1H-pyrazol-4-yl)-pyridin-2-ylamine] was synthesized according to the method described in the patent international application WO 2006/021881 and used at a final concentration of 100nM. Dasatinib, N-(2-chloro-6-methylphenyl)-2-[[6-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-2-methyl-4-pyrimidinyl]amino]-5-thiazolecarboxamide monohydrate was used at a final concentration of 50nM. Monoclonal anti-HuR (3A2) was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA). Monoclonal anti-HA was purchased from Sigma (Lyon, France). Monoclonal anti-phosphotyrosine (4G10), monoclonal anti-GAPDH and control IgG1 were obtained from Upstate Biotechnology (Millipore, France). The ALK1 monoclonal antibody and horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse and anti-rabbit secondary antibodies were purchased from Dako (France). The monoclonal antibody against the cytoplasmic part of ALK (ALKc) was kindly provided by Dr B. Falini (Perugia, Italy). Polyclonal anti-phospho-ALK (Y664) was obtained from Cell Signalling Technology (Boston, USA). Recombinant GST-tagged ALK protein was purchased from Invitrogen (France). Recombinant GST- tagged pp60Src protein was purchased from Sigma (Lyon, France). Recombinant GST-LYN was purchased from GTP technology.

### Construction of HA-tagged point mutated forms of HuR :

HA-tagged wildtype HuR (pcDNA-HA-HuRWT) was generated by subcloning the cDNA of HuR (generous gift of M Gorospe) into the pcDNA-HA-expression vector. Accordingly, the plasmids pcDNA-HA-HuRY5F, pcDNA-HA-HuRY26F, pcDNA-HA-HuRY68F, pcDNA-HA-HuRY95F, pcDNA-HA-HuRY109F, pcDNA-HA-HuRY200F and pcDNA-HA-HuRY295F, each of which bearing a single tyrosine to phenylalanine substitution at the depicted positions were generated by changing a single base pair (by changing TAC to TTC) using the Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla CA). These mutants were generated by GTP technology (Toulouse, France). For generation of the "pan-Tyr" mutant bearing ten tyrosine to phenylalanine substitutions, a synthetic gene was synthesized (purchased from Eurogentech, Belgium) and subcloned into the EcoRI/Xba sites of the pcDNA3-HA vector. All mutants were transiently overexpressed by using the ICAfectin 441 reagent from Eurogentec (Belgium).

### Biotin pull down assays

For *in vitro* synthesis of biotinylated transcripts, the sequence corresponding to the coding region or the 3'-UTR region of *C/EBP $\beta$* , *Actin* or *GAPDH* mRNA were PCR-cloned into pGEM vectors (Promega, France). Recombinant plasmids were used as templates for the synthesis of the corresponding biotinylated RNAs using T7 RNA polymerase and biotin-CTP ("MaxiScript T7 kit", Ambion, Invitrogen, France). Biotin pull-down assays were carried out by incubating cytoplasmic lysates with purified biotinylated transcripts (40 $\mu$ g lysate, 1 $\mu$ g RNA) for 1 h at 25°C. Complexes were isolated with paramagnetic streptavidin-conjugated Dynabeads (Dyna, Invitrogen, France), and bound proteins in the pull-down material were analysed by Western blotting using HuR or HA mAb.

### Immunoprecipitation and Western blotting assays

For immunoprecipitation (IP) assays, 10x10<sup>6</sup> cells were washed in ice-cold PBS and lysed on ice in 750 $\mu$ L lysis buffer (20 mM Tris HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 4 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.2% SDS) containing 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM NaF, 1 mM PMSF, and protease inhibitor cocktail. After 30 minutes on ice, cells lysates were sonicated 3 times for 10 seconds and centrifuged at 18 000g for 3 minutes. Cell lysates were clarified by centrifugation at 12 000g for 15 minutes at 4°C, and pre-cleared at 4°C for 30 minutes using 50  $\mu$ L protein G sepharose beads (50% vol/vol). Clear lysates were then incubated with 5  $\mu$ g of the appropriate antibodies and 30  $\mu$ L protein G-Sepharose (Sigma-Aldrich, France) from 1 hour to overnight at 4°C on a rocking platform. Mouse IgGs were used in control IP reactions. After 5 washes with ice-cold lysis buffer, immune complexes were denatured, fractionated by SDS-PAGE, and analysed by western blotting.

For Western blot analysis, lysates were size-fractionated (10% SDS-PAGE) and transferred onto nitrocellulose membranes. Following incubation (16h, 4°C) with primary monoclonal antibodies, blots were washed and incubated with appropriate HRP-conjugated secondary antibodies for 1h. Signals were detected by enhanced luminescence (Amersham Biosciences, GE Healthcare, France). When indicated, cells were pre-treated with 500  $\mu$ M of sodium orthovanadate for 1 hour at 37°C before lysis, to inhibit the activity of tyrosine phosphatases: such treatment leads to rapid accumulation of tyrosine phosphorylated proteins.

HuR Phosphorylation Assays:

HuR protein was recovered from ALK<sup>-</sup> (NIH-3T3) cells by immunoprecipitation with HuR or HA mAbs, as described above. Sepharose-bound immune complexes were washed and resuspended in kinase buffer (20 mM Tris-Hcl (pH7.4), 1mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5mM Mncl<sub>2</sub>) in the presence of 15μM ATP, and 500ng of recombinant GST-tagged ALK, GST-LYN or GST-pp60Src. Reaction mixtures were incubated at 28°C for 45 min, and then resolved by SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane and analysed with anti-phosphotyrosine (4G10), anti-HuR (3A2) , anti-phospho Src or anti-phospho-ALK (Y1604) antibodies.

## Results

### **HuR is phosphorylated on Tyr26, Tyr 200 and Tyr295 residues in ALK expressing cells**

Previously, by use of immunoprecipitation experiments and *in vitro* kinase assays, we have shown that HuR is a substrate of the tyrosine kinase NPM-ALK (428). Structurally, HuR bears 10 tyrosine residues, splitted along the protein, that are all potential targets for tyrosine kinases (Figure 1A). The majority of these residues (eight out of ten) are located within the RNA Recognition Motifs (RRM 1, 2 or 3) that have been shown to influence HuR affinity for its target mRNAs, whereas one (Tyr 200) is found in the nucleocytoplasmic shuttling sequence (HNS) which is critical for HuR nuclear export to the cytoplasm (358).

Here, we aimed at further identifying which one(s) of these 10 residues is/are phosphorylated in NPM-ALK expressing cells. To this end, we generated a series of N-terminal HA-tagged wild-type (HA-HuR-WT) and point mutated HuR proteins bearing a tyrosine-to-phenylalanine mutation that prevents phosphorylation at position 5 (HA-HuR-Y5F), 26 (HA-HuR-Y26F), 68 (HA-HuR-Y68F), 95 (HA-HuR-Y95F), 109 (HA-HuR-Y109F), 200 (HA-HuR-Y200F), 295 (HA-HuR-Y295F) as illustrated in Figure 1A. Determination of the tyrosine phosphorylation state of HA-tagged HuR proteins in NIH-3T3 cells that express the tyrosine kinase NPM-ALK revealed that Tyr26, Tyr200 and Tyr295 are preferentially phosphorylated in ALK<sup>+</sup> cells (Figure 1B, left). The quantification of the tyrosine phosphorylation signals showed a more than 4 fold decrease of the phosphorylation of the Y200F mutant suggesting that the Tyr residue 200 is preferentially targeted by tyrosine kinase in NPM-ALK expressing cells (Figure 1B, right).

NPM-ALK recruits, activates and uses tyrosine kinase of the Src family, such as pp60c-src and Lyn, to mediate its oncogenicity (62, 70, 440). To know whether the tyrosine phosphorylation of HuR is directly executed by NPM-ALK or carried out by its associated tyrosine kinases, we tested the capacity of NPM-ALK, Lyn and pp60src to phosphorylate HuR *in vitro*. For this purpose, HuR constructs (WT and mutant forms) were transiently expressed in NIH-3T3, immunoprecipitated using anti-HA antibodies and incubated with purified recombinant GST-ALK, GST-Lyn, or GST-pp60Src protein in the presence of ATP. Incorporation of phosphate group at tyrosine residues of HuR was revealed by western blot analysis using the P-Tyr mAb (4G10). Figure 2A shows that the purified ALK kinase domain with auto-phosphorylation capacity is able to phosphorylate HuR on tyrosine residue. This phosphorylation sharply decreases when the HuR protein used for the assays was mutated on Tyr 200, suggesting that this residue is a privileged target of the ALK kinase. Similarly,

mutation of Tyr26 and Tyr95 reduces ALK-mediated phosphorylation although at a lesser degree. Conversely, we did not observe any change in the phosphorylation level of mutated forms of HuR when the two Src kinases (GST-Lyn or GST-ALK) were used for the assay. However, whereas the level of tyrosine phosphorylation is relatively high in the presence of GST-pp60Src, it is very low in the presence of GST-Lyn. In this latter case, we concluded that the entire signal was due to the constitutive phosphorylation of the HA-tag by the Lyn kinase, because it completely disappeared when the WT-HuR protein without the HA tag was used for the kinase assay (supp. Figure 1). We can not yet forward the same argument for the pp60Src because we did not test the capacity of this kinase to directly phosphorylate the WT version of HuR without the HA tag (experiments in progress).

However, by using pharmacological treatments that inhibit either the ALK (PF2341066 (441)) or Src family kinases activities (Dasatinib, (442)), we observed that the inhibition of ALK activity leads to the complete loss of tyrosine phosphorylation of HuR, whereas the inhibition of Src kinases activity did not affect the phosphorylation level of HuR protein (Figure 2B). All these data strongly suggest that the NPM-ALK tyrosine kinase, but not the Src kinases, is directly implicated in the phosphorylation of HuR on tyrosine residues.

### **HuR tyrosine phosphorylation is crucial for its binding to mRNA targets**

We next studied whether the phosphorylation of the three different tyrosine residues (Y26, Y200 and Y295) modify HuR ability to bind its ARE-containing targets mRNA from degradation. To answer this question and analyse the binding capacities of the point mutated forms of HuR, we performed RNA pulldown assays using biotinylated transcripts spanning the *C/EBP $\beta$*  (428) or  *$\beta$ actin* 3'-UTR (443) and cytoplasmic lysates prepared from ALK<sup>+</sup> cells that overexpressed either the wild type or point mutated forms of HuR protein. As detected by Western blot analysis, HuR readily associated with *C/EBP $\beta$*  3'-UTR when the WT and so, tyrosine phosphorylated version of HuR was expressed by the cells, but the amount of HuR retained on *C/EBP $\beta$*  3'-UTR decreased dramatically when the Y26F mutant form of HuR was used (Figure 3). Similar results were obtained with the  *$\beta$ actin* 3'-UTR, another well-known target of HuR. Biotin pull-down assays using ALK<sup>+</sup> cell lysates that overexpressed a non-phosphorylatable form of the HuR protein (Pan-F) also showed a sharp decrease in the binding of HuR on both the *C/EBP $\beta$*  and  *$\beta$ actin* 3'-UTR compared to the phosphorylatable WT HuR protein (Supp. Figure 2). The specificity of these interactions were validated using biotinylated *GAPDH* 3'-UTR (Figure 3) or *RPS14*-3'-UTR transcripts (Supp. Figure 2) that



did not retain any HuR protein. All these data show that the tyrosine phosphorylation of HuR increases its affinity for its target mRNA. In particular, the Tyr 26, within the RNA recognition motif (RRM) 1, seems to be essential for NPM-ALK-mediated HuR binding to ARE-mRNAs.

**Legends to figure****Figure 1: HuR is phosphorylated on Tyr26, Tyr200 and Tyr295 residues in ALK expressing cells**

(A) (*Top*) Schematic diagram of putative phosphorylation sites within HuR. (*Bottom*) HA-tagged HuR constructs used to express wild type HuR (HA-HuRWT) and corresponding Tyr mutated HuR proteins with a non-phosphorylatable tyrosine (Y – F) are shown. (*RRM*: RNA recognition motif; *HNS*: HuR nucleo-cytoplasmic shuttling sequence). (B) *In vivo* tyrosine phosphorylation of HA-HuR proteins in ALK<sup>+</sup> expressing cells. (*Left*) Stable NPM-ALK-transfected NIH-3T3 fibroblasts were transfected by the HuR constructs as indicated (WT and mutated forms). 48h later, cells were lysed and the expression of HA-tagged HuR proteins and their level of tyrosine phosphorylation was assessed by Western blotting using anti-HuR and anti-PTyr (4G10) antibodies respectively. The data shown are representative of three independent experiments. (*Right*) Quantification of the tyrosine phosphorylation signals obtained for the Y26F, Y200F and Y295F mutated forms of HuR. The data shown are representative Western blotting signals using the anti-HuR and anti-PTyr antibodies. Data represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. (\*,  $p < 0.05$  compared with WT HuR. \*\*,  $p < 0.01$  compared with WT HuR.)

**Figure 2: HuR is a direct substrate of ALK *in vitro* and *in vivo***

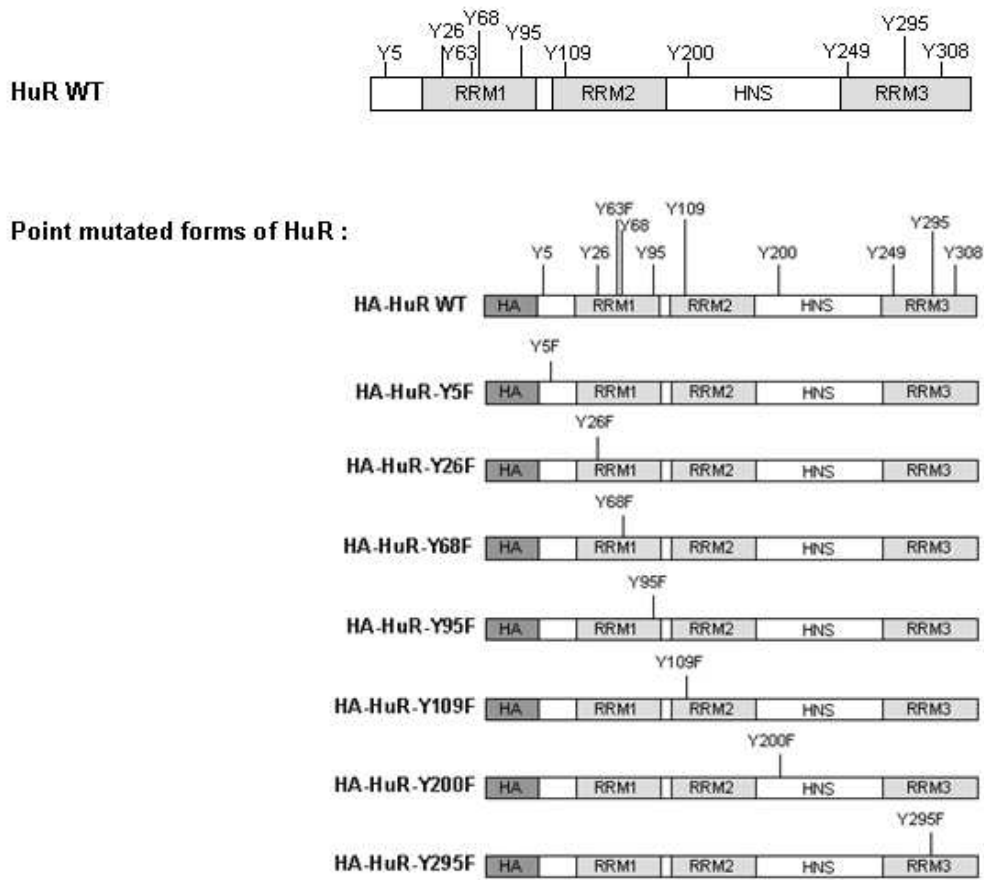
(A) *In vitro* kinase assays with recombinant tyrosine kinases (GST-ALK, GST-Lyn or GST-pp60src). HA-IP fractions obtained from ALK<sup>-</sup> cells (NIH-3T3), that overexpressed ectopic HA-WT or HA-mutated forms of HuR, were incubated with 600ng of recombinant kinase (GST-ALK, or GST-Lyn or GST-pp60Src) in a cell-free phosphorylation system in the presence of ATP. HuR tyrosine phosphorylation was assessed by Western blot analysis using PTyr mAb (4G10). (B) Phosphorylation status of HuR in ALK<sup>+</sup> cells treated with either an inhibitor of ALK (PF-2341066: 15h, 100nM) or Src kinases (Dasatinib: 15h, 50nM). Stable NPM-ALK-transfected NIH-3T3 fibroblasts were transfected by the WT-HuR construct. 48h later, cells were lysed and the expression HuR protein and its level of tyrosine phosphorylation were assessed by Western blotting using anti-HuR and anti-PTyr (4G10) antibodies respectively.

**Figure 3: HuR tyrosine phosphorylation is crucial for its binding to its mRNA targets**

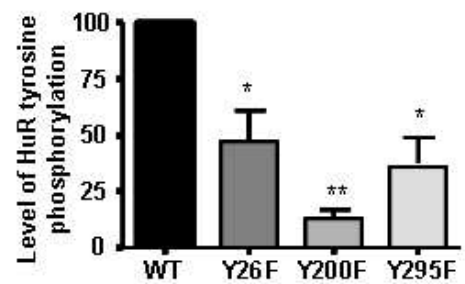
(A) Biotin pull down assays measuring the ability of non-phosphorylatable forms of HuR to bind to the 3'-UTR region of C/EBP $\beta$  and actin biotinylated transcripts. Biotinylated transcripts were prepared as described in the experimental procedure and their associations with HuR were tested using protein lysates from ALK<sup>+</sup> cells that were transfected by the HA-tagged WT or point mutated forms of HuR. (*Top*) The level of HuR tyrosine phosphorylation was assessed by Western blot analysis using PTyr mAb (4G10). (*Bottom*) The presence of HuR in the pull-down material was assessed by Western blotting. The data shown are representative of 3 independent experiments.

Figure 1

A

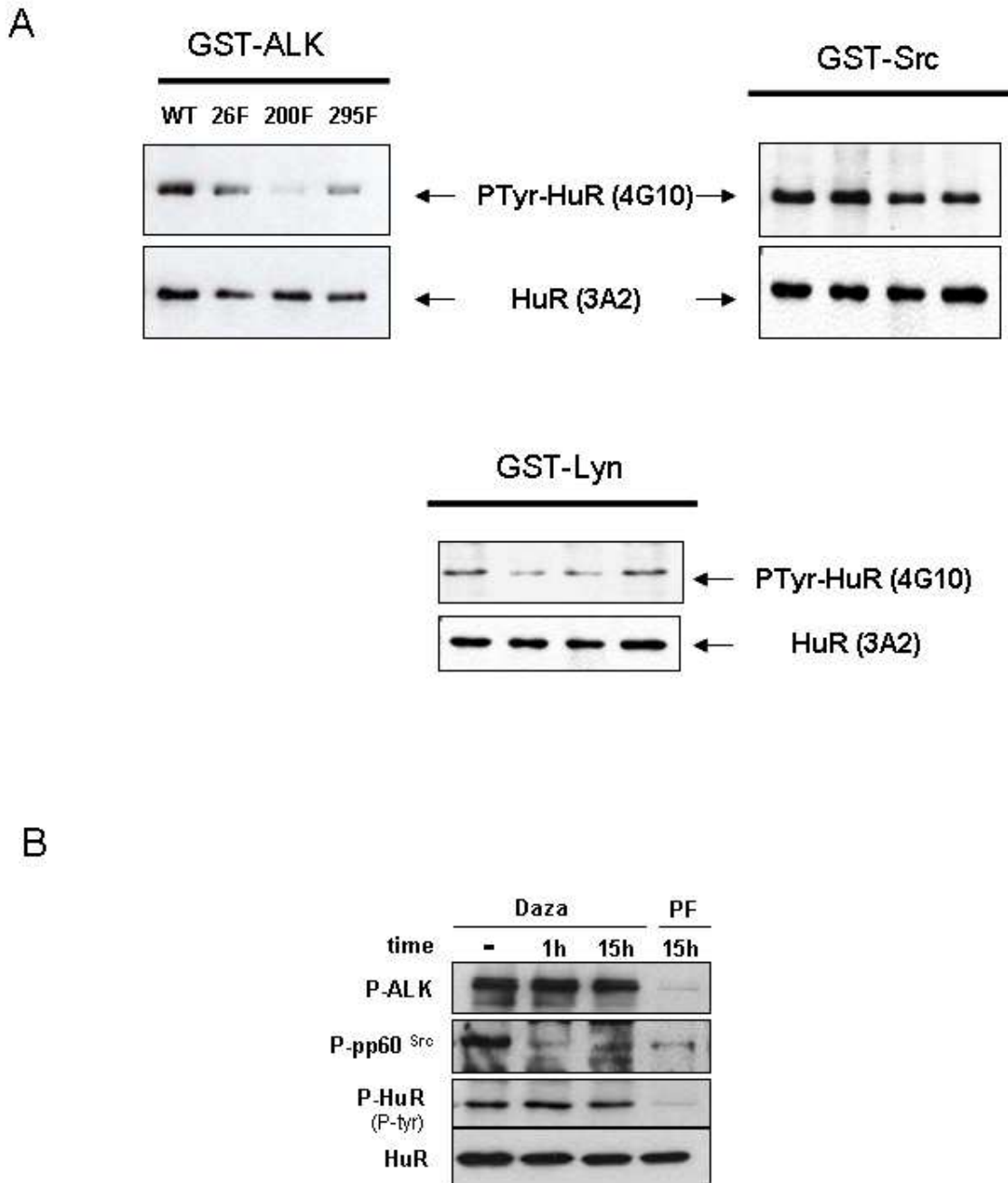


B



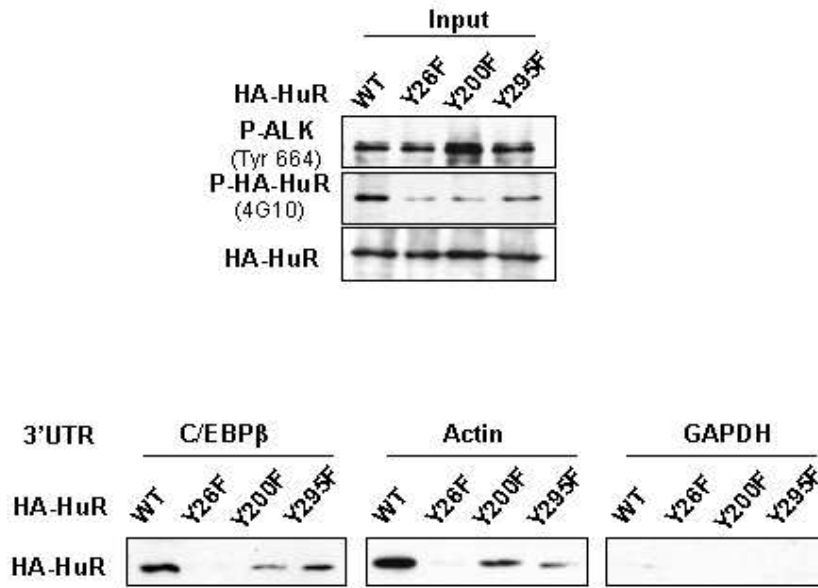
Bergalet J et al, in preparation

Figure 2



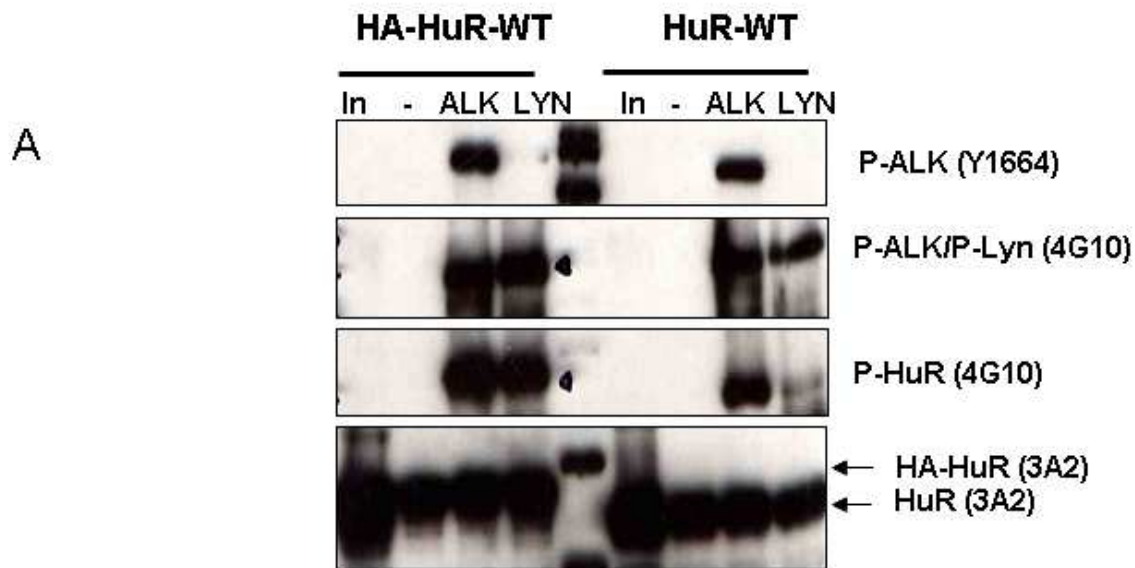
*Bergalet J et al, in preparation*

Figure 3



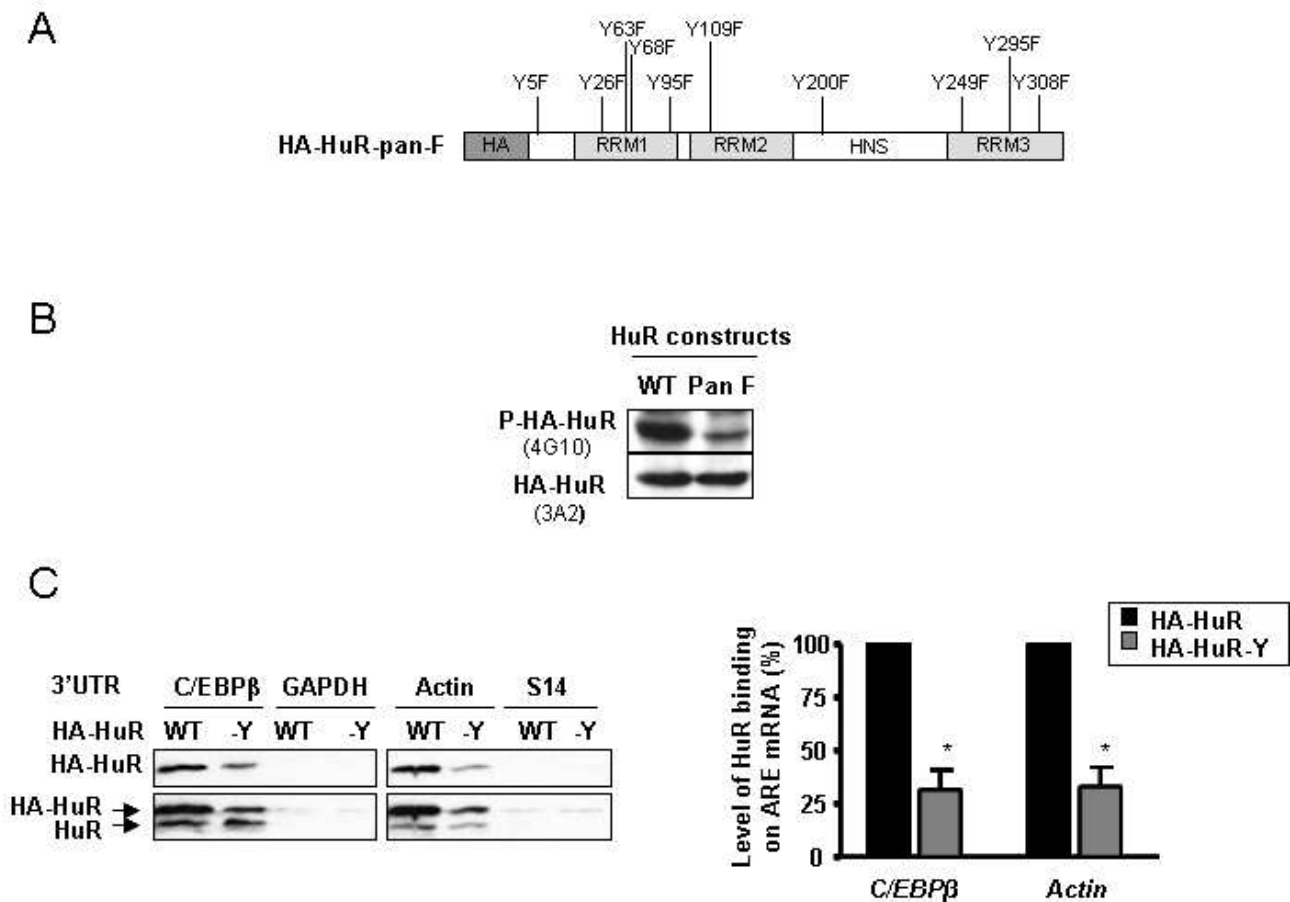
Bergalet J et al, in preparation

## Supp. Figure 1

**Figure S1: Lyn is not able to phosphorylate HuR *in vitro***

*In vitro* kinase assays with the GST-ALK or GST-Lyn recombinant tyrosine kinases. HuR-IP fractions obtained from ALK<sup>-</sup> cells (NIH-3T3), that were transfected by either the HA-HuR WT or the Hur-WT constructs, were incubated with 600ng of recombinant kinases in a cell-free phosphorylation system in the presence of ATP. HuR tyrosine phosphorylation was assessed by Western blot analysis using PTyr mAb (4G10). The amount of GST-ALK or GST-Lyn was assessed by using anti-P-ALK (Y1664) or anti-PTyr antibodies.

Supp. Figure 2



**Figure S2: HuR tyrosine phosphorylation is crucial for its binding to its mRNA targets**

- (A) HA-tagged HuR construct used to express a non-phosphorylatable form of HuR that is mutated in all tyrosine residues (HuR-pan F).
- (B) Stable NPM-ALK-transfected NIH-3T3 fibroblasts were transfected by the HuR constructs as indicated (WT and Pan-F). 48h later, cells were lysed and the expression of HA-tagged HuR proteins and their level of tyrosine phosphorylation was assessed by Western blotting using anti-HuR (3A2) and anti-PTyr (4G10) antibodies respectively. The low remaining tyrosine phosphorylation level observed with the HA-HuR-Pan F comes from the constitutive phosphorylation of the HA tag (see Figure S1).
- (C) Biotin pull down assays measuring the ability of the non-phosphorylatable form of HuR to bind to the 3'-UTR region of C/EBP $\beta$  and actin biotinylated transcripts. (Left) the data shown are representative Western blotting signals using the anti-HuR antibody. (Right), quantification of endogenous HuR bound to the 30-UTR of C/EBP $\beta$  transcripts. Data represent the mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. \*,  $P < 0.05$  compared with WT-HuR.

Bergalet J et al, in preparation



## Discussion et Perspectives du travail en cours

Dans notre précédent travail (428), nous avons démontré, en prenant l'exemple du contrôle de la stabilité et du niveau de traduction de l'ARNm *C/EBP $\beta$*  par l'AU-BP HuR, que la tyrosine kinase oncogénique NPM-ALK pouvait contrôler l'expression génique au niveau post-transcriptionnel (428). Ce travail a également été à l'origine de la mise en évidence, pour la première fois, d'une phosphorylation de HuR sur résidu tyrosine. Cette découverte originale a, de fait, ouvert de nouvelles perspectives quant au rôle fonctionnel de cette phosphorylation sur les propriétés biologiques de HuR, et par conséquent son implication dans l'émergence et le maintien des LAGC ALK<sup>+</sup>.

Grâce à la génération d'une collection de formes mutantes (sur résidus tyrosine) de HuR, nous avons pu identifier les résidus tyrosine qui sont phosphorylés dans les cellules NPM-ALK<sup>+</sup> : il s'agit des résidus Tyr 26, Tyr 200 et Tyr 295 (Figure 1, B). Dans notre premier article, nous avons décrit que HuR et NPM-ALK interagissaient au sein de granules cytoplasmiques les "granules ALK", et que HuR pouvait être directement phosphorylée par ALK (Article 1, Figure 8 expériences de phosphorylation *in vitro* et travail en cours, Figure 2A). Or il n'était pas exclu que HuR soit phosphorylée par les tyrosine kinases effectrices de NPM-ALK. En accord avec cette hypothèse, des logiciels bioinformatiques de prédiction des sites de phosphorylation (Netphos <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>, GPS <http://gps.biocuckoo.org/links.php>, PPSP <http://ppsp.biocuckoo.org/>), nous avaient effectivement indiqué que HuR pouvait être la cible des kinases de la famille SRC connues pour être activées par NPM-ALK (57, 444). Des expériences de phosphorylation *in vitro*, réalisées avec les tyrosine kinases recombinantes pp60src, Lyn et NPM-ALK, ainsi que l'utilisation *in vivo*, d'inhibiteurs spécifiques de ALK (PF-2341066) et des Src kinases (Dasatinib), nous ont permis de clairement démontrer que NPM-ALK était la seule tyrosine kinase capable de phosphoryler spécifiquement ces 3 résidus, le résidu 200 étant la cible préférentielle de NPM-ALK (Figure 2A et 2B). De manière intéressante, deux de ces résidus, Tyr 26 et Tyr 200, sont également phosphorylés dans des types cellulaires n'exprimant pas la tyrosine kinase oncogénique NPM-ALK mais d'autres tyrosine kinases dont Src, ou les protéines de fusion BCR-ABL ou RBM6-CSF1R (445-449). Ceci suggère donc que leur phosphorylation n'est pas spécifique à la tyrosine kinase NPM-ALK, contrairement au résidu Tyr 295, dont la phosphorylation n'avait jamais été rapportée auparavant. Ces résidus pourraient donc bénéficier d'une conformation et d'un contexte favorable permettant leur accessibilité à de multiples tyrosines kinases dont NPM-ALK.

A contrario, le contexte dans lequel se trouve le résidu Tyr 295 restreindrait l'accès plus spécifiquement à quelques tyrosine kinases telles que la protéine de fusion NPM-ALK.

Le rôle des modifications post-traductionnelles de HuR sur résidus sérine et thréonine a été largement caractérisé. En effet, on sait aujourd'hui que HuR, en réponse à divers stress cellulaires, est la cible des sérines/thréonines kinases Chk2, CDK1, PKC $\alpha$  ou encore PKC $\delta$ , et que ces phosphorylations entraînent une modulation de ses propriétés biologiques telles que son affinité envers ses ARNm cibles et sa localisation subcellulaire. Aucun travail équivalent n'a été publié sur la phosphorylation de HuR sur résidus tyrosine, ni sur le rôle de ces modifications post-traductionnelles dans l'émergence ou le maintien du phénotype tumoral, alors que HuR possède 10 résidus tyrosine et que plusieurs articles relatent l'importance d'HuR dans le développement de divers types de cancers(396, 436). Dans notre premier article, nous avons déjà démontré la dépendance des propriétés biologiques de HuR vis-à-vis de l'activité tyrosine kinase de NPM-ALK (428). En effet, nous avons observé que l'inhibition de l'activité kinase de NPM-ALK diminuait l'affinité de HuR pour ses ARNm cibles, dont *C/EBP $\beta$* , ainsi que son recrutement au niveau des polysomes, ces effets étant associés à une diminution concomitante du taux de protéines *C/EBP $\beta$* . Afin de compléter ce travail, et grâce à des expériences de biotin pull down, nous venons de démontrer que les résidus Tyr 26, Tyr 200 et Tyr 295 sont importants pour la liaison de HuR sur ses ARNm cibles (Figure 3). Plus particulièrement, la mutation du résidu Tyr 26, localisée dans le premier domaine de reconnaissance aux ARNm (RRM1), induit une diminution drastique de la liaison de HuR sur ses cibles (Figure 3). Ces résultats sont en parfait accord avec des études antérieures démontrant que les domaines RRM1 et RRM2 de deux autres membres de la famille de Hu, HuC et HuD, sont nécessaires pour leur liaison sur leurs cibles (355). Néanmoins, alors que les résidus tyrosines Tyr 200 et Tyr 295 ne sont pas localisés dans ces domaines mais dans la région HNS et le domaine RRM3 respectivement, nous avons également observé, une légère diminution de la liaison des protéines HuR mutantes (Y200F et Y295F) aux ARNm *C/EBP $\beta$*  et *Actine*. Or, une analyse récente, réalisée à partir de protéines HuR recombinantes délétées pour ces régions, a permis de montrer que la région RRM3 de la protéine HuR n'est pas cruciale pour la liaison de HuR sur les motifs ARE mais, par contre, qu'elle est importante pour l'oligomérisation de HuR sur ses cibles. La région HNS, plus généralement impliquée dans le transport nucléo-cytoplasmique de HuR, contribuerait, quant-à elle, à renforcer significativement l'interaction entre HuR et ces ARNm cibles (357). Ainsi la perte d'affinité des protéines HuR, mutées au niveau de ces résidus, serait la résultante à la

fois d'une absence d'oligomérisation des protéines HuR et d'une certaine fragilité des complexes HuR-ARNm.

Il reste aujourd'hui à analyser l'impact de la phosphorylation sur résidus tyrosine de HuR sur sa localisation subcellulaire dans les LAGC ALK<sup>+</sup>, à savoir son recrutement plus ou moins efficace aux polysomes. Pour cela, nous envisageons de réaliser des expériences de fractionnement cellulaire sur gradient de sucrose à partir d'extraits cytoplasmiques issus de cellules NIH-3T3 exprimant de façon stable la tyrosine kinase NPM-ALK, et surexprimant soit la protéine HuR sauvage, soit une protéine HuR mutée sur résidus tyrosine (mutants ponctuels ou triple mutant). Ces protéines porteront une étiquette HA de façon à les différencier de la protéine HuR endogène. Nous pourrions alors comparer la capacité des protéines mutantes non phosphorylables par rapport aux protéines HuR sauvages, à s'associer aux fractions polysomales, considérées comme celles renfermant les ARNm les plus activement traduits. Ces données seront complétées en mesurant directement, par des expériences de Western blot, le niveau de traduction de certaines cibles de HuR, comme par exemple les ARNm *C/EBPβ*, *VEGF* et *TCF4*, dans les différents contextes (surexpression de la protéine sauvage / surexpression des mutants non phosphorylables).

Enfin, nous souhaitons évaluer la relevance de la phosphorylation sur tyrosine de HuR dans la tumorigenèse. Nous envisageons pour cela de mesurer l'impact de l'expression des différents mutants de HuR non phosphorylables sur la viabilité des cellules NIH-3T3 ALK<sup>+</sup> *in vitro* et sur leur vitesse de croissance *in vitro* puis *in vivo* par un système de xénogreffes dans des souris nude. Si nos hypothèses sont correctes, l'expression de la protéine HuR mutée non phosphorylable devrait diminuer la croissance tumorale par rapport aux cellules exprimant la protéine HuR sauvage phosphorylée. Toutefois, le problème majeur dans cette stratégie expérimentale, réside dans le fait que nous travaillons avec des cellules qui expriment toujours la version sauvage de HuR, de façon endogène. Aussi, si les formes mutantes non phosphorylables de HuR que nous surexprimons n'ont pas d'effets "dominants négatifs", nous devons tout d'abord bloquer l'expression de la protéine HuR endogène (par ARN interférence) avant de pouvoir analyser un éventuel effet des différents mutants.

C'est en partie pour cette raison, mais également pour valider le rôle fonctionnel de la phosphorylation de HuR sur tyrosine que nous souhaitons également utiliser des mutants de HuR "phospho-mimétiques" (substitution des résidus tyrosine par des résidus D ou E). Nous comparerons, à l'aide de ces mutants, la croissance tumorale de cellules NIH-3T3 non transformées (dans lesquelles HuR n'est pas phosphorylée sur résidu tyrosine) après

xénogreffe dans des souris nude à celle de cellules NIH-3T3 exprimant les versions phospho-mimétiques de HuR. Si la phosphorylation de HuR sur résidu tyrosine a un impact sur la tumorigenèse, seules les cellules exprimant les formes phospho-mimétiques mutantes de HuR devraient permettre la formation de tumeurs *in vivo*.

Alors que nous avons montré que la phosphorylation de HuR sur résidu tyrosine est présente dans les lignées humaines de LAGC ALK<sup>+</sup>, nous n'avons pas pu poursuivre le travail de caractérisation de cette phosphorylation (identification des résidus tyrosine, rôle fonctionnel, etc..) dans ces cellules pour des raisons techniques (problèmes de transfections). Nous avons donc choisi de mener la suite de notre projet sur le modèle murin fibroblastique NIH-3T3 (38). A terme, et pour pouvoir à nouveau travailler sur le modèle humain de LAGC, nous envisageons de générer un (des) anticorps anti-HuR phospho-tyrosine spécifique(s). Il n'existe en effet actuellement aucun anticorps commercial qui permette d'étudier les modifications post-traductionnelles de HuR. Ces anticorps représenteront des outils indispensables à : (i) l'étude de la localisation subcellulaire de la protéine HuR ainsi phosphorylée ; (ii) la mesure "du statut de phosphorylation" de HuR, i.e. son "état d'activité", dans des conditions pathologiques, en particulier dans des cellules transformées suite à l'activation d'une kinase oncogénique comme dans les LAGC; (iii) la recherche de corrélation entre la phosphorylation sur résidus tyrosine de HuR et certains paramètres cliniques comme l'âge des patients, le sexe, le stade et le grade de la tumeur, les rechutes, (iv) à plus long terme au diagnostic.



# Résultats expérimentaux

## Article n°2

**La sous-expression du *miR-29a* dans les LAGC  
ALK<sup>+</sup> contribue au blocage de l'apoptose  
à travers la surexpression de MCL-1**



Alors que le travail retranscrit dans mon premier article nous a permis de mettre en évidence un rôle de la tyrosine kinase NPM-ALK dans les mécanismes de protection contre la dégradation et d'adressage aux polysomes via l'AU-BP HuR d'une classe particulière d'ARNm, les ARNm-ARE, ce deuxième travail, a permis d'appréhender un autre aspect de la régulation post-transcriptionnelle, également orchestré par la tyrosine kinase NPM-ALK: le contrôle de l'expression génique au niveau post-transcriptionnel par les miRNAs, à travers l'exemple du gène *Mcl1* et de la régulation de son expression par le *miR-29a*.

Il est aujourd'hui clair que NPM-ALK active de nombreuses voies de signalisation qui favorisent *in fine* l'expression de protéines impliquées dans des mécanismes clés de la lymphomagenèse dont la prolifération, la migration cellulaire et la survie. Parmi ces protéines, MCL-1 (myéloid cell leukemia-1), une protéine aux propriétés anti-apoptotiques de la famille BCL-2, est surexprimée dans les LAGC ALK<sup>+</sup>. Alors que certaines études ont rapporté que la surexpression de MCL-1 était due à une régulation qui s'exerçait au niveau transcriptionnel et traductionnel, via notamment les voies JAK/STAT et PI3K, d'autres ont montré que l'expression de *Mcl1* pouvait être régulée au niveau post-transcriptionnel par les miRNAs, en particulier miR29b. Dans ce contexte, le but de notre travail a été de démontrer l'implication des membres de la famille *miR29* dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression du gène *MCL-1* dans les LAGC ALK<sup>+</sup>.

Nous avons, dans un premier temps, montré que les lignées et tumeurs de LAGC ALK<sup>+</sup> possèdent de faible taux de *miR29a* et que ce faible niveau d'expression est dépendant de l'activité kinase de NPM-ALK. En effet, une diminution d'expression (par interférence ARN) ou une inhibition de l'activité kinase de NPM-ALK (grâce à l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de ALK: PF-2341066) entraîne une augmentation d'expression de *miR29a*. Nos expériences ont permis de démontrer, dans un deuxième temps, que l'expression du locus *miR29a* était, tout au moins en partie, réprimée par méthylation dans les cellules ALK<sup>+</sup>. Enfin, nous avons observé une corrélation inverse entre le taux de miR-29a et le niveau de protéines MCL-1, en lien avec le mécanisme d'apoptose. En effet, en augmentant l'expression de *miR29a*, nous avons observé une diminution de l'expression de MCL-1 associée à une augmentation de l'apoptose dans les lignées humaines de LAGC et dans un modèle de xénogreffe.

Ce travail a permis de montrer que l'expression du gène *Mcl1* était régulée au niveau post-transcriptionnel par un petit ARN non codant, le *miR-29a*, dans les LAGC ALK<sup>+</sup>. Il a permis de mettre en évidence, pour la première fois, l'implication de la tyrosine kinase NPM-ALK dans le contrôle de l'expression de ce miRNA, par méthylation de son promoteur.



Enfin, il révèle que la simple surexpression du miR29a pourrait moduler l'apoptose en diminuant l'expression de MclI dans les LAGC ALK<sup>+</sup>, ce mécanisme pouvant être un nouvel outil pour affecter la tumorigenèse de ces lymphomes.

## MiR-29a down-regulation in ALK-positive anaplastic large cell lymphomas contributes to apoptosis blockade through MCL-1 overexpression

Cécile Desjobert,<sup>1</sup> Marie-Hélène Renalier,<sup>2,6</sup> Julie Bergalet,<sup>1</sup> Emilie Dejean,<sup>1</sup> Nicole Joseph,<sup>2</sup> Anna Kruczynski,<sup>3</sup> Jean Soulier,<sup>4,5</sup> Estelle Espinos,<sup>1,6</sup> Fabienne Meggetto,<sup>1</sup> Jérôme Cavallé,<sup>2</sup> Georges Delsol,<sup>1,6,7</sup> and Laurence Lamant<sup>1,6,7</sup>

<sup>1</sup>Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, Inserm UMR1037, Université Paul Sabatier (UPS), Toulouse, France; <sup>2</sup>Centre National de la Recherche Scientifique, Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote (LBME), Toulouse, France; <sup>3</sup>Institut de Recherche Pierre Fabre, Toulouse, France; <sup>4</sup>Inserm U944 et Laboratoire d'Hématologie Assistance Publique, Hôpital Saint-Louis, Paris, France; <sup>5</sup>Institut Universitaire d'Hématologie, Université Paris Diderot, Paris, France; <sup>6</sup>Université Paul-Sabatier, Toulouse, France; and <sup>7</sup>Laboratoire d'Anatomie Pathologique, Centre Hospitalier Universitaire Purpan, Toulouse, France

Although deregulated expression of specific microRNAs (miRNAs) has been described in solid cancers and leukemias, little evidence of miRNA deregulation has been reported in ALK-positive (ALK<sup>+</sup>) anaplastic large cell lymphomas (ALCL). These tumors overexpress the major antiapoptotic protein myeloid cell leukemia 1 (MCL-1), a situation that could compensate for the lack of BCL-2. We report that ALK<sup>+</sup> ALCL cell lines and biopsy specimens (n = 20) express a low level of *miR-29a* and that this down-

modulation requires an active NPM-ALK kinase. Murine models (transgenic mice and mouse embryonic fibroblast [MEF] cells), which allow conditional NPM-ALK fusion protein expression, showed an increase of *miR-29a* expression in the absence of NPM-ALK. Concordant results were observed after the abolition of NPM-ALK kinase activity (siALK or PF-2341066) in NPM-ALK<sup>+</sup> ALCL cell lines. In addition, we showed that low expression of *miR-29a*, probably through methylation repression, plays an important

regulatory role in MCL-1 overexpression that could promote tumor cell survival by inhibiting apoptosis. Enforced *miR-29a* expression was found to modulate apoptosis through inhibition of MCL-1 expression in ALCL cell lines and in a xenografted model, with a concomitant tumor growth reduction. Thus, synthetic *miR-29a* represents a potential new tool to affect tumorigenesis in these lymphomas. (*Blood*. 2011;117(24):6627-6637)

### Introduction

Anaplastic lymphoma kinase-positive (ALK<sup>+</sup>) anaplastic large cell lymphoma (ALCL) is now recognized as a distinct entity in the World Health Organization (WHO) classification of hematopoietic tumors<sup>1,2</sup> and is characterized by the expression of an oncogenic fusion protein involving the ALK tyrosine kinase receptor.<sup>3,4</sup> Most of the activated pathways downstream to this fusion protein with a constitutive tyrosine kinase activity have been characterized and play major roles in lymphomagenesis in ALK<sup>+</sup> ALCL, controlling key cellular processes such as proliferation, survival, and cell migration (for review see Chiarle et al<sup>5</sup>). Another characteristic of ALK<sup>+</sup> ALCLs is the lack or low expression of the antiapoptotic proteins BCL-2 and BCL-XL, suggesting a possible explanation for their relatively good prognosis. However, these tumors overexpressed MCL-1 (myeloid cell leukemia-1), an oncogene of particular interest, belonging to BCL-2 family of apoptosis-regulating proteins,<sup>6</sup> and also involved in programming differentiation<sup>7</sup> and promoting cell viability.<sup>8</sup> MCL-1 expression could compensate for the lack of immunohistochemically detectable BCL-2 and BCL-XL expression in ALK<sup>+</sup> ALCL.<sup>9-11</sup> Some studies have suggested that the Jak-STAT and PI3K pathways activated in ALK<sup>+</sup> tumors could be involved in up-regulating MCL-1 but other pathways at the post-transcriptional level, such as microRNAs, might also contribute to its high expression in ALK<sup>+</sup> ALCL cases (see reviews by Akgul<sup>12</sup> and Michels et al<sup>13</sup>).

Micro-RNAs (miRNAs) are small noncoding RNAs that regulate target gene expression posttranscriptionally through base pairing within the 3'-UTR regions of the target messenger RNAs

and inducing their degradation, translational inhibition, or both of the encoded proteins.<sup>14,15</sup> MiRNAs play key regulator roles in fundamental biologic processes including cell differentiation, apoptosis, cell proliferation, organ development, and hematopoiesis (see review by Kluiver et al<sup>16</sup>). MicroRNA-29 (MiR-29) family members have been shown to be down-regulated in several hematopoietic neoplasms, including chronic lymphocytic leukemia with poor prognosis,<sup>17</sup> acute myeloid leukemia,<sup>18</sup> and mantle cell lymphoma,<sup>19</sup> as well as solid cancers such as lung cancer,<sup>20</sup> hepatocellular carcinoma,<sup>21</sup> and invasive breast cancer.<sup>22</sup> More particularly, *miR-29a*, *miR-29b*, or both directly target the antiapoptotic protein MCL-1 in cholangiocarcinoma,<sup>23</sup> hepatocellular carcinoma,<sup>21</sup> and acute myeloid leukemia (AML).<sup>18</sup> However, to date, only one study has addressed the expression and role of miRNAs in ALCL.<sup>24</sup> We decided to focus our attention on *miR-29* family members because they have recently been shown to regulate MCL-1 oncogene.

### Methods

#### Murine models

Generation of conditional transgenic mice and tetracycline/doxycycline (Tet)-off mouse embryonic fibroblast (MEF) cells (Clontech) for expression of NPM-ALK oncogene in our laboratory was described by Giuriato et al.<sup>25,26</sup> The tetracycline regulatory system was used to control the transgene transcription; the addition of doxycycline (an analog of tetracycline)

Submitted September 9, 2010; accepted March 17, 2011. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, April 6, 2011; DOI 10.1182/blood-2010-09-301994.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2011 by The American Society of Hematology

allowed silencing of NPM-ALK expression (off condition), and doxycycline removal permitted NPM-ALK conditional expression. Lymph nodes from on and off mice were used for RNA extractions.

### Human cell lines and tumoral and normal samples

Of the 5 ALCL cell lines studied, 4 were t(2;5)(p23;q35)<sup>+</sup> (Karpas 299,<sup>27</sup> SU-DHL-1,<sup>28</sup> COST,<sup>29</sup> and PIO [own laboratory unpublished cell line]), and one NPM-ALK<sup>-</sup> (FE-PD).<sup>30</sup> Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from 3 healthy donors used as normal lymphoid cells controls were kindly provided by Dr J. J. Fournié (UMR U1037).

Tumor samples from 20 ALK<sup>+</sup> ALCL, 12 ALK<sup>-</sup> ALCL, and 3 reactive lymph nodes (RLN) were retrieved from our tumor tissue bank. The study was carried out in accordance with the Université de Toulouse institutional review board–approved protocols, and the procedures followed were in accordance with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2000. The diagnosis of ALCL was based on morphologic and immunophenotypic criteria as described in the last WHO classification.<sup>1,2</sup> The percentage of malignant cells was assessed by ALK1 or CD30 staining and was greater than 50% for all selected cases. Antibody binding was detected with Dako REAL Detection System (Code K5001).

### Cell treatments

**ALK inhibitor treatment.** Racemic PF-2341066 [3-[1-(2,6-dichloro-3-fluoro-phenyl)-ethoxy]-5-(1-piperidin-4-yl)-1H-pyrazol-4-yl]-pyridin-2-ylamine] was synthesized according to the method described in the patent international application WO 2006/021881. ALCL cell lines were treated for 16 hours with 100nM PF-2341066.

**Demethylation treatment.** 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-DC; Sigma-Aldrich) was dissolved in culture media at 10 $\mu$ M and frozen at -20°C until use. Cells were seeded at a density of 2  $\times$  10<sup>5</sup> cells/mL and the drug was added at a final concentration of 3 $\mu$ M. Cells were harvested at day 3 for analysis.

### Bisulfite modification, PCR, and sequencing

The methylation status of the CpG sites upstream from *miR-29* cluster was determined by bisulfite sequencing. Genomic DNA was extracted, denatured, and modified using EZ DNA Methylation-Gold kit (Zymo Research) and then PCR-amplified using the following primers: Fwd-CpG-miR-29 5'-TGTGATTATTGGTTTTGAGTTA-3' and Rev-CpG-miR-29 5'-AAAAAACATACCTAAACTCCCTT-3'. PCR products were purified and cloned into the TOPO cloning system (Invitrogen). 7 clones were sequenced with T7 primer for each cell line.

### Array-comparative genomic hybridization analysis

Tumoral genomic DNA was extracted from ALCL tumor samples, and 250 ng was labeled and cohybridized with normal unrelated reference DNA on the 4  $\times$  180K Human Genome CGH Microarray (Agilent Technologies). After washing, the arrays were scanned and data were analyzed using Feature Extraction and Genomic Workbench 5.0 software.

### RNAs extraction

Total RNA extraction was performed from 40 frozen sections of tumor biopsies or from 10  $\times$  10<sup>6</sup> cells, using Trizol Reagent total RNA isolation reagent (Invitrogen) after the manufacturer's protocol. The concentration was quantified by NanoDrop Spectrophotometer (NanoDrop Technologies).

### Northern blotting

Total RNA (10  $\mu$ g) was separated on 15% denaturing polyacrylamide gel, electrotransferred to nylon membrane, UV-crosslinked, and prehybridized in hybridization buffer (5 $\times$  SSC [saline-sodium citrate], 1% SDS, 1 $\times$  Denhardt, and 150  $\mu$ g/mL tRNA). Oligonucleotides complementary to mature miRNAs were end-labeled with <sup>32</sup>P- $\gamma$ -ATP by T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs) and hybridized on membrane overnight mostly at 50°C. The blot was washed 2  $\times$  10' at room temperature in 2 $\times$  SSC, 0.1% SDS, and then 2  $\times$  15' at the same stringency (0.1 $\times$  SSC, 0.1%

SDS). Northern blots were processed for autoradiography or phosphorimager. Experiments were repeated in triplicate.

### Reverse-transcription-quantitative PCR

**RT-PCR quantification for mature miRNAs.** cDNA was synthesized from total RNA using gene-specific primers for *miR-29a*, *miR-29b*, or *miR-29c*, according to the TaqMan MicroRNA assay protocol (PE Applied Biosystems). Real-time PCR for each individual miRNA was performed using an Applied Biosystems 7300 Sequence detection system. Normalization of target miRNAs was done with the small noncoding nucleolar RNA *RNU24*, which has the least variability across our cell lines, tumor samples, and control samples (average Ct = 25.41, SD = .78). Data were presented as relative quantity (RQ) of target miRNA, normalized to *RNU24* and calculated by the 2<sup>- $\Delta$ Ct</sup> method.

**RT-qPCR quantification for *Mcl-1* mRNA.** cDNA was synthesized from 1  $\mu$ g of total RNA using Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen) with random primers. Quantitative PCR was performed on the cDNA diluted at 1:10 on an Applied Biosystems 7300 Sequence detection system using SYBR Green PCR reagents. *Mcl-1* primers were as follows: Forward 5'-AGTGCATCGAACCATTAGC-3', Reverse 5'-TCCTGATGCACCTTCTAGG-3'. Normalization of target mRNAs was done with an endogenous standard, *S14* (forward 5'-ATCAAACCTCCGGCCACAGGA-3', reverse 5'-CTGCTGTCAGAGGGGATGGGG-3'). Data were presented as relative quantity (RQ) of target miRNA, normalized to *S14* and calculated by the 2<sup>- $\Delta$ Ct</sup> method.

### miRNA and siRNA transfections

ALCL cells were maintained in exponential growth phase in IMDM supplemented with 15% FCS, L-glutamine (2mM), sodium pyruvate (1mM), and penicillin/streptomycin at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. miRNA transfections were performed using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol and 1 of the following: synthetic premiRNA-29a, miR negative control 1 (Ambion), or LNA anti-miR-29a (Sigma-Aldrich) or with a double-stranded RNA siALK (5'-GGGCGAGCUACUAUAGAAA55-3') at a final concentration of 150nM. Cells were washed twice in PBS 72 hours after transfections. RNA and protein extractions were performed for RT-qPCR or Western blotting subsequent analysis.

### Western blotting

The cell pellet was resuspended in passive lysis buffer (Promega) containing protease inhibitor cocktail (Roche), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 1mM, and phosphatase inhibitors (NaF 50mM, Na<sub>3</sub>V04 1mM). Protein lysates were separated using 10% SDS-acrylamide gels, and transferred onto Protran nitrocellulose membranes (Whatman). For immunodetection, membranes were incubated with antibodies directed against MCL-1 at 1/1000 (S-19, Santa Cruz Biotechnology), ALKc at 1/500 (Dr B. Falini, Perugia, Italy), phospho-ALK at 1/1000 (#3341, Cell Signaling Technology), STAT-3 and P-STAT3 at 1/1000 (#9132 & #9131, Cell Signaling Technology), DNMT1 and DNMT3b at 1/700 (#5119 & #2161, Cell Signaling Technology) or  $\beta$ -actin at 1/10 000 (A5441, Sigma-Aldrich). Signals from horseradish-peroxidase (HRP)-coupled secondary antibodies were generated by enhanced chemiluminescence solution (ECL; Amersham Biosciences) and recorded with films. Quantification was performed using GeneTools software from Syngene. Experiments were repeated in triplicate.

### Apoptosis assays

Karpas-299 and SU-DHL-1 cells were transfected with 150nM of one of the following: miR negative control, miR-29a, LNA anti-miR-29a, and miR-29a: LNA anti-miR-29a (1:1 ratio) following the protocol described. After 72 hours, cells were treated with 1 $\mu$ M doxorubicin (Sigma-Aldrich) for 6 hours to induce apoptosis. Flow cytometric analysis (FACS scan) of apoptotic cells was performed after annexinV/propidium iodide (PI) staining (Annexin-V-Fluos; Roche). Data were analyzed using FlowJo 7 software (TreeStar). Caspase 3/7 activities were determined using the

Caspase-Glo 3/7 assay according to manufacturer's instructions (Promega) and luminescence was monitored with a Mithras plate-reader (LB940).

### Tumorigenicity assay

Experiments on NOD/SCID mice were performed according to the institutional ethical guidelines of Inserm. MiR-29a or miR control-transfected Karpas-299 cells ( $10 \times 10^6$ ) were resuspended in 100  $\mu$ L of PBS and injected subcutaneously into either side of the flank of the same female at 6 weeks of age. Tumor growth in the 7 mice included was examined every 2 days. Tumor volume was monitored by measuring the length (L), width (W), and thickness (T) of the tumor with calipers and was calculated with the formula  $L \times W \times T \times 0.52$ . When control tumors reached a volume greater than 1000 mm<sup>3</sup>, mice were killed and tumors weighed. Tumors were analyzed for apoptotic cells by Caspase3 immunostaining (#AF835, 1/500, R&D Systems). Antibody binding was detected using streptavidin-biotin peroxidase complex (ABC) method and the Dako StreptABCComplex/HRP Duet (mouse) kit (Dakocytomation). The determination and counting of immunopositive cells in all the specimens were performed by one pathologist (L.L.) under masked conditions, and the procedure repeated 3 times. The number of positive cells was counted for a total of 10 neighboring high-power view fields ( $\times 400$ ), and the average number of positive cells was calculated. In parallel, MCL-1 expression was monitored by Western blotting, as described in "Western blotting."

## Results

### MiR-29a is less expressed in ALK<sup>+</sup> ALCL samples than in ALK<sup>-</sup> ones

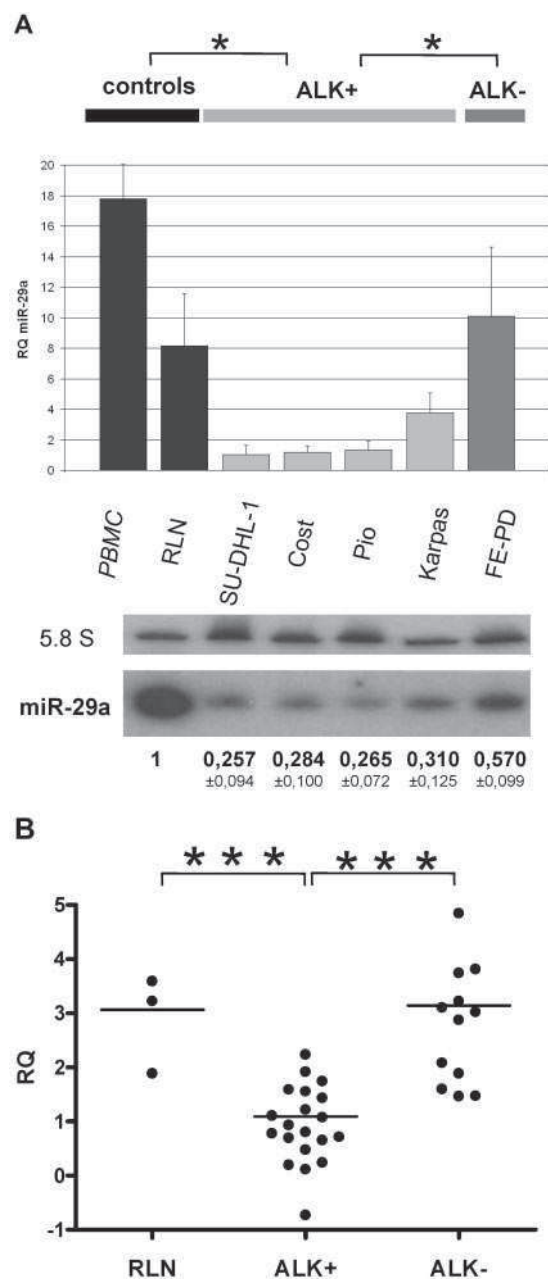
Because MCL-1 protein expression can be targeted by *miR-29* family members in other malignant diseases,<sup>17-23</sup> we focused our analysis on *miR-29* family expression in ALCL cell lines and tumors using RT-qPCR and Northern blotting. As shown in Figure 1A, *miR-29a* down-expression ranged from 2.5-fold to 10-fold in NPM-ALK<sup>+</sup> cell lines compared with the NPM-ALK<sup>-</sup> line, with concordant results by Northern blotting (approximately 2-fold change). Compared with peripheral blood mononuclear cells and reactive lymph nodes (RLNs) used as normal controls, *miR-29a* is also clearly less abundant in NPM-ALK<sup>+</sup> ALCL cell lines, using both detection methods (RT-qPCR:  $P < .05$ ; Northern blotting:  $P < .001$ ,  $t$  test). By contrast, *miR-29b* and *miR-29c* were found by RT-qPCR to be weakly expressed, without any significant variation between NPM-ALK<sup>+</sup> and NPM-ALK<sup>-</sup> cell lines (supplemental Figure 1, available on the *Blood* Web site; see the Supplemental Materials link at the top of the online article).

Twenty ALK<sup>+</sup> and 12 ALK<sup>-</sup> tumor samples, consisting of > 50% of tumor cells, were analyzed by RT-qPCR to confirm the significant low level of *miR-29a* in ALK<sup>+</sup> cells. As illustrated in Figure 1B, RT-qPCR showed that *miR-29a* was clearly lower expressed in ALK<sup>+</sup> tumors than in ALK<sup>-</sup> ALCL (4-fold change) and in RLNs.

### MiR-29a down-regulation depends on the expression of an active ALK fusion protein

Next, we asked whether the differential expression of *miR29a* observed between ALK<sup>+</sup> and ALK<sup>-</sup> samples was correlated to NPM-ALK expression. To address this issue, we used several models.

The 2 murine models developed in our laboratory, transgenic NPM-ALK mice<sup>26</sup> and a murine cellular model<sup>25</sup> (Tet-off MEF cells), both allow conditional NPM-ALK fusion protein expression under the control of doxycycline (Tet-off system). As expected,

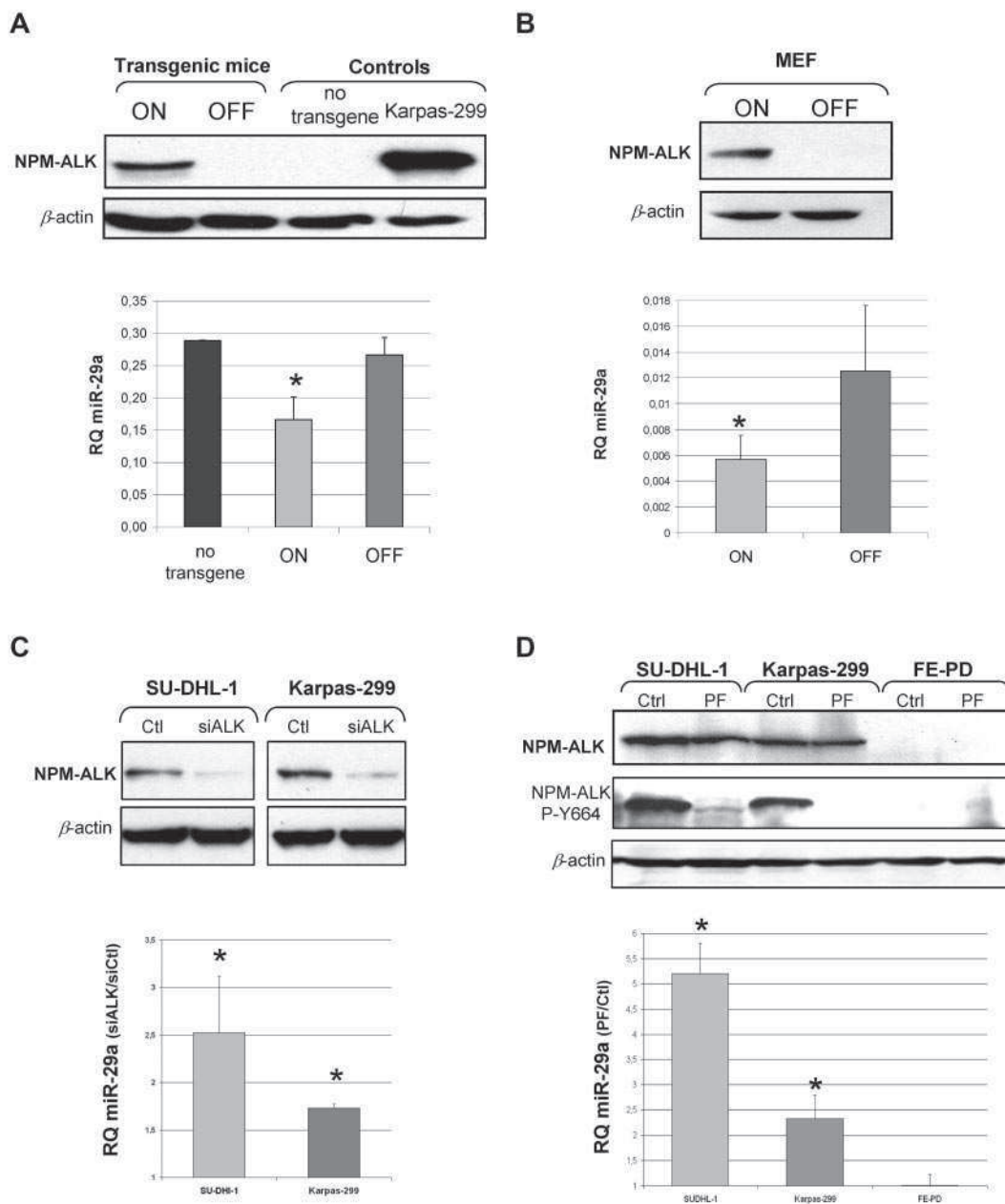


**Figure 1. MiR-29a is low expressed in ALK<sup>+</sup> ALCL.** (A) *MiR-29a* expression in ALK<sup>+</sup> (SU-DHL-1, COST, PIO, Karpas-299) and ALK<sup>-</sup> ALCL cells (FE-PD) was analyzed by RT-qPCR and Northern blotting. RNA from reactive lymph node (RLN) and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) serve as normal controls. The histogram shows the relative expression (RQ) of *miR-29a* after normalization with *RNU24*. Bars represent standard deviations (SD).  $P$  for ALK<sup>+</sup> vs controls and ALK<sup>+</sup> vs ALK<sup>-</sup> ( $*P < .05$ ). 5.8S RNA was used as the loading control in the Northern blotting.  $P$  for ALK<sup>+</sup> vs controls ( $P < .001$ ) and ALK<sup>+</sup> vs ALK<sup>-</sup> ( $P < .05$ ). (B) RT-qPCR of *miR-29a* in 20 ALK<sup>+</sup> and 12 ALK<sup>-</sup> patient tumors. Three RLNs were used as normal controls. RQ was plotted on a logarithmic scale.  $P$  for ALK<sup>+</sup> vs RLN and ALK<sup>+</sup> vs ALK<sup>-</sup> ( $***P < .001$ ).

transgenic mice lymph nodes and Tet-off MEF cells showed ALK fusion protein expression after doxycycline removal (on condition) (Figure 2A-B). In the absence of the ALK fusion protein (off condition), *miR-29a* level was increased 1.6-fold in transgenic mice (Figure 2A) and 2.2-fold in MEF cells by RT-qPCR (Figure 2B).

We also performed siRNA anti-ALK (siALK) experiments in 2 human ALK<sup>+</sup> cell lines (SU-DHL-1 and Karpas-299). After checking the knockdown of NPM-ALK by siALK (Figure 2C), we

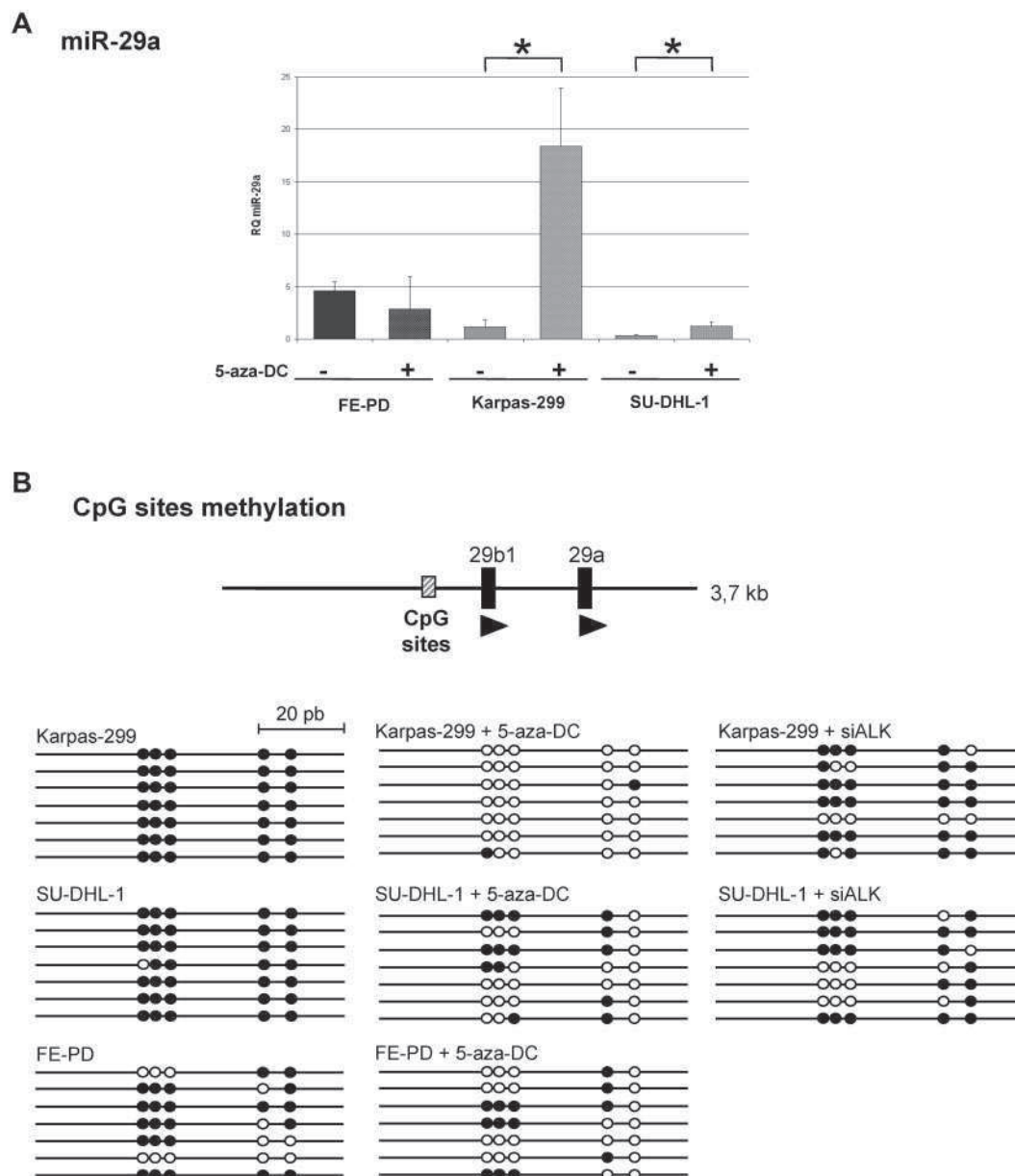




**Figure 2. MiR-29a expression is dependent on NPM-ALK.** Using murine conditional models NPM-ALK fusion protein expression was analyzed by Western blotting (A) in lymph nodes of conditional NPM-ALK transgenic mice and (B) in MEF NPM-ALK cells in on and off conditions.  $\beta$ -actin was used as a loading control. In both models, *miR-29a* was detected by RT-qPCR in on and off conditions (histograms). Data are representative of 3 independent experiments. *P* for on vs off ( $*P < .05$ ). (C) Human ALCL ALK<sup>+</sup> cell lines (SU-DHL-1 and Karpas-299) were transiently transfected with an anti-ALK siRNA (siALK) or a control siRNA (Ctl) and inhibition of NPM-ALK protein expression was assessed by Western blotting. (D) ALCL cells were treated with an NPM-ALK inhibitor (PF-2341066) and its autophosphorylation status was detected with an antibody directed against phosphorylated-tyrosine 664 (NPM-ALK P-Y664).  $\beta$ -actin was used as a loading control. Expression levels of *miR-29a*, by RT-qPCR in ALCL cell lines after transfection with siALK (C) or treatment with PF-2341066 (D) are presented as the ratio of RQ (siALK/Ctl) and RQ (PF/Ctl) respectively. *P* for siALK vs Ctl and PF vs Ctl ( $*P < .05$ ).

monitored *miR-29a* level by RT-qPCR. Results were in agreement with those obtained in mouse models, with an increase of 2.5-fold and 1.7-fold after NPM-ALK inhibition, in SU-DHL-1 and Karpas-299 cell lines, respectively (Figure 2C). Furthermore, we showed that *miR-29a* expression was dependent on the active NPM-ALK protein. NPM-ALK<sup>+</sup> cell lines and NPM-ALK<sup>-</sup> cell lines were treated for 16 hours with 100nM concentration of the kinase inhibitor, PF-2341066, an efficient inhibitor of NPM-ALK activity in vitro and in vivo.<sup>31</sup> It is well known that PF-2341066 is an ATP-competitive and selective small-molecule inhibitor of NPM-ALK and c-Met under our experimental conditions (100nM). However, we checked by Western blotting that the level of c-Met

phosphorylation was very low in basal conditions and was not affected by PF-2341066 treatment (data not shown). NPM-ALK kinase activity was inhibited with loss of NPM-ALK autophosphorylation on the tyrosine-664 residue (Figure 2D). Following this inhibition, *miR-29a* was increased by factors of 5.2 and 2.4 in the SU-DHL-1 and Karpas-299 cell lines, respectively (Figure 2D). No change in *miR-29a* expression was observed in NPM-ALK<sup>-</sup> cells. Moreover, this effect on *miR-29a* was specific, because *miR-29b*, *miR-29c*, and the unrelated *miR-222* expression remained unaffected by PF-2341066 treatment (data not shown). Altogether, these data confirmed an NPM-ALK-dependent repression of *miR-29a* expression.



**Figure 3. Epigenetic regulation of *miR-29a*.** (A) *miR-29a* expression levels by RT-qPCR with or without 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-DC) treatment in Karpas-299, SU-DHL-1 (ALK<sup>+</sup>) and FE-PD (ALK<sup>-</sup>) cells are shown. Data represent the mean of triplicates with standard deviations (SD) and \**P* < .05. (B) Schematic representation of *miR-29* locus on chromosome 7, coding for *miR-29b1* and *miR-29a* (black boxes). The prediction of a CpG-enriched site with Emboss CpGPlot software (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/index.html>) is represented as a dashed box and contains 5 CpG sites. Bisulphite sequencing of these 5 CpG sites in cells treated with 5-aza-DC or transfected with siALK, and control ALCL cells. Each circle indicates a CpG dinucleotide (●: methylated CpG; ○: unmethylated CpG).

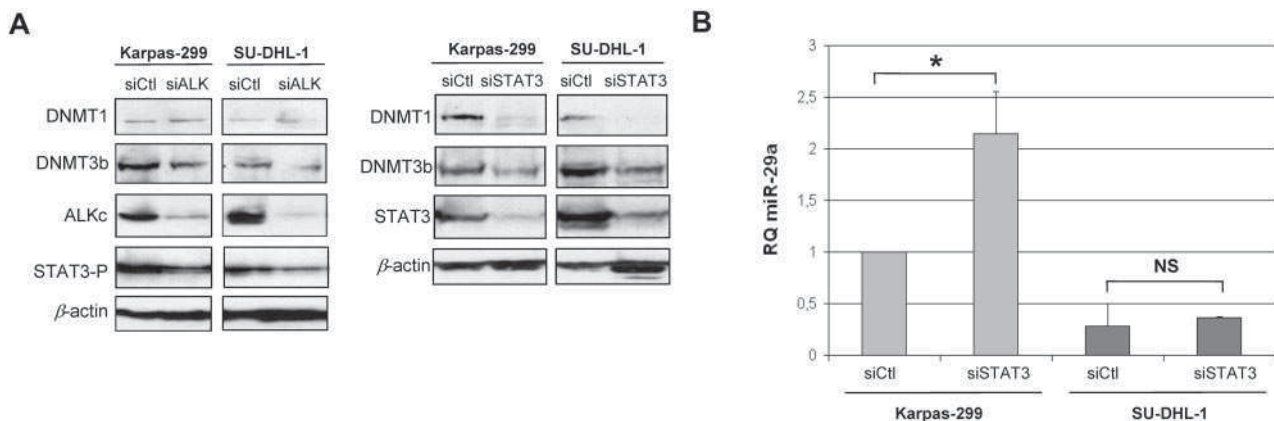
### DNA methylation in NPM-ALK<sup>-</sup> expressing cells contributes partially to silencing of *miR-29a*

To identify the mechanisms involved in *miR-29a* low expression in ALK-expressing cells, we searched for DNA structural or epigenetic modifications.

*miR-29a* is expressed from only one locus, located on chromosome 7 (Chr 7q32.3), inside common fragile site FRA7H, and coding for *miR-29a* and *miR-29b1*. In the 20 ALK<sup>+</sup> ALCL cases tested, high-resolution array-based comparative hybridization analysis (CGH arrays) did not show any deletion of this locus (data not shown).

We further investigated whether *miR-29a* weaker expression in NPM-ALK<sup>+</sup> cells could be explained by epigenetic mechanisms, given that miRNAs genes can be regulated by DNA methyl-

ation.<sup>32-35</sup> First, NPM-ALK<sup>+</sup> and NPM-ALK<sup>-</sup> cell lines were treated with a demethylating agent (5-aza-2'-deoxycytidine [5-aza-DC]) for 3 days and *miR-29a* level was subsequently determined by RT-qPCR. A significantly higher level of *miR-29a* was detected in Karpas-299 and SU-DHL-1 treated cells (8-fold and 3.6-fold increase, respectively, Figure 3A), whereas there was no significant change in the FE-PD cell line. The level of *miR-29b*, which is also expressed from another locus (Chr 1q32.2), was not affected (not shown). These results led us to look for the presence of CpG sites upstream from *miR-29a* coding gene using bioinformatic software (Emboss CpGPlot from EMBL-EBI: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/>). One CpG-enriched site was predicted in this region and contains 5 CpG dinucleotides in 72 bp (Figure 3B). Bisulphite sequencing on nontreated or 5-aza-DC-treated cells was



**Figure 4. DNMT and STAT3 role in *miR-29a* low-expression.** (A) DNMT1 and DNMT3b endogenous expression in ALK<sup>+</sup> ALCL cell lines were detected by Western blotting following NPM-ALK or STAT3 knockdown by siRNA. (B) RQ *miR-29a* after inhibition of STAT3 in Karpas-299 and SU-DHL-1 cells. *P* for siCtl vs siSTAT3 in Karpas-299 (\**P* < .05). NS: not significant.

performed to identify methylation status of these CpG sites. As shown in Figure 3B, the 5 CpG were hypermethylated in NPM-ALK<sup>+</sup> Karpas-299 and SU-DHL-1 cells (97%-100%), compared with the NPM-ALK<sup>-</sup> ones (66%). Methylation was reverted for the majority of the CpG sites after demethylation treatment, with a greater efficiency in Karpas-299. To demonstrate the link between the methylation status of these CpG sites and NPM-ALK expression, we also sequenced this region in Karpas-299 and SU-DHL-1 cells transfected with an anti-ALK siRNA (siALK). Following NPM-ALK knockdown (Figure 2C), we observed a partial demethylation of these CpG sites, ranging from 26% to 37% (Figure 3B), not observed with the siRNA control (data not shown). Concomitant increase of *miR-29a* expression was observed with an increase of 2.5-fold and 1.7-fold, in SU-DHL-1 and Karpas 299 cell lines, respectively (Figure 2C).

As STAT3 protein is able to induce methylation of some genes, through transcriptional activation of DNA methyltransferases (DNMTs), we have determined the level of DNMT1 and 3b in ALK and STAT3 knockdown conditions (Figure 4A). In siALK conditions, we observed, as expected, a decrease of STAT3 activation, and in parallel a decrease of DNMT3b protein, although DNMT1 expression was poorly affected. In conditions of strong inhibition of STAT3 in Karpas-299 (compared with its inhibition via siALK), both DNMT3b and DNMT1 proteins were decreased, with concomitant increase of *miR-29a* expression (Figure 4B). In SU-DHL-1, STAT3 inhibition by siRNA was less effective, with a weaker down-regulation of DNMT3b but a complete abolition of DNMT1 expression. However, in this cell line, the *miR-29a* re-expression was not significant, suggesting that DNMT3b is much more involved in *miR-29a* methylation than is DNMT1. These findings suggest that *miR-29a* expression was partly repressed by methylation in NPM-ALK-expressing cells, via STAT3 activation.

#### ***Mcl-1* is a target of *miR-29a* in NPM-ALK<sup>+</sup> ALCL cells**

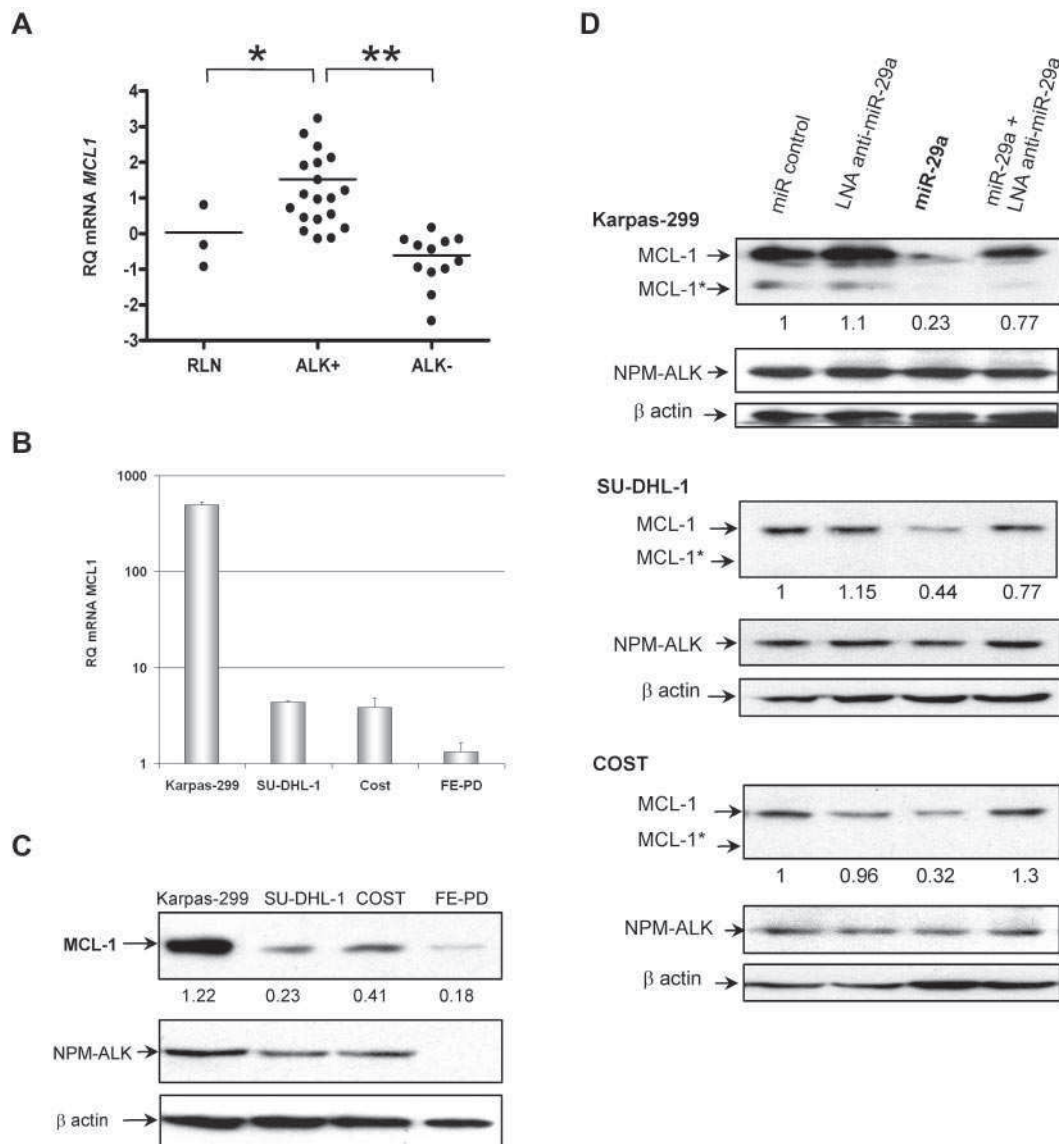
We investigated whether *miR-29a* was able to modulate MCL-1 protein level in ALK<sup>+</sup> ALCL tumors and cell lines, because *Mcl-1* has been proved to be targeted by *miR-29* in cholangiocarcinoma cell line,<sup>23</sup> hepatocellular carcinoma,<sup>21</sup> and AML.<sup>18</sup> First, we checked the basal level of *Mcl-1* mRNA by RT-qPCR in 20 cases of ALK<sup>+</sup> tumors and 12 ALK<sup>-</sup> samples. Figure 5A shows a significantly high level of *Mcl-1* mRNA in the ALK<sup>+</sup> cases compared with the ALK<sup>-</sup> tumors and RLN (*P* < .05, *t* test). In cell lines, RT-qPCR assays also demonstrated an up-regulation of *Mcl-1*

mRNA in NPM-ALK<sup>+</sup> cell lines compared with the FE-PD cell line, with a strikingly high level present in Karpas-299 compared with SU-DHL-1 and COST cell lines (Figure 5B). Similar results were obtained in Western blotting analysis for MCL-1 protein expression (Figure 5C). The higher mean relative value of *Mcl-1* mRNA in ALK<sup>+</sup> cell lines compared with ALK<sup>+</sup> ALCL biopsies could be explained by the percentage of tumor cells expressing MCL-1 in cell lines compared with biopsies.

To ascertain that MCL-1 can be targeted by *miR-29a* in ALK<sup>+</sup> cells, we performed a gain-of-function experiment of *miR-29a* in Karpas-299, SU-DHL-1, and COST cells. *MiR-29a* or a miR negative control was transiently transfected and endogenous MCL-1 expression was detected by Western blotting (Figure 5D). The long isoform of MCL-1 (40 kDa) was mainly detected. Densitometric measurement of the bands showed that MCL-1 protein level was reduced by 56% to 77% in *miR-29a*-expressing NPM-ALK<sup>+</sup> cells, compared with the control. Cotransfection with an LNA anti-*miR-29a* double-strand oligonucleotide abolished the *miR-29a* inhibitory effect on MCL-1 protein level. No change was observed in *Mcl-1* expression at the mRNA level between the different transfection conditions (data not shown). Moreover, we did not observe any effect of *miR-29a* overexpression on NPM-ALK (Figure 5D) and STAT3 protein expression (supplemental Figure 2).

#### ***MiR-29a* sensitizes NPM-ALK<sup>+</sup> ALCL cells to apoptosis through MCL-1 targeting**

As the antiapoptotic protein MCL-1 is targeted by *miR-29a* in our model, we examined the effect of *miR-29a* overexpression on apoptosis in ALK<sup>+</sup> cells. Karpas-299 and SU-DHL-1 cells were transiently transfected with *miR-29a*, miR negative control, or locked nucleic acid (LNA) anti-*miR-29a* double-strand oligonucleotide. Cells were then induced to undergo apoptosis with doxorubicin, a drug commonly used in the treatment of patients with ALCL. After annexin-V/PI assays, *miR-29a*-transfected Karpas-299 cells presented an apoptotic cell rate of 21.2% compared with 12.3% with the miR-negative control (Figure 6A). Transfection of *miR-29a* together with LNA anti-*miR-29a* partly reverted *miR-29a* sensitization to apoptosis. We confirmed these observations by Caspase 3/7 activities measurements, showing an apoptosis enhancement with *miR-29a* between 2-fold and 3.6-fold compared with controls (Figure 6C). In parallel, we checked MCL-1 proteins that showed a caspase-cleaved pattern after apoptosis induction, as previously described<sup>36</sup>: in addition to the long form of 40 kDa



**Figure 5. MiR-29a targets MCL-1 in NPM-ALK<sup>+</sup> ALCL cells.** (A) mRNA levels of *Mcl-1* in ALK<sup>+</sup> (19 cases) and ALK<sup>-</sup> (12 cases) ALCL tumors by RT-qPCR. Three RLNs serve as controls. RQ of *Mcl-1* was calculated using the *S14* as standard control. *P* for ALK<sup>+</sup> vs RLN and ALK<sup>+</sup> vs ALK<sup>-</sup> (\**P* < .05). MCL-1 endogenous expression in ALCL cell lines is shown in panel B by RT-qPCR with RQ plotted on a logarithmic scale and in panel C by Western blotting with the ratio of MCL-1/βactin. (D) MCL-1 protein levels were monitored 72 hours after Karpas-299, SU-DHL-1, and COST transfection with 1 or 2 (1:1 ratio) of the following: miR negative control, *miR-29a*, or LNA-anti-*miR-29a*. The long isoform of MCL-1 (40 kDa) was mainly detected. β-actin was used as a loading control to determine the relative expression of MCL-1 (long MCL-1 at 40 kDa and short MCL-1\* at 28 kDa forms added) as the ratio of MCL-1/β actin. Data are representative of 3 independent experiments.

(MCL-1), a shorter protein of 28 kDa (MCL-1\*) appeared in all transfected and doxorubicin-treated cells. Both MCL-1 isoforms are reduced by at least 2-fold in *miR-29a* transfected cells with respect to controls (Figure 6B and 6D). Altogether, these data demonstrated that *miR-29a* overexpression sensitizes NPM-ALK<sup>+</sup> ALCL cells to Doxorubicin-induced apoptosis through MCL-1 targeting.

#### Effects of *miR-29a* overexpression in a xenograft model

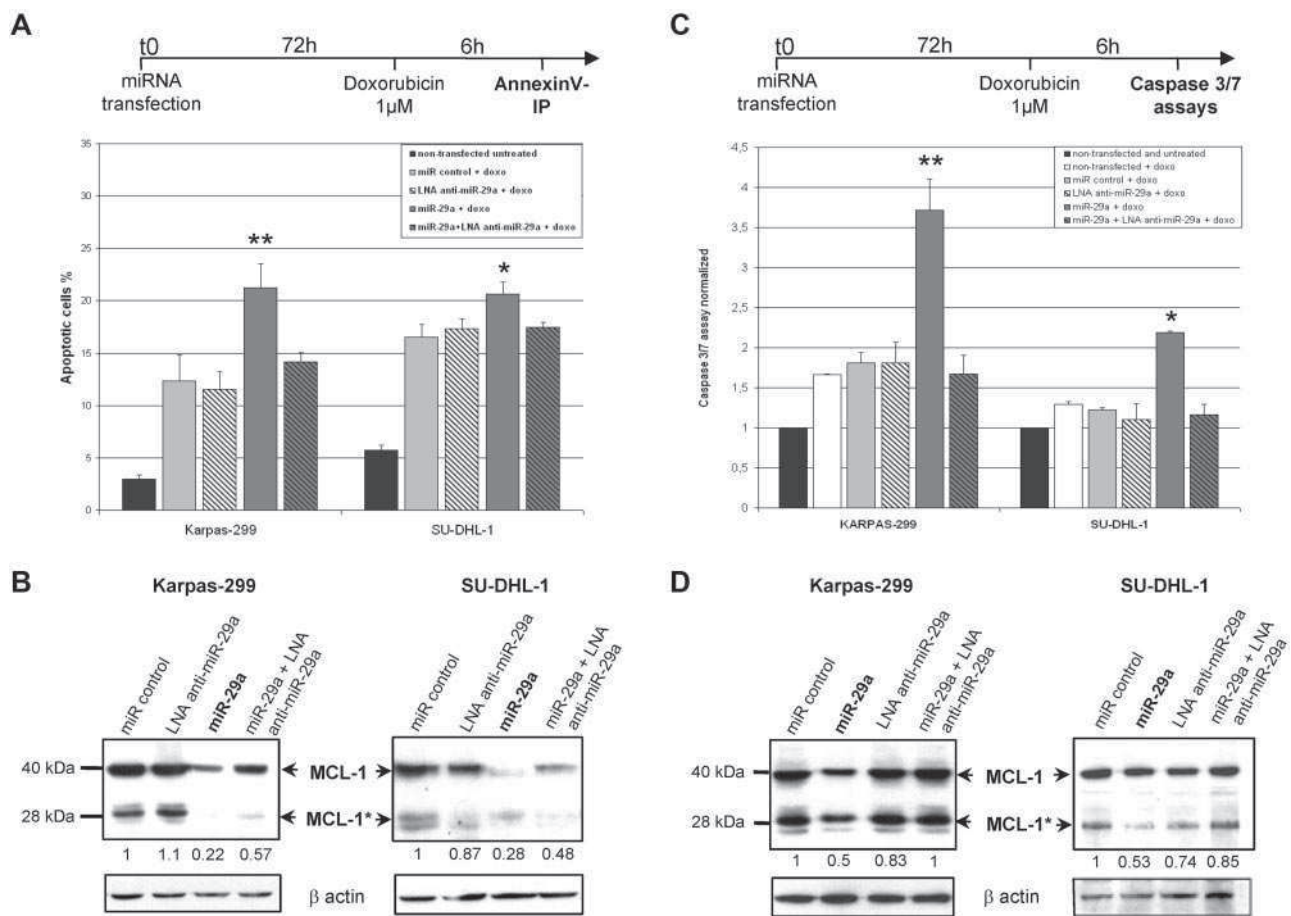
An *in vivo* model was subsequently used to evaluate *miR-29a* tumor suppressor effect. Karpas-299 cells were transfected with *miR-29a* or miR-control and inoculated in right and left flanks, respectively, of immunocompromised NOD/SCID mice (n = 7). *MiR-29a*-transfected cells revealed a delayed tumor formation over time, and tumors weighed significantly less at the end of the experiment (0.7 g for *miR-29a*-transfected tumors compared with

1.2 g for miR-control transfected tumors; Figure 7A-B). We analyzed apoptosis using Caspase-3 immunohistochemistry (Figure 7C). *MiR-29a*-transfected tumors displayed a significant increase of apoptotic cells with respect to the control (*P* < .01), that correlated with MCL-1 protein down-expression (Figure 7 D). These results support a tumor suppression effect of *miR-29a* *in vivo*, via a decreased MCL-1 expression.

## Discussion

Our study showed that ALK<sup>+</sup> ALCL cell lines, as well as biopsy specimens, presented a low expression of *miR-29a* compared with ALK<sup>-</sup> cell lines. Furthermore, we demonstrated that NPM-ALK kinase activity is critical for *miR-29a* down-regulation in ALK<sup>+</sup>





**Figure 6. MiR-29a overexpression enhances doxorubicin-induced apoptosis in NPM-ALK<sup>+</sup> ALCL cells.** Karpas-299 and SU-DHL-1 NPM-ALK<sup>+</sup> cells were transiently transfected with miR negative control, miR-29a, or LNA anti-miR-29a oligonucleotides for 72 hours. Doxorubicin (1µM) was then used for 6 hours to induce apoptosis. AnnexinV/PI staining (A) and Caspase 3/7 assays (C) were used to assess apoptosis. Histograms showed the percentage of apoptotic cells and the normalized Caspase 3/7 activities, respectively (\**P* < .05 and \*\**P* < .01). (B,D) Western blotting for MCL-1 in miRNA-transfected and doxorubicin-treated cells demonstrated the presence of long (MCL-1 at 40 kDa) and short caspase-cleaved (MCL-1\* at 28 kDa) MCL-1 proteins. Densitometry measurements of both forms were added and normalized with β-actin.

cells, partly through methylation regulation. This down-regulation contributes in part to the expression of MCL-1, the main antiapoptotic BCL-2 family member present in ALK<sup>+</sup> ALCL, and thus to tumor cell survival.

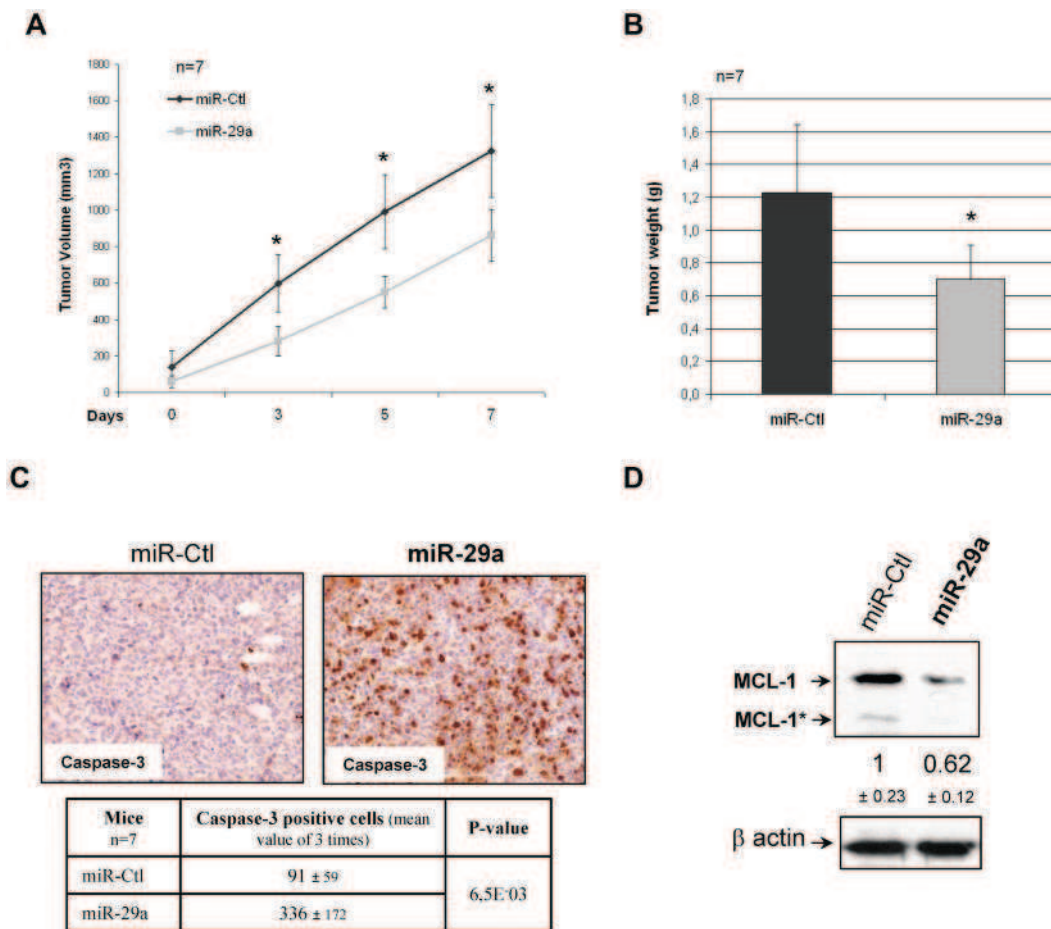
Expression levels of antiapoptotic BCL-2 family members such as BCL-XL, BCL-2, and MCL-1<sup>6</sup> have already been assessed in ALCL.<sup>9-11</sup> These studies underlined the absence of BCL-2 expression and low or undetectable expression of BCL-XL in ALK<sup>+</sup> ALCL compared with ALK<sup>-</sup> tumors. MCL-1, in absence of BCL-2, could promote tumor cell survival by inhibiting cell death.<sup>10,11</sup> Rust et al found no difference in MCL-1 staining intensity or percentage of positive tumor cells between ALK<sup>+</sup> and ALK<sup>-</sup> cases.<sup>11</sup> By contrast, Rassidakis et al reported that MCL-1 was detected in only 61.5% of ALK<sup>-</sup> ALCL with a lower number of positive cells.<sup>10</sup> Our results showing significantly more abundant *Mcl-1* mRNA in ALK<sup>+</sup> compared with ALK<sup>-</sup> ALCL are in agreement with this latter study.

The mechanisms of MCL-1 expression in ALCL tumors are not completely understood. In a recent study, Amin et al demonstrated the STAT3-mediated induction of *Mcl-1* transcription in 2 ALK<sup>+</sup> ALCL cell lines,<sup>37</sup> but the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway has also been demonstrated in other models.<sup>38,39</sup> Moreover, Mott et al were the first to demonstrate in a cholangiocarcinoma cell model that MCL-1 could also be regulated at the posttranscriptional level, notably by *miR-29b*.<sup>23</sup> The results of our

study are in line with those reported by Mott et al,<sup>23</sup> and more recently by Garzon et al<sup>18</sup> and Xiong et al,<sup>21</sup> because we found that *miR-29a*, another member of the *miR-29* family, contributes to the up-regulation of MCL-1 in ALK<sup>+</sup> ALCL.

Using RT-qPCR, we observed a significant lower expression of *miR-29a* in ALK<sup>+</sup> compared with ALK<sup>-</sup> ALCL cell lines, whereas *miR-29b* and *miR-29c* were poorly detected and not differentially expressed. Although *miR-29a* and *miR-29b* are partially cotranscribed (*miR-29b* being also transcribed from another locus with *miR-29c*), the discrepancy between *miR-29a* and *miR-29b* expression has already been observed by Hwang et al, who suggest a specific posttranscriptional mechanism preventing the accumulation of *miR-29b* but not that of *miR-29a*.<sup>40</sup> We confirmed the low expression of *miR-29a* in a series of ALK<sup>+</sup> ALCL tumor samples, compared with ALK<sup>-</sup> ones or normal controls (ie, PBMCs and reactive lymph nodes, the normal counterpart of ALCL being yet unknown).

Moreover, using 2 different murine models, we demonstrated that *miR-29a* lower expression was dependent on the expression of an active NPM-ALK kinase. Indeed, both transgenic mice and MEF cells, which allow conditional NPM-ALK fusion protein expression,<sup>25,26</sup> showed a clear increase of *miR-29a* expression in the absence of the fusion protein. Comparable results were observed when NPM-ALK expression or its phosphorylation was abolished in human NPM-ALK<sup>+</sup> ALCL cells, using an anti-ALK



**Figure 7. Effect of *miR-29a* on tumor growth.** NOD-SCID mice were xenografted with Karpas-299 cells transfected with *miR-29a* or miR-control (miR-Ctl). (A) Curves of tumor growth showing tumor volumes (in cubic millimeters) at the indicated days and (B) histograms of tumor weight (grams) averages at the end of the experiment. *P* for *miR-29a* vs control (*\*P* < .05). (C) Representative images of immunostaining with Caspase-3 antibody for miR-Ctl and *miR-29a* tumors (Leica Digital Module R[DMR] microscope equipped with DFC300FX camera and 200×/0.85 NA objective lens, original magnification ×400). Image processing was performed using IM50 software from Leica. Table shows the average of Caspase-3–positive cells for all 7 mice, counted 3 times each, with SD and *P* value. (D) Representative Western blotting for MCL-1 in miR-Ctl and *miR-29a*–expressing tumors. Normalized mean value and SD of densitometry measurements are shown (*n* = 7).

siRNA and the ALK kinase inhibitor PF-2341066, respectively. This molecule is known to inhibit both ALK and c-Met kinase activity. However, the unaffected level of c-Met phosphorylation in our PF-2341066–treated cell lines excluded a bystander effect on *miR-29a* expression. Altogether these observations showed that *miR-29a* weaker expression is strongly correlated with the expression of a constitutively active NPM-ALK fusion protein.

Next, we attempted to elucidate the mechanisms underlying *miR-29a* down-regulation. Previous studies have demonstrated that inactivation of *miR-15a* and *miR-16-1* in chronic lymphocytic leukemia and prostate carcinoma can be regulated by genetic changes<sup>41</sup> (eg, translocations or deletions) or epigenetic modifications such as hypermethylation of regulatory elements.<sup>32-35</sup> The lack of DNA copy number alterations in the genomic loci containing *miR-29* gene (chr7q32.3), as demonstrated by our CGH-array analysis, made it unlikely that *miR-29a* inactivation was related to genetic changes. We postulated that *miR-29* gene could be silenced by epigenetic mechanisms as demonstrated for an increasing number of micro-RNAs in other various types of cancers (review by Valeri et al<sup>42</sup>). Because methylation can be reversed by the use of epigenetics drugs, we treated 2 NPM-ALK<sup>+</sup> cell lines with 5-aza-DC. This demethylating agent induced an increase in *miR-29a* levels in NPM-ALK<sup>+</sup> treated cells, whereas no significant change was observed in NPM-ALK<sup>-</sup> cell line. The

promoter of the *miR-29* cluster on chromosome 7, encoding *miR-29a*, has not yet been identified. However, it contains a CpG-enriched site in its upstream 1kb region, as predicted by bioinformatics. These 5 CpG sites were identified as heavily methylated in NPM-ALK<sup>+</sup> cell lines and this methylation was partially reverted by treatment with 5-aza-DC and, to a lesser extent, after NPM-ALK knockdown by siRNA. These latter observations suggested that NPM-ALK is involved in the hypermethylation of these sites, contributing to *miR-29a* repression. This genomic region, upstream of *miR-29* cluster, probably contains regulatory elements for *miR-29* expression that could be targeted by NPM-ALK effectors. For instance, STAT3 protein is able to induce methylation of the *ZAP70* gene, in ALK<sup>+</sup> ALCL, through transcriptional activation of *DNMT1* (DNA methyltransferase 1).<sup>43</sup> To determine whether the effect on methylation of the *miR29* cluster is mediated by STAT3 activation downstream to NPM-ALK, we invalidated STAT3 with an siRNA. We observed that DNMT3b and DNMT1 proteins were decreased, with concomitant increase of *miR-29a* expression. These results suggest that methylation of the *miR29* cluster could be partly regulated by STAT3 in NPM-ALK–expressing cells. Moreover, DNMT3, targeted by *miR-29a* (data not shown), could amplify this mechanism in a positive feedback loop.<sup>44</sup>

*MiR-29* family members have been shown to be down-regulated in several hematopoietic neoplasms, including chronic lymphocytic leukemia with poor prognosis,<sup>17</sup> acute myeloid leukemia,<sup>18</sup> and mantle cell lymphoma,<sup>19</sup> as well as solid cancers such as lung cancer,<sup>20</sup> hepatocellular carcinoma,<sup>21</sup> and invasive breast cancer.<sup>22</sup> More particularly, *miR-29a*, *miR-29b*, or both directly targets the antiapoptotic protein MCL-1 in cholangiocarcinoma,<sup>23</sup> hepatocellular carcinoma,<sup>21</sup> and AML.<sup>18</sup> Results from the current study showed that *miR-29a* is also able to target MCL-1 in NPM-ALK<sup>+</sup> ALCL cell lines. Indeed, endogenous MCL-1 protein expression was strikingly decreased in NPM-ALK<sup>+</sup> cells transfected with *miR-29a*. It is known that *miR-29a* acts directly at the *Mcl-1* 3'UTR.<sup>21</sup> The fact that cotransfection with a LNA anti-*miR-29a* in NPM-ALK<sup>+</sup> cells abolishes the *miR-29a* inhibitory effect on MCL-1 protein level suggests a direct role of this miRNA on MCL-1 expression. However, *Mcl-1* mRNA expression was not affected after *miR-29a* transfection. This could explain why this messenger was not found as down-regulated, in our gene array study, after *miR-29a* transfection of ALK<sup>+</sup> ALCL cell lines (see supplemental data and supplemental Table 1). Nevertheless, although MCL-1 is transcriptionally induced in particular by STAT3,<sup>37</sup> *miR-29a* low expression could contribute to support high MCL-1 expression.

Given that MCL-1 is an antiapoptotic protein, we assessed the induction of apoptosis by exogenous *miR-29a* in the Karpas 299 and SU-DHL-1 cell lines and in a xenograft model. In ALCL cell lines, *miR-29a* overexpression followed by doxorubicin treatment (commonly used in ALCL chemotherapy) resulted in an increased rate of apoptosis compared with the control. These results are in agreement with those reported by Garzon et al in AML<sup>18</sup> and by Xiong et al in hepatocellular carcinoma.<sup>21</sup> Moreover, we can assume that the impact of *miR-29a* on apoptosis is mediated by translation inhibition of the MCL-1 long form, because this isoform is mainly detected in *miR-29a*-transfected cells, before doxorubicin treatment. Furthermore, the specific effect of *miR-29a* was confirmed using an anti-*miR-29a* to restore MCL-1 protein expression. The tumor suppressor effect of *miR-29a* via a decreased MCL-1 expression was also demonstrated in vivo in mice xenografted with *miR-29a*-transfected Karpas-299 cells. These observations therefore support a role of *miR-29a* low

expression in apoptosis blockade through MCL-1 high expression in ALK<sup>+</sup> cells.

In this study, we demonstrated that, in addition to its transcriptional regulation,<sup>37,38</sup> MCL-1 is also regulated at the posttranscriptional level by *miR-29a* in ALK<sup>+</sup> ALCL, thus suggesting a survival advantage in silencing *miR-29a*. For the first time, we showed that *miR-29a* low expression is regulated by NPM-ALK oncogene, partly through epigenetic mechanism. Thus, *miR-29a* re-expression could modulate apoptosis by inhibiting MCL-1 expression in ALK<sup>+</sup> ALCL, and might be a new tool to affect tumorigenesis in these lymphomas.

## Acknowledgments

We thank Sophie Peries, Celine Lopez, Jeannine Boyes, and Marianne Foisseau for technical support and help. We are grateful to Prof Pierre Brousset and Dr Karen Pulford for critically reviewing the manuscript.

This work was supported by grants from the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC), INCa (projet PAIR Lymphomes), Projet Hospitalier de Recherche Clinique (INCa, France), and Région Midi-Pyrénées (France).

## Authorship

Contribution: C.D., M.H.-R., J.B., N.J., and E.D. performed functional experiments; C.D., M.-H.R., E.E., F.M., J.C., and L.L. designed experiments; C.D., M.-H.R., and L.L. analyzed data; A.K. provided PF-2341066 inhibitor; J.S. performed and analyzed CGH arrays experiments; and C.D., G.D., and L.L. wrote the manuscript. All the authors critically reviewed and approved the manuscript.

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

Correspondence: Laurence Lamant, CRCT, Inserm UMR1037, Université Paul Sabatier, 31024 Toulouse, Cedex 3, France; e-mail: [laurence.lamant@inserm.fr](mailto:laurence.lamant@inserm.fr).

## References

- Delsol GFB, Müller-hermelink HK, Campo E, et al. *Anaplastic Large Cell Lymphoma, ALK-Positive*. Lyon, France: IARC Press; 2008.
- Mason DYHN, Delsol G, Stein H, et al. *Anaplastic Large Cell Lymphoma, ALK-Negative*. Lyon: IARC Press; 2008.
- Sarris AH, Luthra R, Papadimitracopoulou V, et al. Amplification of genomic DNA demonstrates the presence of the t(2;5) (p23;q35) in anaplastic large cell lymphoma, but not in other non-Hodgkin's lymphomas, Hodgkin's disease, or lymphomatoid papulosis. *Blood*. 1996;88(5):1771-1779.
- Shiota M, Nakamura S, Ichinohasama R, et al. Anaplastic large cell lymphomas expressing the novel chimeric protein p80NPM/ALK: a distinct clinicopathologic entity. *Blood*. 1995;86(5):1954-1960.
- Chiarle R, Voena C, Ambrogio C, Piva R, Inghirami G. The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(1):11-23.
- Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci*. 2001; 26(1):61-66.
- Craig RW. MCL1 provides a window on the role of the BCL2 family in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis. *Leukemia*. 2002;16(4):444-454.
- Zhou P, Qian L, Kozopas KM, Craig RW. Mcl-1, a Bcl-2 family member, delays the death of hematopoietic cells under a variety of apoptosis-inducing conditions. *Blood*. 1997;89(2):630-643.
- Schlaifer D, Krajewski S, Galoin S, et al. Immunodetection of apoptosis-regulating proteins in lymphomas from patients with and without human immunodeficiency virus infection. *Am J Pathol*. 1996;149(1):177-185.
- Rassidakis GZ, Lai R, McDonnell TJ, Cabanillas F, Sarris AH, Medeiros LJ. Overexpression of Mcl-1 in anaplastic large cell lymphoma cell lines and tumors. *Am J Pathol*. 2002;160(6):2309-2310.
- Rust R, Harms G, Blokzijl T, et al. High expression of Mcl-1 in ALK positive and negative anaplastic large cell lymphoma. *J Clin Pathol*. 2005; 58(5):520-524.
- Akgul C. Mcl-1 is a potential therapeutic target in multiple types of cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2009; 66(8):1326-1336.
- Michels J, Johnson PW, Packham G. Mcl-1. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37(2):267-271.
- Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, Parker R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev*. 2006;20(5):515-524.
- Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*. 2008;9(2):102-114.
- Kluiver J, Kroesen BJ, Poppema S, van den Berg A. The role of microRNAs in normal hematopoiesis and hematopoietic malignancies. *Leukemia*. 2006;20(11): 1931-1936.
- Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005;353(17):1793-1801.
- Garzon R, Heaphy CE, Havelange V, et al. MicroRNA 29b functions in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2009;114(26):5331-5341.
- Zhao JJ, Lin J, Lwin T, et al. microRNA expression profile and identification of miR-29 as a prognostic marker and pathogenetic factor by targeting CDK6 in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2010; 115(13):2630-2639.
- Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*. 2006;9(3):189-198.



21. Xiong Y, Fang JH, Yun JP, et al. Effects of miRNA-29 on apoptosis, tumorigenicity, and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2010;51(3):836-845.
22. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*. 2005;65(16):7065-7070.
23. Mott JL, Kobayashi S, Bronk SF, Gores GJ. miR-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene*. 2007;26(42):6133-6140.
24. Merkel O, Hamacher F, Laimer D, et al. Identification of differential and functionally active miRNAs in both anaplastic lymphoma kinase (ALK)<sup>+</sup> and ALK<sup>-</sup> anaplastic large-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(37):16228-16233.
25. Giuriato S, Faumont N, Bousquet E, et al. Development of a conditional bioluminescent transplant model for TPM3-ALK-induced tumorigenesis as a tool to validate ALK-dependent cancer targeted therapy. *Cancer Biol Ther*. 2007;6(8):1318-1323.
26. Giuriato S, Foisseau M, Dejean E, et al. Conditional TPM3-ALK and NPM-ALK transgenic mice develop reversible ALK<sup>+</sup> early B-cell lymphoma/leukemia. *Blood*. 2010;115(20):4061-4070.
27. Fischer P, Nacheva E, Mason DY, et al. A Ki-1 (CD30)-positive human cell line (Karpas 299) established from a high-grade non-Hodgkin's lymphoma, showing a 2;5 translocation and rearrangement of the T-cell receptor beta-chain gene. *Blood*. 1988;72(1):234-240.
28. Epstein AL, Kaplan HS. Biology of the human malignant lymphomas. I. Establishment in continuous cell culture and heterotransplantation of diffuse histiocytic lymphomas. *Cancer*. 1974;34(6):1851-1872.
29. Lamant L, Espinos E, Duplantier M, et al. Establishment of a novel anaplastic large-cell lymphoma-cell line (COST) from a 'small-cell variant' of ALCL. *Leukemia*. 2004;18(10):1693-1698.
30. del Mistro A, Leszl A, Bertorelle R, et al. A CD30-positive T cell line established from an aggressive anaplastic large cell lymphoma, originally diagnosed as Hodgkin's disease. *Leukemia*. 1994;8(7):1214-1219.
31. Christensen JG, Zou HY, Arango ME, et al. Cyto-reductive antitumor activity of PF-2341066, a novel inhibitor of anaplastic lymphoma kinase and c-Met, in experimental models of anaplastic large-cell lymphoma. *Mol Cancer Ther*. 2007;6(12 pt 1):3314-3322.
32. Saito Y, Jones PA. Epigenetic activation of tumor suppressor microRNAs in human cancer cells. *Cell Cycle*. 2006;5(19):2220-2222.
33. Saito Y, Suzuki H, Tsugawa H, et al. Chromatin remodeling at Alu repeats by epigenetic treatment activates silenced microRNA-512-5p with down-regulation of Mcl-1 in human gastric cancer cells. *Oncogene*. 2009;28(30):2738-2744.
34. Agirre X, Vilas-Zornoza A, Jimenez-Velasco A, et al. Epigenetic silencing of the tumor suppressor microRNA Hsa-miR-124a regulates CDK6 expression and confers a poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*. 2009;69(10):4443-4453.
35. Bandres E, Agirre X, Bitarte N, et al. Epigenetic regulation of microRNA expression in colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2009;125(11):2737-2743.
36. Michels J, O'Neill JW, Dallman CL, et al. Mcl-1 is required for Akata6 B-lymphoma cell survival and is converted to a cell death molecule by efficient caspase-mediated cleavage. *Oncogene*. 2004;23(28):4818-4827.
37. Amin HM, McDonnell TJ, Ma Y, et al. Selective inhibition of STAT3 induces apoptosis and G(1) cell cycle arrest in ALK<sup>+</sup> anaplastic large cell lymphoma. *Oncogene*. 2004;23(32):5426-5434.
38. Vega F, Medeiros LJ, Leventaki V, 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*. 2006;66(13):6589-6597.
39. Wei LH, Kuo ML, Chen CA, et al. The antiapoptotic role of interleukin-6 in human cervical cancer is mediated by upregulation of Mcl-1 through a PI 3-K/Akt pathway. *Oncogene*. 2001;20(41):5799-5809.
40. Hwang HW, Wentzel EA, Mendell JT. A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import. *Science*. 2007;315(5808):97-100.
41. Calin GA, Croce CM. Chronic lymphocytic leukemia: interplay between noncoding RNAs and protein-coding genes. *Blood*. 2009;114(23):4761-4770.
42. Valeri N, Vannini I, Fanini F, Calore F, Adair B, Fabbri M. Epigenetics, miRNAs, and human cancer: a new chapter in human gene regulation. *Mamm Genome*. 2009;20(9-10):573-580.
43. Ambrogio C, Martinengo C, Voena C, et al. NPM-ALK oncogenic tyrosine kinase controls T-cell identity by transcriptional regulation and epigenetic silencing in lymphoma cells. *Cancer Res*. 2009;69(22):8611-8619.
44. Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(40):15805-15810.

### **Gene-expression profiling**

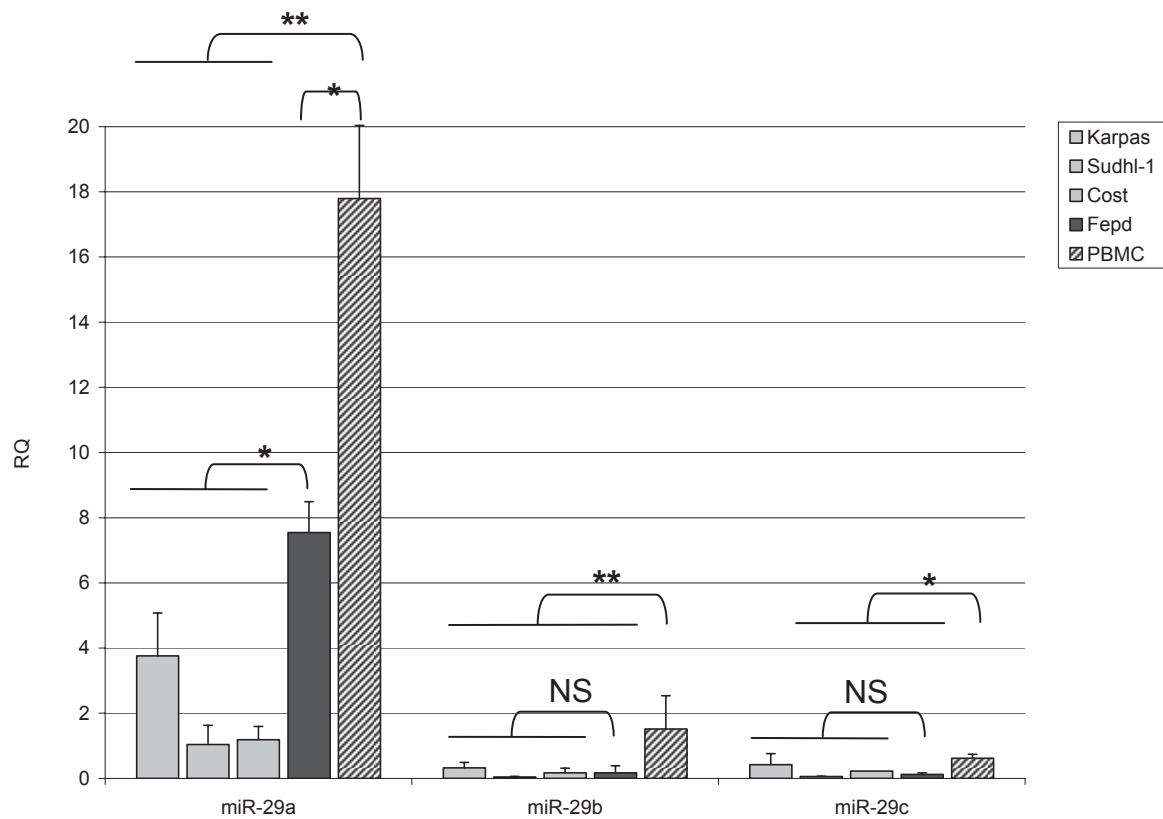
Two hundred nanogram of total RNA from *miR-29a*- or *miR* control-transfected ALK+ ALCL cell lines (Karpas-299, SUDHL-1 and Cost) were used to hybridize on a GeneChip Human Gene 1.0ST Array (Affymetrix). Microarray data were analyzed with Affymetrix Expression Console software (version 1.1) using RAM algorithm. Normalized log<sub>2</sub> values were used to determine the genes negatively correlated with *miR-29a* expression, with a fold change cut-off of 0.6. To select genes predicted as *miR-29a* targets, we used 5 different softwares (miRanda, miRDB, miRWalk, RNA22 and Targetscan). To assess whether certain biological terms were enriched, we used the Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) functional annotation tool, with high classification stringency setting.

### **Transcriptional effect of *miR-29a* in ALCL**

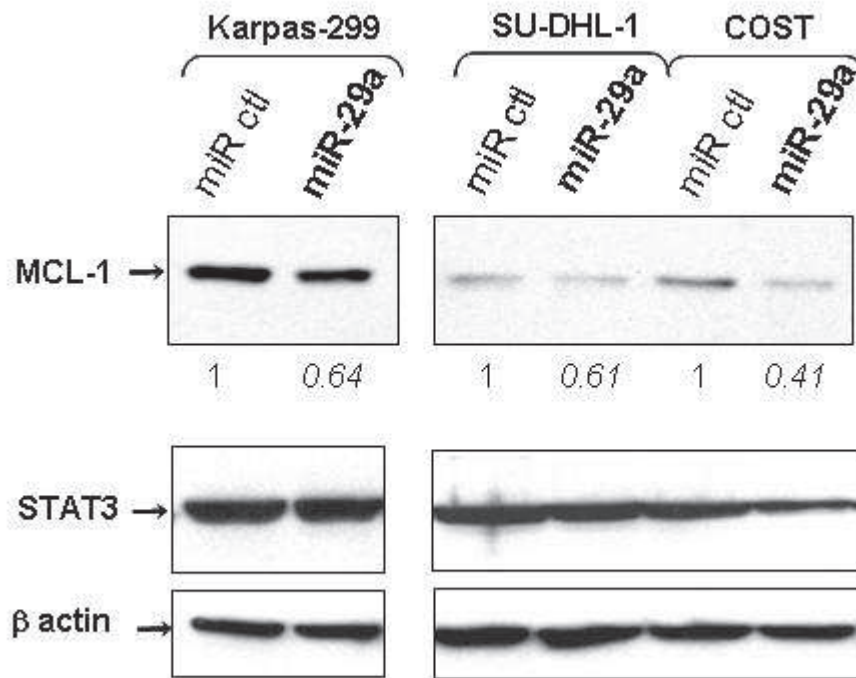
The gene array study after *miR-29a* and *miR* control transfections in three ALK+ ALCL cell lines identified a subset of down-regulated mRNA in *miR-29a* transfected cells with respect to the control with a fold change cut-off of 0.6: 508 genes, 118 non-coding RNA, 59 pseudogenes and 78 non-identified RNA. Among the genes negatively correlated with *miR-29a* expression, we found 65 genes predicted to be *miR-29a* targets. Twelve clusters were found to be enriched for GO terms, for example Cell cycle, Protein transport, Regulation of kinase activity, Cytoskeleton, DNA repair and Transcription regulation (Supplemental Table 1). However, no enrichment in Apoptosis terms was found.

**Table S1. Most significant Gene Ontology (GO) categories of genes that are inversely correlated with miR-29a expression in ALK+ ALCL and predicted to be miR-29a targets.**

Annotation Cluster	Enrichment Score	Count	P-value	Benjamini
Annotation Cluster 1	Enrichment Score: 1.74			
Transition metal ion binding		19	6.3E-3	6.4E-1
Metal ion binding		23	2.3E-2	8.4E-1
Cation binding		23	2.5E-2	7.5E-1
Ion binding		23	3.0E-2	7.1E-1
Annotation Cluster 2	Enrichment Score: 0.76			
Cell division		5	2.3E-2	1.0E0
Mitotic cell cycle		4	1.6E-1	1.0E0
Nuclear division		3	2.0E-1	1.0E0
Mitosis		3	2.0E-1	1.0E0
Cell cycle phase		4	2.0E-1	9.9E-1
M phase of mitotic cell cycle		3	2.0E-1	9.9E-1
Organelle fission		3	2.1E-1	9.9E-1
M phase		3	3.4E-1	9.9E-1
Cell cycle process		4	3.5E-1	9.9E-1
Annotation Cluster 3	Enrichment Score: 0.68			
Intracellular protein transport		4	1.6E-1	9.9E-1
Cellular protein localization		4	1.9E-1	1.0E0
Cellular macromolecule localization		4	2.0E-1	9.9E-1
Protein transport		5	3.1E-1	9.9E-1
Annotation Cluster 4	Enrichment Score: 0.66			
Insoluble fraction		6	1.4E-1	9.5E-1
Membrane fraction		5	2.7E-1	9.2E-1
Cell fraction		6	2.8E-1	8.9E-1
Annotation Cluster 5	Enrichment Score: 0.61			
Regulation of protein kinase activity		4	1.3E-1	1.0E0
Regulation of kinase activity		4	1.4E-1	1.0E0
Regulation of transferase activity		4	1.6E-1	1.0E0
Positive regulation of protein kinase activity		6	2.0E-1	9.9E-1
Positive regulation of protein transferase activity		3	2.2E-1	9.9E-1
Regulation of phosphorylation		4	2.5E-1	9.9E-1
Regulation of phosphate metabolic process		8	2.7E-1	9.9E-1
Positive regulation of catalytic activity		3	5.8E-1	1.0E0
Positive regulation of molecular function		3	6.4E-1	1.0E0
Annotation Cluster 6	Enrichment Score: 0.47			
Protein serine/threonine kinase activity		4	2.0E-1	9.8E-1
Protein amino acid phosphorylation		5	2.3E-1	9.9E-1
Phosphorylation		5	3.4E-1	9.9E-1
Protein kinase activity		4	3.8E-1	9.9E-1
Phosphate metabolic process		5	4.9E-1	1.0E0
Annotation Cluster 7	Enrichment Score: 0.45			
Centrosome		3	1.7E-1	9.0E-1
Microtubule organizing center		3	2.0E-1	9.0E-1
Microtubule cytoskeleton		3	5.4E-1	9.8E-1
Cytoskeletal part		3	8.3E-1	1.0E0
Annotation Cluster 8	Enrichment Score: 0.42			
DNA repair		3	2.8E-1	9.9E-1
DNA metabolic process		4	2.9E-1	9.9E-1
Response to DNA damage stimulus		3	4.0E-1	9.9E-1
Cellular response to stress		3	6.2E-1	1.0E0
Annotation Cluster 9	Enrichment Score: 0.4			
Negative regulation of transcription		7	2.4E-1	9.9E-1
Negative regulation of gene expression		4	2.9E-1	9.9E-1
Negative regulation of nucleic acid metabolic process		4	2.9E-1	9.9E-1
Negative regulation of nitrogen compound metabolic process		4	3.0E-1	9.9E-1
Negative regulation of macromolecule biosynthetic process		8	3.3E-1	9.9E-1
Negative regulation of cellular biosynthetic process		4	3.4E-1	9.9E-1
Negative regulation of RNA metabolic process		3	3.9E-1	9.9E-1
Sequence-specific DNA binding		3	6.5E-1	1.0E0
Transcription factor activity		4	7.0E-1	1.0E0
Regulation of transcription from RNA polymerase II promoter		3	7.6E-1	1.0E0
Annotation Cluster 10	Enrichment Score: 0.39			
ATP binding		8	2.8E-1	9.9E-1
Adenyl ribonucleotide and nucleotide binding		8	3.0E-1	9.9E-1
Purine nucleoside and nucleotide binding		8	3.6E-1	9.9E-1
Ribonucleotide binding		8	5.0E-1	1.0E0
Nucleotide binding		9	5.8E-1	1.0E0
Annotation Cluster 11	Enrichment Score: 0.26			
Nuclear Lumen		6	5.3E-1	9.8E-1
Intracellular organelle lumen		7	5.4E-1	9.8E-1
Membrane-enclosed lumen		7	5.6E-1	9.8E-1
Annotation Cluster 12	Enrichment Score: 0.17			
Transcription regulator activity		7	4.7E-1	1.0E0
Regulation of transcription, DNA-dependent		6	8.0E-1	1.0E0
Regulation of RNA metabolic process		6	8.2E-1	1.0E0



**Figure S1. *MiR-29* family members expression in ALCL.** Histograms show the relative expression (RQ) of *miR-29a*, *miR-29b* and *miR-29c* by RT-qPCR after normalization with *RNU24*, in ALK-positive (Karpas-299, SU-DHL-1, COST) and ALK-negative ALCL cells (FE-PD). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) serve as normal controls. Bars represent standard deviations (SD). P-values (\* P<0.05, \*\* P<0.01) and NS: not significant.



**Figure S2. STAT3 is not affected by *miR-29a* overexpression.** MCL-1 and STAT3 proteins were detected by Western blotting in NPM-ALK positive cell lines 72h after miR-29a or miR control (miR ctrl) transfection.  $\beta$  actin was used as a loading control.



# **DISCUSSION GENERALE**



On a cru pendant de longues années que l'origine des cancers résidait dans la mutation de seulement quelques gènes (dont *p53*, *RB*, *c-myc*, *Bcl-2*, *MCL-1*) désignés à l'époque : "Master Gènes"(450). Cependant, le développement récent des techniques d'analyse de l'expression génique à grande échelle, comme par exemple les puces à ADN, a permis de mettre en évidence de bien plus larges modifications dans les profils d'expression géniques des cellules tumorales. Ces modifications n'ont été associées jusqu'alors, et à tort, qu'à des défauts de transcription. Or la quantité d'ARNm présente dans les cellules à un instant *t* (donnée générée par les puces à ADN) résulte d'un équilibre entre le niveau de transcription d'un gène (reflet de l'activité du promoteur) et la vitesse de dégradation des ARNm synthétisés (demi-vie intrinsèque des ARNm). Cette seconde composante de l'équilibre, à savoir le contrôle post-transcriptionnel de l'expression génique, a longtemps été délaissé: il fait maintenant l'objet de très nombreuses études qui en révèlent sa complexité. Un très bon exemple est donné par le gène *c-myc*, dont la régulation post-transcriptionnelle implique non seulement plusieurs AU-BPs, telles que AUF1 (345), TIAR (451), TTP (452) et HuR (422), mais également des miRNAs tel que *let 7* (422). L'ensemble de ces facteurs "trans" contrôle à la fois la stabilité de l'ARNm et son niveau de traduction, un contrôle qui repose très probablement sur les modifications post-traductionnelles de certaines AU-BPs dont on commence à suspecter l'importance (452).

Grâce à mon travail de thèse, nous avons pu mettre en évidence, dans les LAGC, un nouveau rôle de la tyrosine kinase oncogénique NPM-ALK dans le contrôle de l'expression génique au niveau post-transcriptionnel, en s'appuyant sur l'exemple de l'ARNm *C/EBPβ* et le contrôle de sa stabilité et de son niveau de traduction par l'AU-BP HuR. Parallèlement à ce projet qui a été au centre de ma thèse, j'ai également participé à un travail de l'équipe qui a permis de mettre en évidence l'implication de la tyrosine kinase NPM-ALK dans le contrôle de l'expression d'un miRNA, par méthylation de son promoteur. Ce travail s'est basé sur l'exemple du contrôle de l'expression de la protéine anti-apoptotique Mcl1 par le *miR-29a*.

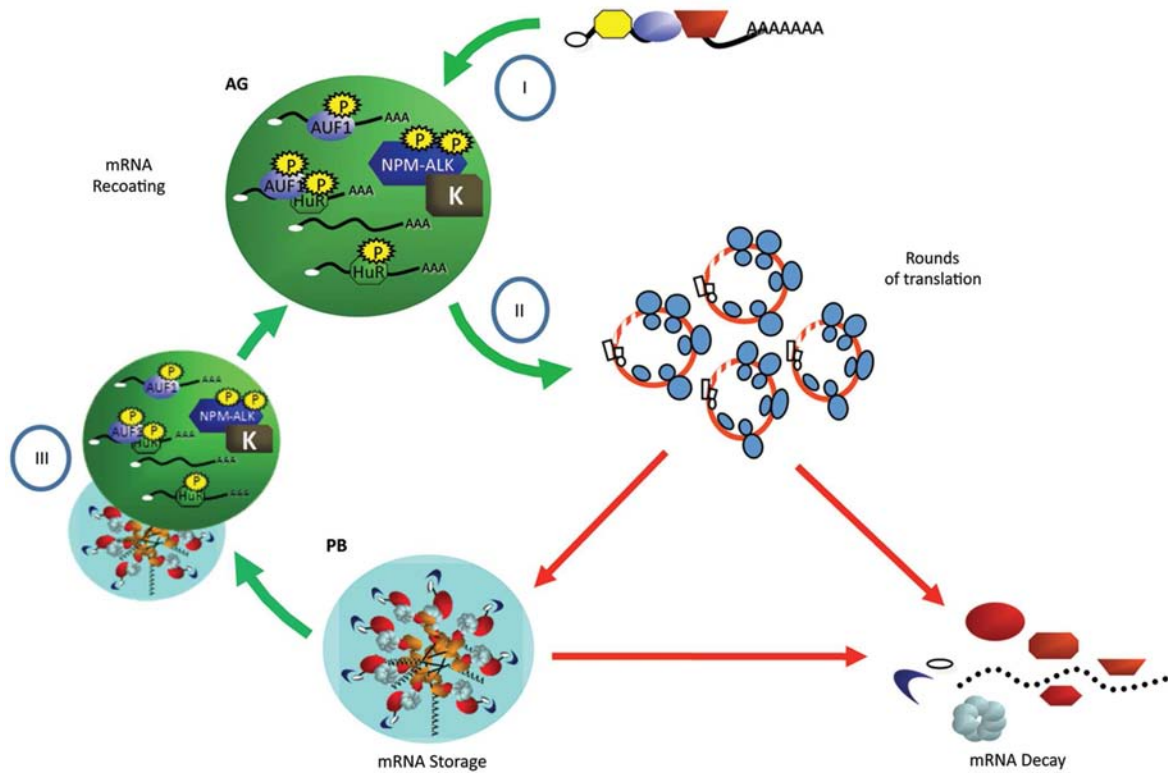
Aussi, ces différents travaux sont à l'origine d'une part, de la découverte de deux nouveaux acteurs de la lymphomagenèse dépendante de ALK dans les LAGC, l'AU-BP HuR et les miRNAs. Ils valident d'autre part le rôle original de NPM-ALK dans la régulation de l'expression génique au niveau post-transcriptionnel notamment via la phosphorylation inédite de l'AU-BP HuR sur résidu tyrosine.



### ***Le devenir des ARNm-ARE dans les LAGC ALK<sup>+</sup>: entre les mains des AU-BPs et des miRNAs.***

Les mécanismes de régulation de l'expression génique au niveau post-transcriptionnel (contrôle de la stabilité et de l'efficacité de traduction) induits par la tyrosine kinase NPM-ALK via la phosphorylation de HuR, ne sont certainement pas restreints aux seuls ARNm que nous avons étudiés (*C/EBPβ*, *VEGF* et *actine*). On sait aujourd'hui qu'environ 16% des gènes possèdent des séquences ARE constituées du pentamère -WWWAUUUAWWW- (284). Ainsi, de nombreux autres ARNm-ARE pourraient donc voir leur expression modulée dans les LAGC ALK<sup>+</sup> suite à la fixation de HuR ou d'une autre AU-BP. En effet, nous avons identifié dans nos données transcriptomiques (63), parmi les ARNm dont les taux varient entre LAGC ALK<sup>+</sup> et LAGC ALK<sup>-</sup> (303 ARNm), 193 ARNm possédant au moins une fois le pentamère -WWWAUUUAWWW- (listés Annexe 1 et 2). Alors que la fixation de HuR sur certains de ces ARNm a pu être validée par des expériences d'immunoprécipitation des complexes HuR/mRNA (*C/EBPβ*, *VEGF*, et *TCF4* (Annexe 3), elle n'a pas pu être retrouvée pour la totalité des ARNm (les ARNm *PTPN12* et *BCL6*, par exemple, ne sont pas retrouvés dans les fractions immunoprécipitées (Annexe 3). Ces résultats ne sont pas étonnants : ils démontrent simplement que la séquence -WWWAUUUAWWW- n'est pas une séquence de reconnaissance restreinte à l'AU-BP HuR, mais qu'elle peut être également reconnue par d'autres AU-BP. On sait par exemple, qu'AUF1, qui reconnaît cette même séquence, est également impliquée dans le contrôle de la ½ vie des ARNm-ARE dans les LAGC ALK<sup>+</sup> (76). Ces résultats suggèrent sans doute également que la liaison des AU-BPs sur les motifs ARE ne dépend pas uniquement de la séquence consensus -WWWAUUUAWWW- mais prend très certainement en compte la structure secondaire des ARNm (284). Suite à ces observations, il serait pertinent d'identifier, par des expériences d'immunoprécipitation des complexes mRNP (RNP-IP) suivies d'une hybridation sur puces à ADN, l'ensemble des ARNm cibles de HuR (et d'autres AU-BPs) dans les LAGC ALK<sup>+</sup> afin d'en établir la liste exhaustive et de découvrir de nouvelles cibles importantes dans la pathogénie des LAGC.

Nous avons montré, en collaboration avec l'équipe de Dominique Morello, que les deux AU-BP, HuR et AUF1, co-localisent au sein de granules cytoplasmiques, les granules ALK, constituées de la forme active de NPM-ALK (76, 428). Ces granules contiennent également des protéines PABP et des ARNm polyadénylés suggérant que les ARNm présents dans ces structures ne sont pas engagés dans un processus de dégradation mais sont stables et compétents pour la traduction (453).



#### Figure 44: Cycle des ARNm dans les LAGC ALK+

Au lieu d'être dégradés dans le cytoplasme, certains ARNm, associés à leurs protéines de liaison, sont capturés sélectivement par les granules ALK (I). Grâce à NPM-ALK ou ses kinases associées (K), les mRNPs sont modulés et dirigés vers les polysomes ou les ARNm sont traduits (II). Après traduction, ces ARNm sont, soit dégradés dans le cytoplasme, soit "emprisonnés" par les P-Bodies où ils peuvent repartir dans les granules ALK suite à des contacts avec les granules ALK (III) et repartir dans le cycle proposé (454).

Cependant, les protéines d'initiation de la traduction telles que eIF2 et eIF3, les AU-BPs TIA-1/TIAR ainsi que les sous-unités ribosomales sont absentes de ces granules. Ces entités sont donc différentes des granules de stress et des P-Bodies et constitueraient, une sorte de "garderie" pour ARNm (453).

Alors qu'il est clair que les granules ALK récupèrent la majorité de leurs ARNm dans le cytoplasme, l'équipe de D. Morello propose un modèle selon lequel ces granules pourraient également interagir avec les P-bodies et échanger ainsi leur matériel, en réponse à un stress cellulaire (453) (Figure 44). Au sein d'une cellule, on sait effectivement que les ARNm, et leurs protéines de liaison associées (complexes mRNP), sont localisés dans différentes structures cytoplasmiques pour être, soit stockés (cas des granules de stress), soit dégradés (cas des exosomes ou des *P bodies*). En fonction du stimulus cellulaire, ces granules peuvent échanger du matériel ou bien libérer les complexes mRNPs qui seront alors activement traduits dans les polysomes (paragraphe III.A.3) (203). Les granules ALK fonctionneraient de la même manière en permettant l'export des ARNm aux polysomes pour y être traduits (Figure 44). En effet, la majorité des ARNm présents dans ces granules ALK sont retrouvés dans les fractions polysomales (453).

De manière intéressante, les granules ALK ne présentent pas d'enrichissement en ARNm-ARE présentant le motif -WUAUUUAUW- mais plutôt le motif restreint -WWUAUUUAUW- ou des motifs riches en uridines (URM) reconnus notamment par HuR (454). Dans notre première étude, nous avons établi que HuR favorisait la stabilisation et le recrutement de certains de ses ARNm cibles au niveau des polysomes pour induire leur traduction (428). On peut donc imaginer que HuR pourrait amener ses ARNm cibles dans les granules ALK de manière à les stabiliser et à favoriser ensuite leur acheminement aux polysomes. Pour tester cette hypothèse, et étant donné qu'aujourd'hui il est possible de purifier ces granules, il serait intéressant d'identifier dans un premier temps les ARNm cibles de HuR dans ces granules et de les comparer à ceux présents dans les polysomes.

Outre la collaboration qui pourrait exister entre les AU-BPs dans les LAGC ALK<sup>+</sup>, nous savons aujourd'hui qu'il existe des mécanismes de compétition et de collaboration entre AU-BPs et miRNAs (paragraphe III.F) (421). Seules quelques études rapportent l'implication des miRNAs dans la tumorigenèse des LAGC. Ce n'est que très récemment qu'une étude a rapporté le profil d'expression des miRNAs dans les LAGC (455). Parmi 636 miRNAs humains et 425 miRNAs murins testés, cette étude a permis de démontrer que seule l'expression d'une vingtaine de miRNAs était dérégulée dans les LAGC ALK<sup>+</sup> et les LAGC ALK<sup>-</sup> (455).





Etant donné qu'un miRNA peut cibler de nombreux ARNm différents, il est clair que la modulation d'expression de quelques miRNAs va suffire à influencer le niveau d'expression d'un grand nombre de gènes cruciaux dans l'oncogenèse des LAGC. Le travail de l'équipe auquel j'ai participé illustre ce propos puisqu'il montre que la sous-expression du *miR-29a*, qui régule l'expression du gène *Mcl1*, est à l'origine d'une augmentation du niveau de protéines anti-apoptotiques MCL-1 et par conséquent, d'une résistance accrue à l'apoptose dans les LAGC ALK<sup>+</sup> (456). Or cet ARNm, qui possède de nombreux motifs -AUUUA- dans sa région 3'NT, est également une cible connue de HuR (379). De manière intéressante, nous avons pu démontrer, par des expériences complémentaires (non publiées), qu'en absence de *miR-29a* dans les LAGC ALK<sup>+</sup>, HuR est capable de se lier à l'ARNm *Mcl-1* (Annexe 4A) et de favoriser sa traduction (Annexe 4B). Une étude similaire, réalisée dans l'équipe, a montré que la diminution du *miR-16* était associée à une augmentation de sécrétion du VEGF par les LAGC ALK<sup>+</sup> (457). Or nous avons montré, dans notre premier article, que l'ARNm *VEGF* est également une cible de HuR, protégée de la dégradation dans ces cellules (428). Ainsi, ces deux résultats démontrent clairement qu'il existe, dans les LAGC ALK<sup>+</sup>, une compétition entre l'AU-BP HuR et des miRNAs. Il serait tout à fait intéressant de poursuivre ces travaux afin de mieux appréhender les mécanismes à l'origine de ces compétitions.

Pour conclure, et de manière à mieux comprendre le fonctionnement des AU-BPs dans les LAGC ALK<sup>+</sup> et d'identifier peut-être de nouveaux mécanismes de collaboration ou de compétition avec les miRNAs, il serait intéressant d'identifier les miRNAs liés aux protéines HuR dans les complexes nucléoprotéiques "ARNm/protéines".

### ***Les modifications post-traductionnelles des AU-BPs induites par NPM-ALK***

Nos données sont originales puisqu'elles montrent, pour la première fois, que HuR est phosphorylée sur résidu tyrosine dans les LAGC ALK<sup>+</sup>. Cette phosphorylation augmente l'affinité de HuR pour ses ARNm cibles, et pourrait modifier sa localisation subcellulaire "fine", mais elle n'est pas à l'origine de sa translocation du noyau vers le cytoplasme. En effet, alors que plusieurs études associent l'export de HuR au cytoplasme ou sa rétention au noyau à des modifications post-traductionnelles sur résidus sérine ou thréonine (360), nous n'avons pas observé de tel changement de "compartimentation" cellulaire de HuR dans des cellules exprimant ou non la tyrosine kinase NPM-ALK. Ce résultat suggère que la phosphorylation sur résidu tyrosine de HuR n'interviendrait pas dans sa sortie du noyau.



Cette remarque est ainsi en accord avec le fait que NPM-ALK n'est retrouvée sous la forme active que dans le cytoplasme et ne pourrait donc pas phosphoryler HuR dans le noyau. Par conséquent, HuR doit certainement subir, dans les LAGC, d'autres types de modifications post-traductionnelles dont des phosphorylations sur résidu sérine et thréonine permettant de se localiser au cytoplasme. Des études protéomiques et phosphoprotéomiques rapportent que certaines sérine/thréonine kinases, dont les PKC $\alpha$  et PKC $\delta$  ainsi que la MAP kinase p38 (458) sont activées en aval de NPM-ALK dans les LAGC. HuR est donc très certainement la cible d'une ou de plusieurs de ces kinases dans le noyau des LAGC ALK<sup>+</sup> et par conséquent se trouverait dans un état hyperphosphorylé. Il est alors possible d'imaginer un scénario selon lequel la première phosphorylation sur résidu sérine ou thréonine, réalisée dans le noyau, induirait une conformation particulière de la protéine et influencerait les phosphorylations suivantes, réalisées dans le cytoplasme, l'accessibilité des kinases aux autres résidus étant modifiée. Les modifications post-traductionnelles sont connues pour être très labiles : la combinaison des résidus phosphorylés pourrait ainsi être modulée selon l'instant et l'endroit où se trouve HuR dans la cellule. Aussi, en fonction de cette combinaison, la protéine HuR pourrait interagir avec divers partenaires protéiques modulant son export au cytoplasme, son recrutement aux polysomes ou au niveau des granules ALK ou encore son affinité vis-à-vis de ses ARNm cibles. Il serait alors intéressant d'identifier le statut de phosphorylation de HuR ainsi que ses partenaires protéiques dans ces différentes structures.

Nous savons aujourd'hui que HuR et NPM-ALK co-localisent dans les granules ALK (428). Cependant, l'endroit dans le cytoplasme où HuR est phosphorylée par NPM-ALK reste un mystère. Deux hypothèses sont envisageables : 1) soit HuR est phosphorylée par NPM-ALK dès sa sortie du noyau puis dirigée ensuite, soit vers les granules ALK où elle permettrait un stockage de ses ARNm cibles, soit directement vers les polysomes dans lesquels elle protégerait ses ARNm cibles de la dégradation et induirait leur traduction, 2) soit HuR se dirige dans les granules ALK directement après sa sortie du noyau et est phosphorylée par NPM-ALK à cet endroit précis de la cellule. Il faut noter que la protéine AUF1, qui comme HuR, est phosphorylée par NPM-ALK, et est présente dans ces granules (76) est aussi concernée par ces deux hypothèses. Il serait alors pertinent de déterminer l'endroit de la cellule (noyau, cytoplasme, polysomes ou granules ALK) où sont localisées les formes phosphorylées sur tyrosine de HuR et AUF1. L'ensemble de ces expériences permettraient de déterminer encore plus précisément l'impact de la phosphorylation sur la localisation et l'effet biologique de ces deux protéines dans les LAGC ALK<sup>+</sup>.



Alors que les phosphorylations de HuR décrites précédemment avaient été identifiées dans des conditions de stress exogènes tels que des traitements UV, des déplétions en nutriments ou en sérum, des conditions d'hypoxie, etc...(360), nous démontrons ici que la phosphorylation de HuR correspond à une réponse de la cellule à un stress endogène qui n'est autre que la tyrosine kinase constitutivement active NPM-ALK. Aujourd'hui, de nombreux types de cancers expriment une protéine de fusion impliquant ALK (41). On sait de plus, que la protéine AUF1 est une cible directe de la tyrosine kinase ALK quel que soit son partenaire de fusion: NPM, TPM3, CLTC ou TFG (76). On peut donc postuler que AUF1 et HuR sont très certainement phosphorylés dans l'ensemble des cancers exprimant une protéine de fusion X-ALK. Par ailleurs, parmi les cinq études de phospho-protéomiques qui ont rapporté une phosphorylation de HuR sur tyrosine, et notamment sur le résidu Tyr 200, deux d'entre elles ont été réalisées à partir d'extraits protéiques issus de lignées humaines de leucémies myéloïdes chroniques (LMC) et de leucémie myéloïdes aiguës (LAM) exprimant chacune une protéine de fusion issue d'une translocation chromosomique aboutissant à l'expression d'une tyrosine kinase oncogénique, BCR-ABL (446) et RBM6-CSF1R (448) respectivement. La phosphorylation de HuR sur résidu tyrosine, et par conséquent la modulation de son activité biologique, ne serait donc pas restreinte aux cancers exprimant une protéine de fusion X-ALK mais semblerait être un événement présent dans un plus grand nombre de cancers exprimant d'autres protéines de fusion à activité tyrosine kinase ou des tyrosines kinases mutées constitutivement actives. La génération d'anticorps anti-HuR phospho-tyrosine spécifiques permettrait de prédire une possible modulation de l'activité biologique de HuR dans l'ensemble de ces cancers.

La phosphorylation, sur résidus tyrosine, d'autres AU-BPs dont TTP, TIA-1 et TIAR, a été observée dans des cellules HEK 293 transfectées par la tyrosine kinase NPM-ALK (458). Comme pour HuR, alors que le rôle de ce type de phosphorylation reste à clarifier, l'impact des phosphorylations sur résidus sérine et thréonine est plus documenté. Par exemple, la phosphorylation de TIA1 par la sérine/thréonine kinase FAST (Fas activated serine/threonine kinase) module son activité d'épissage en favorisant notamment le recrutement de la protéine snRNP U1 (459-460). D'autre part, la phosphorylation de TIAR par les MAP Kinases MK2 et p38, suite à un stress genotoxique, diminue l'affinité de TIAR pour son ARNm cible *Gadd45 $\alpha$*  dont la traduction n'est par conséquent plus réprimée (461).



Enfin, la phosphorylation de TTP sur résidu sérine induit une diminution de son effet déstabilisateur notamment via une diminution d'affinité pour ses ARNm (462) associée une modification de ses partenaires protéiques telles que son association à la protéine chaperonne 14.3.3 (462) et sa dissociation de la déadénylase CCR4/Caf1 (463).

Le rôle de ces phosphorylations laisse donc penser que la phosphorylation de ces AU-BPs sur résidus tyrosine pourrait également avoir un impact important dans la modulation de leurs propriétés biologiques et de leur activité. Il serait donc intéressant de voir si ces protéines sont aussi phosphorylées par NPM-ALK dans les LAGC ALK<sup>+</sup> et si elles ont une activité biologique modulée dans ces cellules.

### ***HuR, une nouvelle cible thérapeutique dans les LAGC ALK<sup>+</sup>?***

Nos données montrent que la perte d'expression de la protéine HuR dans les lignées de LAGC ALK<sup>+</sup> s'accompagne d'une diminution importante de la viabilité cellulaire, principalement due à un ralentissement drastique de la vitesse de prolifération (428). La protéine HuR pourrait donc être considérée comme un oncogène clé dans les LAGC ALK<sup>+</sup>. Depuis une dizaine d'années, des preuves expérimentales semblables à celle-ci, qui relie la protéine HuR à la croissance tumorale, s'accumulent (464-465). En conséquence, HuR est de plus en plus considérée comme une potentielle cible thérapeutique. Des molécules chimiques ciblant HuR commencent à voir le jour et certaines ont déjà été testées pour leur capacité à modifier l'affinité et l'activité stabilisatrice de HuR vis-à-vis de ses ARNm cibles (437, 466). Ces composés, qui se lient à la protéine HuR en empêchant sa dimérisation et sa liaison aux ARNm, sembleraient bloquer son export au cytoplasme et induire une diminution de la stabilisation de certains ARNm cibles de HuR (437, 466).

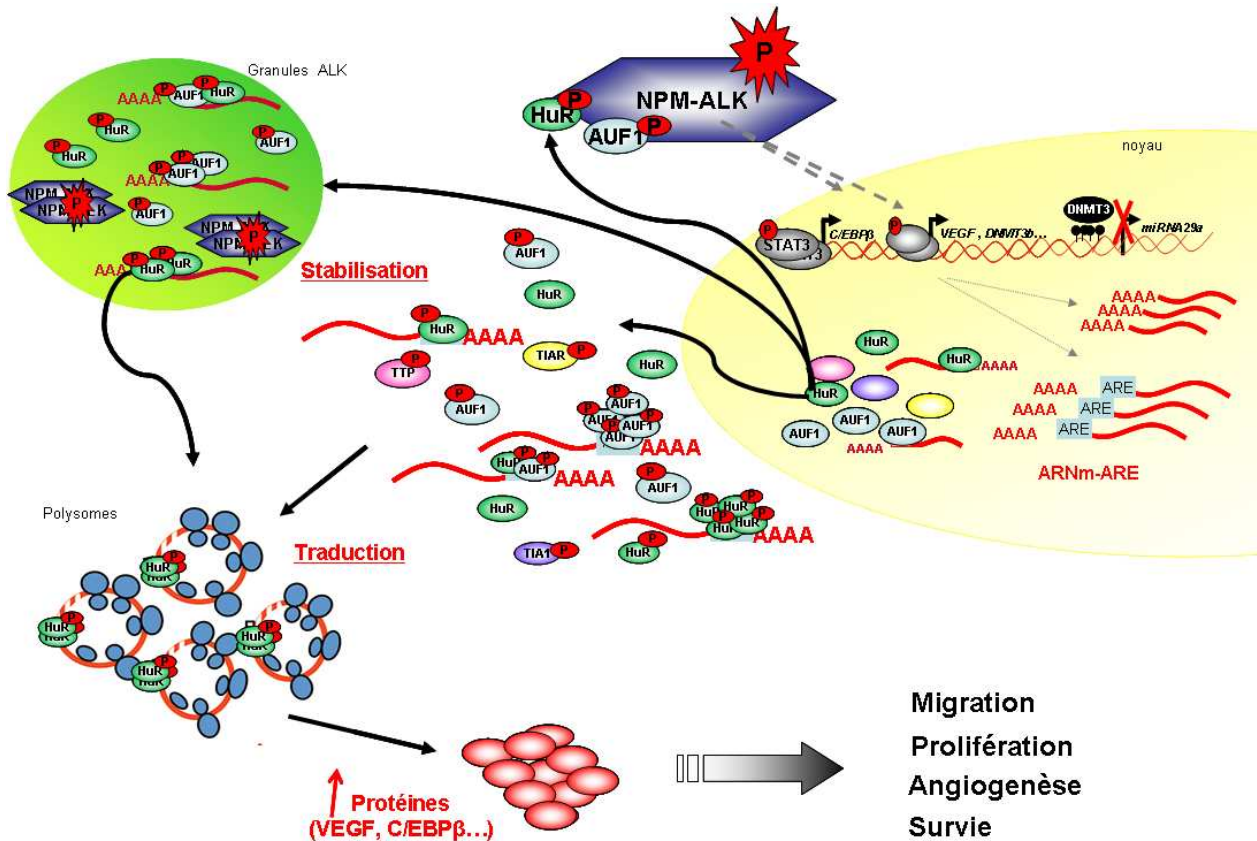
Cette stratégie permettrait donc de diminuer l'expression simultanée d'un ensemble de protéines essentielles au développement, à la maintenance et à la propagation des cancers et semblerait plus efficace que l'utilisation de molécules pharmacologiques qui ciblent généralement une protéine en particulier. Même si certains de ces composés testés *in vivo* ont montré une bonne pharmacocinétique et une faible toxicité pour les organes vitaux (437), la question qui reste en suspend est évidemment l'effet de ces molécules sur les fonctions physiologiques vitales. On sait, en effet, que HuR est une protéine essentielle pour le développement du fœtus notamment pour la mise en place du placenta (380). De plus, la perte de son expression chez les souriceaux HuR<sup>-/-</sup> entraîne leur mort au bout de 10 jours (381).





Cependant, cette perte d'expression de HuR semble affecter majoritairement les tissus présentant une forte prolifération (381). HuR est, en effet, généralement surexprimée durant les périodes actives de prolifération cellulaire durant lesquelles elle joue un rôle majeur dans la survie(370). Contrairement aux cellules en cycle, HuR ne semblerait pas intervenir dans la survie des cellules différenciées et quiescentes dans lesquelles son expression serait diminuée (381). L'utilisation de molécules ciblant HuR dans les thérapies anticancéreuses semblerait donc possible et intéressante puisque ces molécules cibleraient préférentiellement les cellules cancéreuses et induiraient rapidement leur apoptose et *in fine* une diminution du volume tumoral.

Malgré les traitements par chimiothérapie actuels, il existe une proportion non négligeable (30 %) de patients atteints de LAGC ALK<sup>+</sup> qui rechutent ou qui développent des résistances à ces traitements. Ainsi, et afin d'améliorer le pronostic des LAGC ALK<sup>+</sup>, il serait intéressant d'associer, aux traitements par chimiothérapie actuels, des molécules ciblant HuR de manière à inhiber largement la prolifération, la migration cellulaire et à induire l'apoptose des cellules tumorales de LAGC ALK<sup>+</sup>.



**Figure 45: Un nouveau mode de régulation de l'expression génique par la tyrosine kinase NPM-ALK : le contrôle du métabolisme des ARNm.**

Outre son effet sur la transcription, la tyrosine kinase oncogénique NPM-ALK joue un rôle au niveau post-transcriptionnel en modulant l'activité biologique des AU-BPs et en régulant l'expression de miRNAs. En intégrant toutes les données présentées dans ma thèse, nous proposons un modèle selon lequel l'AU-BP HuR, une fois dans le cytoplasme, serait phosphorylée par la tyrosine kinase oncogénique NPM-ALK, soit dans le cytoplasme, soit au sein des granules ALK. Cette phosphorylation, qui augmente son affinité vis-à-vis de ses cibles, lui permettrait d'accroître sa fonction "protectrice". Cette stabilisation des cibles de HuR pourrait s'effectuer à nouveau soit dans le cytoplasme, soit au sein des granules ALK. Les ARNm protégés de la dégradation seraient ensuite acheminés vers les polysomes ce qui permettrait une augmentation de leur niveau de traduction. Quand on connaît la fonction des principales cibles de HuR, dans la prolifération, la survie, la migration et l'angiogenèse, on imagine facilement le poids que pourrait avoir un tel mécanisme dans la tumorigenèse des LAGC ALK+.

Pour conclure, mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence le rôle original de la tyrosine kinase NPM-ALK dans des mécanismes de contrôle de l'expression génique au niveau post-transcriptionnel. Ils sont également à l'origine de la découverte de nouveaux acteurs dans la lymphomagenèse dépendante de ALK : les AU-BP, et plus particulièrement l'AU-BP HuR, et les miRNAs. La mise en évidence d'une phosphorylation sur tyrosine de HuR reste également un point fort de mon travail : cette découverte pourrait déboucher sur la génération de nouveaux outils : des anticorps anti-HuR phospho-tyrosine spécifiques. Enfin, et grâce à l'ensemble de mes résultats, nous pouvons imaginer un modèle selon lequel la tyrosine kinase oncogénique NPM-ALK modulerait l'activité biologique des AU-BPs, dont HuR. Ce phénomène s'accompagnerait d'une stabilisation et d'une augmentation du niveau de traduction des ARNm-ARE. Etant donnée l'implication des protéines codées par ces ARNm-ARE dans les processus d'oncogenèse, il n'est pas difficile de penser que ce mécanisme puisse largement contribuer à l'émergence et au maintien des LAGC ALK<sup>+</sup> (Figure 45).



# ANNEXES



Symbol	Title	p-value	ALK+/ALK-
BCL6	B-cell CLL/lymphoma 6 (zinc finger protein 51)	2,00E-07	UP
PTPN12	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 12	5,00E-07	UP
CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	7,00E-07	UP
FAM3C	family with sequence similarity 3, member C	2,40E-06	UP
ARID5B	AT rich interactive domain 5B (MRF1-like)	2,50E-06	UP
SLC38A2	solute carrier family 38, member 2	4,00E-06	UP
C11orf24	chromosome 11 open reading frame 24	5,40E-06	UP
FNDC3B	fibronectin type III domain containing 3B	8,00E-06	UP
DUSP6	dual specificity phosphatase 6	8,60E-06	UP
RHOH	ras homolog gene family, member H	9,10E-06	UP
LAT2	linker for activation of T cells family, member 2	1,00E-05	UP
SIPA1L3	signal-induced proliferation-associated 1 like 3	1,21E-05	UP
CLIC4	chloride intracellular channel 4	1,34E-05	UP
ACVR1B	activin A receptor, type IB	2,49E-05	UP
IL13RA1	interleukin 13 receptor, alpha 1	3,71E-05	UP
ARHGAP17	Rho GTPase activating protein 17	5,39E-05	UP
OCRL	oculocerebrorenal syndrome of Lowe	5,53E-05	UP
ADAM19	ADAM metallopeptidase domain 19 (meltrin beta)	5,66E-05	UP
BET1	BET1 homolog (S. cerevisiae)	6,00E-05	UP
FOSL1	FOS-like antigen 1	8,55E-04	UP
UGCG	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase	9,75E-05	UP
ABL1	v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1	1,02E-04	UP
LGALS8	lectin, galactoside-binding, soluble, 8 (galectin 8)	1,13E-04	UP
GAS1	growth arrest-specific 1	1,23E-04	UP
CYP1B1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	1,35E-04	UP
MFAP3	Microfibrillar-associated protein 3	1,46E-04	UP
AZ12	5-azacytidine induced 2	5,58E-04	UP
RAB11FIP2	RAB11 family interacting protein 2 (class I)	1,62E-04	UP
PJA2	praja 2, RING-H2 motif containing	1,69E-04	UP
OSBPL8	oxysterol binding protein-like 8	1,77E-04	UP
ATP2B1	ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 1	1,83E-04	UP
TBC1D15	TBC1 domain family, member 15	1,98E-04	UP
FAM65A	family with sequence similarity 65, member A	2,05E-04	UP
AQP9	aquaporin 9	2,21E-04	UP
PLSCR1	phospholipid scramblase 1	6,80E-06	UP
ATRN	attractin	2,36E-04	UP
LTBR	lymphotoxin beta receptor (TNFR superfamily, member 3)	2,36E-04	UP
LAIR1	leukocyte-associated Ig-like receptor 1	2,43E-04	UP
RBMS1	RNA binding motif, single stranded interacting protein 1	2,44E-04	UP
CALU	calumenin	2,79E-04	UP
MX2	myxovirus (influenza virus) resistance 2 (mouse)	2,69E-04	UP
PXN	paxillin	2,99E-04	UP
HS3ST3A1	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 3A1	3,63E-04	UP
ACBD3	acyl-Coenzyme A binding domain containing 3	3,08E-04	UP
KBTBD2	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 2	3,11E-04	UP
TCF4	transcription factor 4	3,23E-04	UP
PIK3CA	phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide	3,23E-04	UP
ZC3H11A	zinc finger CCCH-type containing 11A	3,38E-04	UP
LIMK2	LIM domain kinase 2	3,84E-04	UP
QKI	quaking homolog, KH domain RNA binding (mouse)	4,12E-04	UP
ARHGAP12	Rho GTPase activating protein 12	4,24E-04	UP
MFN1	mitofusin 1	4,32E-04	UP
CDKN2C	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)	4,38E-04	UP
NSF	N-ethylmaleimide-sensitive factor	4,45E-04	UP
GALC	galactosylceramidase (Krabbe disease)	4,56E-04	UP
DCUN1D4	DCN1, defective in cullin neddylation 1, domain containing 4 (S. cerevisiae)	4,63E-04	UP
PPP2CB	protein phosphatase 2 (formerly 2A), catalytic subunit, beta isoform	4,99E-04	UP
KDELR2	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 2	5,30E-04	UP
SYPL1	synaptophysin-like 1	5,33E-04	UP
MGLL	monoglyceride lipase /// monoglyceride lipase	5,43E-04	UP
EMP1	epithelial membrane protein 1	5,41E-04	UP
TEAD3	TEA domain family member 3	5,61E-04	UP
ADARB1	adenosine deaminase, RNA-specific, B1 (RED1 homolog rat)	5,62E-04	UP
JAM3	junctional adhesion molecule 3	5,68E-04	UP
USP33	ubiquitin specific peptidase 33	5,77E-04	UP
SMPDL3A	sphingomyelin phosphodiesterase, acid-like 3A	6,17E-04	UP
CTNNB1	catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa	6,07E-04	UP
VAMP3	vesicle-associated membrane protein 3 (cellubrevin)	6,19E-04	UP
XBP1	X-box binding protein 1	6,18E-04	UP
RAC1	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac)	6,38E-04	UP
AKAP7	A kinase (PRKA) anchor protein 7	6,16E-04	UP
TXNDC5	thioredoxin domain containing 5 /// thioredoxin domain containing 5	7,08E-04	UP
MALL	mal, T-cell differentiation protein-like	7,60E-04	UP
ZNF83	zinc finger protein 83 (HPF1)	7,85E-04	UP
PON2	paraoxonase 2	7,89E-04	UP
NR3C1	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor)	8,22E-04	UP
TFG	TRK-fused gene	8,42E-05	UP
EIF4G3	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 3	8,86E-04	UP
GREM1	gremlin 1, cysteine knot superfamily, homolog (Xenopus laevis)	8,87E-04	UP
TAF7	TAF7 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 55kDa	9,15E-04	UP
STOM	stomatin	9,60E-04	UP
JMJD2B	jumonji domain containing 2B	9,63E-04	UP
TSPAN3	tetraspanin 3	9,79E-04	UP

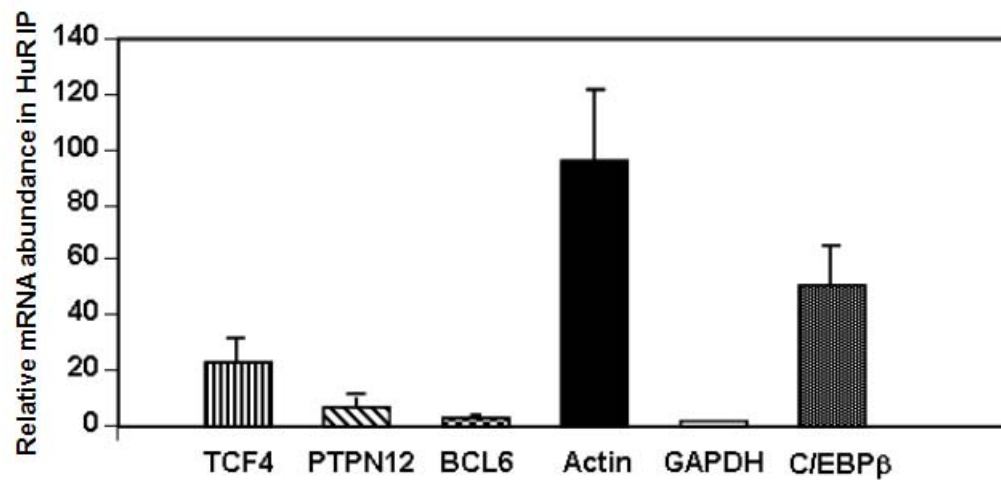
Annexe 1 : Liste des ARNm surexprimés dans les LAGC ALK<sup>+</sup> présentant le motif -WAUUAW-

Symbol	Title	p-value	ALK+/ALK-
NSBP1	nucleosomal binding protein 1	1,00E-07	DOWN
MSC	musculin (activated B-cell factor-1)	1,40E-06	DOWN
ACTR1B	ARP1 actin-related protein 1 homolog B, centractin beta (yeast)	2,10E-06	DOWN
ADCY1	adenylate cyclase 1 (brain)	3,30E-06	DOWN
RAD51L3	RAD51-like 3 ( <i>S. cerevisiae</i> )	4,30E-06	DOWN
COX7A2L	cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 2 like	6,50E-06	DOWN
PRDM13	PR domain containing 13	7,90E-06	DOWN
DAK	dihydroxyacetone kinase 2 homolog (yeast)	8,90E-06	DOWN
TMOD1	tropomodulin 1	8,90E-06	DOWN
ASXL1	additional sex combs like 1 ( <i>Drosophila</i> )	1,04E-05	DOWN
ARHGAP10	Rho GTPase activating protein 10	1,14E-05	DOWN
CCNG1	cyclin G1	1,29E-05	DOWN
MCCC2	methylcrotonoyl-Coenzyme A carboxylase 2 (beta)	1,63E-05	DOWN
SPAG7	sperm associated antigen 7 /// sperm associated antigen 7	1,81E-05	DOWN
HAPLN1	hyaluronan and proteoglycan link protein 1	3,27E-05	DOWN
TMEM14A	transmembrane protein 14A	3,38E-05	DOWN
KHK	ketoheksokinase (fructokinase) /// ketoheksokinase (fructokinase)	4,86E-05	DOWN
IL22	interleukin 22	5,51E-05	DOWN
PRDX6	peroxiredoxin 6	6,79E-05	DOWN
MTMR3	myotubularin related protein 3	7,70E-05	DOWN
HLF	hepatic leukemia factor	8,39E-05	DOWN
C21orf62	chromosome 21 open reading frame 62	8,90E-05	DOWN
TSSC1	tumor suppressing subtransferable candidate 1	8,91E-05	DOWN
KLHL1	kelch-like 1 ( <i>Drosophila</i> )	9,12E-05	DOWN
XK	Kell blood group precursor (McLeod phenotype)	1,03E-04	DOWN
VCL	vinculin	1,09E-04	DOWN
PHOX2B	paired-like homeobox 2b	1,13E-04	DOWN
ITGAM	integrin, alpha M (complement component receptor 3, alpha; also kn	1,25E-04	DOWN
CORO2A	coronin, actin binding protein, 2A	1,30E-04	DOWN
SLCO1B1	solute carrier organic anion transporter family, member 1B1	1,32E-04	DOWN
HADHA	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A	1,36E-04	DOWN
KIF5C	kinesin family member 5C	1,38E-04	DOWN
NAB1	NGFI-A binding protein 1 (EGR1 binding protein 1)	1,46E-04	DOWN
ATP8A1	ATPase, aminophospholipid transporter (APLT), Class I, type 8A, m	1,67E-04	DOWN
EVC	Ellis van Creveld syndrome	2,38E-04	DOWN
IRF4	interferon regulatory factor 4	2,46E-04	DOWN
CAMLG	calcium modulating ligand	2,54E-04	DOWN
PDE4C	phosphodiesterase 4C, cAMP-specific (phosphodiesterase E1 dunt	2,67E-04	DOWN
PCGF1	polycomb group ring finger 1	2,69E-04	DOWN
UBE2G2	ubiquitin-conjugating enzyme E2G 2 (UBC7 homolog, yeast)	2,83E-04	DOWN
YWHAQ /// MIB1	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activatio	2,85E-04	DOWN
CNTFR	ciliary neurotrophic factor receptor	3,10E-04	DOWN
FAM76A	family with sequence similarity 76, member A	3,15E-04	DOWN
GGCX	gamma-glutamyl carboxylase	3,16E-04	DOWN
FGF2	fibroblast growth factor 2 (basic)	3,21E-04	DOWN
PECR	peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase	3,25E-04	DOWN
WDR48	WD repeat domain 48	3,33E-04	DOWN
CCND2	cyclin D2	3,56E-04	DOWN
ADCK2	aarF domain containing kinase 2	3,58E-04	DOWN
EIF2C1	eukaryotic translation initiation factor 2C, 1	4,04E-04	DOWN
CHRNA4	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 4	4,17E-04	DOWN
GPR88	G-protein coupled receptor 88	4,49E-04	DOWN
FGFR2	fibroblast growth factor receptor 2 (bacteria-expressed kinase, ke	4,54E-04	DOWN
KALRN	kalirin, RhoGEF kinase	4,88E-04	DOWN
ELMO1	engulfment and cell motility 1 (ced-12 homolog, <i>C. elegans</i> )	4,98E-04	DOWN
CRHR1	corticotropin releasing hormone receptor 1	5,25E-04	DOWN
FLNB	filamin B, beta (actin binding protein 278)	5,44E-04	DOWN
PPIA /// LOC128	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) /// similar to peptidyl-Pro c	5,68E-04	DOWN
CXCL5	chemokine (C-X-C motif) ligand 5	5,78E-04	DOWN
SMARCA2	SWWSNF related, matrix associated, actin dependent regulator of ch	5,79E-04	DOWN
TFDP3	transcription factor Dp family, member 3	5,97E-04	DOWN
CAMSAP1	calmodulin regulated spectrin-associated protein 1	6,04E-04	DOWN
ALDH1B1	aldehyde dehydrogenase 1 family, member B1	6,15E-04	DOWN
ESRRG	estrogen-related receptor gamma	6,68E-04	DOWN
NF1	neurofibromin 1 (neurofibromatosis, von Recklinghausen disease, v	6,74E-04	DOWN
HOXA10	homeo box A10	6,81E-04	DOWN
BRP44L	brain protein 44-like	7,09E-04	DOWN
MAGEB1	melanoma antigen family B, 1	7,19E-04	DOWN
ATP2B4	ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 4	7,32E-04	DOWN
ACACA	acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha	7,85E-04	DOWN
AP2B1	adaptor-related protein complex 2, beta 1 subunit	7,89E-04	DOWN
MRE11A	MRE11 meiotic recombination 11 homolog A ( <i>S. cerevisiae</i> )	7,98E-04	DOWN
SOD1	superoxide dismutase 1, soluble (amyotrophic lateral sclerosis 1 (a	8,05E-04	DOWN
FBXO41	F-box protein 41	8,16E-04	DOWN
ACP1	acid phosphatase 1, soluble	8,23E-04	DOWN
HOXA11	homeo box A11	8,62E-04	DOWN
LYST	lysosomal trafficking regulator	8,63E-04	DOWN
ADAT1	adenosine deaminase, tRNA-specific 1	8,78E-04	DOWN
ADAM3A	ADAM metallopeptidase domain 3a (cyritestin 1)	8,83E-04	DOWN
PCBP2	Poly(rC) binding protein 2	8,95E-04	DOWN
BCKDHB	branched chain keto acid dehydrogenase E1, beta polypeptide (ma	9,04E-04	DOWN
TTF2	transcription termination factor, RNA polymerase II	9,20E-04	DOWN
RPIA	ribose 5-phosphate isomerase A (ribose 5-phosphate epimerase)	9,51E-04	DOWN

Annexe 2: Liste des ARNm sous exprimés dans les LAGC ALK<sup>+</sup> présentant le motif -WAUUUAW

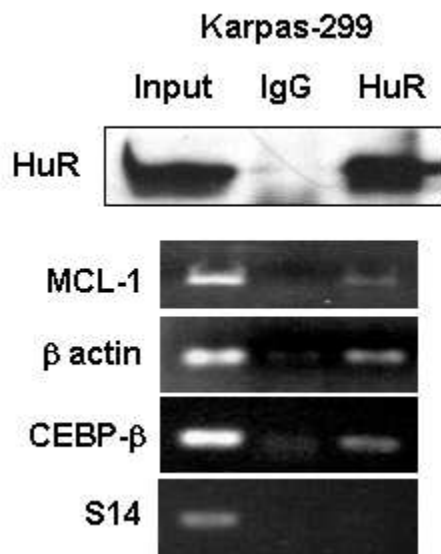


A

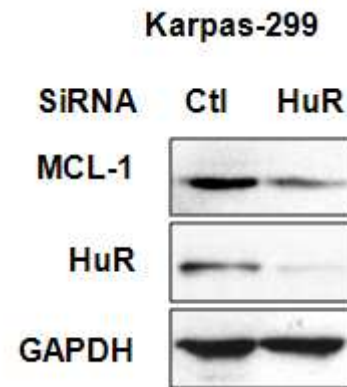
**Annexe 3: Spécificité d'interaction de HuR pour les ARNm-ARE dans les LAGC ALK<sup>+</sup>.**

(A) Les immunoprécipitations des complexes HuR/ARNm (RNP-IP) ont été réalisées à partir de lysats cytoplasmiques de lignées humaines de LAGC ALK<sup>+</sup> (COST) à l'aide d'un anticorps anti-HuR ou d'une IgG contrôle. Les taux d'ARNm *TCF4*, *PTPN12*, *BCL6*, *Actin*, *GAPDH* et *C/EBPβ* ont été déterminés par RT-qPCR. Pour un ARNm donné, l'histogramme représente la quantité d'ARNm liée à l'IP HuR par rapport à celle liée à l'IP IgG. L'ARNm *GAPDH* sert de contrôle négatif, alors que l'ARNm *Actine*, qui est une cible connue de HuR, sert de contrôle positif. Ces données représentent la moyenne  $\pm$  ESM de trois expériences indépendantes.

A



B



**Annexe 4: Implication de HuR dans l'expression de la protéine MCL-1 dans les LAGC ALK<sup>+</sup>.**

(A) Les immunoprécipitations des complexes HuR/ARNm ont été réalisées à partir de lysats cytoplasmiques de lignées humaines de LAGC ALK<sup>+</sup> (COST) à l'aide d'un anticorps anti-HuR ou d'une IgG contrôle. Les taux d'ARNm *MCL-1*,  *$\beta$  Actin*, *S14* et *C/EBP $\beta$*  ont été déterminés par RT-PCR. Les produits ont été visualisés par un marquage au bromure d'éthidium sur gel d'agarose. L'ARNm *S14* sert de contrôle négatif, alors que l'ARNm *Actine*, qui est une cible connue de HuR, sert de contrôle positif (B) Les lignées humaines de LAGC ALK<sup>+</sup> (COST) ont été transfectées transitoirement par un siRNA contrôle (ctl) ou un siRNA dirigé contre l'ARNm *HuR* (HuR). Les taux de protéines MCL-1 dans les cellules contrôles (ctl) et les cellules déplétées en protéines HuR (HuR) sont déterminés par Western Blot 48h après transfection.

## Abréviations

LNH: Lymphome Non Hodgkinien  
 LAGC: Lymphome Anaplasique à Grandes Cellules  
 CD30: protéine membranaire de la famille des récepteurs au TNF (Tumor Necrosis Factor)  
 OMS: Organisation Mondiale de la Santé  
 ALK: Anaplastic Lymphoma Kinase  
 Ply: Papulose Lymphomatoïde Bénigne  
 EMA: Epithelial Membrane Antigen  
 NPM: Nucleophosmin  
 LH: Lymphomes Hodgkiniens  
 CD2: Cluster de Différenciation 2, molécule d'adhésion cellulaire  
 CD5: Cluster de Différenciation 5, glycoprotéine de surface  
 CD7: Cluster de Différenciation 7, protéine membranaire de la famille des immunoglobulines  
 CD43: Cluster de Différenciation 43, sialoglycoprotéine de surface  
 CD45RO: Cluster de Différenciation 45, Récepteur à activité tyrosine phosphatase  
 CD4: Cluster de Différenciation 4, corécepteur du TCR  
 CD8: Cluster de Différenciation 8, corécepteur du TCR  
 TCR: T Cell Receptor  
 CD56: Cluster de Différenciation 56, molécule d'adhésion neuronale  
 TIA-1: T-cell restricted Intracellular Antigen-1  
 NK: Natural Killer  
 LTK: Leucocyte Tyrosine Kinase  
 PTN: Pléiotrophine  
 MK: Midkine  
 ADN: Acide Desoxyribonucléique  
 ARNm: Acide Ribonucléique messenger  
 NLS: Nuclear Localisation Signal  
 CLTCL: Clathrin  
 MSN: Moesin  
 TPM3: Tropomyosin 3  
 IRS-1: Insulin Receptor Substrate1  
 MAPK: Mitogen-activated protein kinase  
 Shc: SH2 domain-containing transforming protein  
 IRS-1: Insulin Receptor Substrate1  
 GRB2: Growth factor Receptor-Bound protein 2  
 PLC $\gamma$ : Phospholipase C gamma  
 S6RP: S6 Ribosomal Protein  
 JNK: Jun Kinase  
 JAK: Janus Kinase  
 STAT: signal transducers and activators of transcription  
 PI3K: Phosphatidylinositol3-Kinase  
 C/EBP $\beta$ : CCAAT/Enhancer Binding Protein  $\beta$   
 CD274: Cluster de Différenciation 274, Programmed cell death 1 ligand 1 (PD-L1)  
 MeCP2: methyl CpG binding protein 2  
 mTOR: mammalian Target of Rapamycin  
 TNFR: Tumor Necrosis Factor Receptor  
 TRAFs: Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor  
 ADNc: Acide désoxyribonucléique complémentaire.  
 BCL6: B-Cell Lymphoma 6

PSF: Polypyrimidine tract-binding protein-associated Splicing Factor  
FUS: FUsed in Sarcoma  
AUF1: A+U-rich element binding Factor 1  
SQSTM1: Sequestosome 1  
FISH: Fluorescent In Situ Hybridization  
RE: Reticulum Endoplasmique  
IMT: Inflammatory Myofibroblastic Tumor  
RANBP2: RAN Binding Protein 2  
CARS: Cysteinyl-tRNA Synthetase  
EML4: Echinoderm Microtubule-associated protein-Like 4  
VCL: Vinculine  
KIF5B; Kinesin Family member 5B  
NSCLC; Non Small Cell Lung Cancer  
PBL: Peripheric Blood Lymphocytes  
CTL: Cytotoxix T Lymphomas  
C/EBP: CCAAT/Enhancer Binding Protein  
RD: Repressor Domain  
AD: Activator Domaine  
CR: Conserved Eegion  
CRE: cAMP Responsive Element  
CREB: CRE-binding protein  
XBP1: X-BOX Binding Protein 1  
LAP: Liver-enriched activator protein  
LIP: Liver-enriched inhibitory protein  
 $\mu$ ORF : micro Open Reading Frame  
CUGBP1: CUG Binding Protein 1  
CRT: Calreticuline  
Ser: serine  
Thr: threonine  
Tyr: tyrosine  
HDAC1; Histone Deacetylase 1  
RBP: RNA Binding Protein  
eiF4: Eukaryotic translation initiation factor 4  
5'NT: 5' non traduite  
3'NT: 3' non traduite  
PABP: poly(A) Binding Protein  
PAN2: poly(A) specific ribonuclease subunit homolog  
DcpS: Scavenger Decapping Enzyme  
DCP1: decapping enzyme homolog B  
PB: P-Bodies  
SG: Stress Granules  
mRNP: messenger ribonucleoprotein particle  
TTP: Tristetraprolin  
TIA1: T-cell intracellular antigen 1  
TIAR: TIA-related protein  
BRF1: Butyrate Response Factor 1  
KSRP: K-homology splicing regulator protein  
NMD: Non-sens Mediated Decay  
PTC: Premature Termination Codon  
EJC: exon junction protein complex

NSD: Non Stop Decay  
NGD: No Go Decay  
IRES: Internal Ribosome Entry Site  
ITAFs: IRES Trans-Acting Factors  
CRD: Coding Region Determinants  
CRD-BP: CRD Binding Protein  
PAIP-1: PABP Interacting Protein1  
CPE: Cytoplasmic Polyadenylation Element  
CPEB: CPE Binding Protein  
DICE: Differentiation Control Element  
hnRNP: Heterogenous Ribonucleic particle  
IRE: Iron Responsive Elements  
TfR: Rransferrine  
IRP: IRE proteins  
GRE: GC Rich-Elements  
EDEN: Embryonic Déadénylation Element  
miRNA: micro interfering Ribonucleic Acid  
pri-miRNA: miRNA primaire  
pré-miRNA: précurseur de miRNA  
RISC: RNA-induced silencing *complex*  
AGO2: Argonaute 2  
siRNA: Small interfering Ribonucleic Acid  
FXR1: Fragile X Retardation Related protein 1  
ELAV like 1: Embryonic Lethal Vision like 1  
ARE: AU- Rich Elements  
AU-BPs: AU-rich Binding Proteins  
AMD: ARE Mediated Decay  
CRM1: Chromosome maintenance 1  
ASTRC: AUF1 and signal transduction regulated complex  
RRM: RNA Recognizing Motif  
HNS: HuR Nucleo-cytoplasmic shuttling sequence  
NES: Nuclear Export Signal  
CARM1: Coactivator-associated arginine méthyltransférases 1  
FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer  
MDR: Multi-Drug Resistance  
MCL-1: myeloid cell leukemia sequence 1  
DNMT3: DNA methyltransferase 3



# **BIBLIOGRAPHIE**





1. Hochberg J, Waxman IM, Kelly KM, Morris E, Cairo MS. Adolescent non-Hodgkin lymphoma and Hodgkin lymphoma: state of the science. *Br J Haematol.* 2009 Jan;144(1):24-40.
2. Stein H, Mason DY, Gerdes J, O' Connor N, Wainscoat J, Pallesen G, et al. The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood.* 1985;66(4):848-58.
3. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood.* 1994 Sep 1;84(5):1361-92.
4. Delsol G, Ralfkiaer E, Stein H, Wright D, Jaffe ES. Anaplastic large cell lymphoma. Primary systemic (T/Null cell type). In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, eds. World Health Organization (WHO) classification of tumours Pathology and Genetics of tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press, 2001:230-5.
5. Willemze R, Jaffe ES, Burg G, Cerroni L, Berti E, Swerdlow SH, et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood.* 2005 May 15;105(10):3768-85.
6. Delsol G, HK M-h, E C, ES J, RD G, H S, et al. Anaplastic large cell lymphoma, ALK positive. WHO. 2008.
7. Delsol G, Ralfkiaer E, Stein H, Wright D, Jaffe ES. Anaplastic large cell lymphoma ALK-. Primary systemic (T/Null cell type). In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al., eds. World Health Organization (WHO) classification of tumours Pathology and Genetics of tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. LYON IARC press, 2008:312-6.
8. Drexler HG, Gignac SM, von Wasielewski R, Werner M, Dirks WG. Pathobiology of NPM-ALK and variant fusion genes in anaplastic large cell lymphoma and other lymphomas. *Leukemia.* 2000 Sep;14(9):1533-59.
9. Falini B, Pileri S, Zinzani PL, Carbone A, Zagonel V, Wolf-Peeters C, et al. ALK+ lymphoma: clinico-pathological findings and outcome. *Blood.* 1999 Apr 15;93(8):2697-706.
10. Gascoyne RD, Aoun P, Wu D, Chhanabhai M, Skinnider BF, Greiner TC, et al. Prognostic significance of anaplastic lymphoma kinase (ALK) protein expression in adults with anaplastic large cell lymphoma. *Blood.* 1999 Jun 1;93(11):3913-21.
11. Piccaluga PP, Gazzola A, Mannu C, Agostinelli C, Bacci F, Sabattini E, et al. Pathobiology of anaplastic large cell lymphoma. *Adv Hematol.* 2010:345053.
12. Falini B. Anaplastic large cell lymphoma: pathological, molecular and clinical features. *Br J Haematol.* 2001 Sep;114(4):741-60.
13. Kadin ME, Carpenter C. Systemic and primary cutaneous anaplastic large cell lymphomas. *Semin Hematol.* 2003 Jul;40(3):244-56.
14. Wellmann A, Thieblemont C, Pittaluga S, Sakai A, Jaffe ES, Siebert P, 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.* 2000 Jul 15;96(2):398-404.
15. Lae ME, Ahmed I, Macon WR. Clusterin is widely expressed in systemic anaplastic large cell lymphoma but fails to differentiate primary from secondary cutaneous anaplastic large cell lymphoma. *Am J Clin Pathol.* 2002 Nov;118(5):773-9.
16. Olsen SH, Ma L, Schnitzer B, Fullen DR. Clusterin expression in cutaneous CD30-positive lymphoproliferative disorders and their histologic simulants. *J Cutan Pathol.* 2009 Mar;36(3):302-7.
17. Gascoyne RD, Lamant L, Martin-Subero JI, Lestou VS, Harris NL, Muller-Hermelink HK, et al. ALK-positive diffuse large B-cell lymphoma is associated with Clathrin-ALK rearrangements: report of 6 cases. *Blood.* 2003 Oct 1;102(7):2568-73.

18. Savage KJ, Harris NL, Vose JM, Ullrich F, Jaffe ES, Connors JM, et al. ALK-anaplastic large-cell lymphoma is clinically and immunophenotypically different from both ALK+ ALCL and peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified: report from the International Peripheral T-Cell Lymphoma Project. *Blood*. 2008 Jun 15;111(12):5496-504.
19. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, et al. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*. 1994 Mar 4;263(5151):1281-4.
20. Shiota M, Fujimoto J, Semba T, Satoh H, Yamamoto T, Mori S. Hyperphosphorylation of a novel 80 kDa protein-tyrosine kinase similar to Ltk in a human Ki-1 lymphoma cell line, AMS3. *Oncogene*. 1994 Jun;9(6):1567-74.
21. Ardini E, Magnaghi P, Orsini P, Galvani A, Menichincheri M. Anaplastic Lymphoma Kinase: role in specific tumours, and development of small molecule inhibitors for cancer therapy. *Cancer Lett*. 2010 Dec 28;299(2):81-94.
22. Iwahara T, Fujimoto J, Wen D, Cupples R, Bucay N, Arakawa T, et al. Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene*. 1997 Jan 30;14(4):439-49.
23. Palmer RH, Vernersson E, Grabbe C, Hallberg B. Anaplastic lymphoma kinase: signalling in development and disease. *Biochem J*. 2009 Jun 15;420(3):345-61.
24. Pulford K, Lamant L, Morris SW, Butler LH, Wood KM, Stroud D, et al. Detection of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and nucleolar protein nucleophosmin (NPM)-ALK proteins in normal and neoplastic cells with the monoclonal antibody ALK1. *Blood*. 1997 Feb 15;89(4):1394-404.
25. Vernersson E, Khoo NK, Henriksson ML, Roos G, Palmer RH, Hallberg B. Characterization of the expression of the ALK receptor tyrosine kinase in mice. *Gene Expr Patterns*. 2006 Jun;6(5):448-61.
26. Stoica GE, Kuo A, Aigner A, Sunitha I, Souttou B, Malerczyk C, et al. Identification of anaplastic lymphoma kinase as a receptor for the growth factor pleiotrophin. *J Biol Chem*. 2001 May 18;276(20):16772-9.
27. Stoica GE, Kuo A, Powers C, Bowden ET, Sale EB, Riegel AT, et al. Midkine binds to anaplastic lymphoma kinase (ALK) and acts as a growth factor for different cell types. *J Biol Chem*. 2002 Sep 27;277(39):35990-8.
28. Mourali J, Benard A, Lourenco FC, Monnet C, Greenland C, Moog-Lutz C, et al. Anaplastic lymphoma kinase is a dependence receptor whose proapoptotic functions are activated by caspase cleavage. *Mol Cell Biol*. 2006 Aug;26(16):6209-22.
29. Duyster J, Bai RY, Morris SW. Translocations involving anaplastic lymphoma kinase (ALK). *Oncogene*. 2001 Sep 10;20(40):5623-37.
30. Lindstrom MS. NPM1/B23: A Multifunctional Chaperone in Ribosome Biogenesis and Chromatin Remodeling. *Biochem Res Int*. 2011;2011:195209.
31. Ahn JY, Liu X, Cheng D, Peng J, Chan PK, Wade PA, et al. Nucleophosmin/B23, a nuclear PI(3,4,5)P(3) receptor, mediates the antiapoptotic actions of NGF by inhibiting CAD. *Mol Cell*. 2005 May 13;18(4):435-45.
32. Li J, Zhang X, Sejas DP, Pang Q. Negative regulation of p53 by nucleophosmin antagonizes stress-induced apoptosis in human normal and malignant hematopoietic cells. *Leuk Res*. 2005 Dec;29(12):1415-23.
33. Tarapore P, Shinmura K, Suzuki H, Tokuyama Y, Kim SH, Mayeda A, et al. Thr199 phosphorylation targets nucleophosmin to nuclear speckles and represses pre-mRNA processing. *FEBS Lett*. 2006 Jan 23;580(2):399-409.
34. Palaniswamy V, Moraes KC, Wilusz CJ, Wilusz J. Nucleophosmin is selectively deposited on mRNA during polyadenylation. *Nat Struct Mol Biol*. 2006 May;13(5):429-35.

35. Espinos E, Duplantier MM, Giuriato S, Allouche M, Sabourdy F, Delsol G, et al. Anaplastic lymphoma kinase et lymphomes : aspects physiopathologiques et cliniques. *Hematologie*. 2005;11(4):265-76.
36. Touriol C, Greenland C, Lamant L, Pulford K, Bernard F, Rousset T, et al. Further demonstration of the diversity of chromosomal changes involving 2p23 in ALK-positive lymphoma: 2 cases expressing ALK kinase fused to CLTCL (clathrin chain polypeptide-like). *Blood*. 2000 May 15;95(10):3204-7.
37. Tort F, Pinyol M, Pulford K, Roncador G, Hernandez L, Nayach I, et al. Molecular characterization of a new ALK translocation involving moesin (MSN-ALK) in anaplastic large cell lymphoma. *Lab Invest*. 2001 Mar;81(3):419-26.
38. Armstrong F, Duplantier MM, Trempat P, Hieblot C, Lamant L, Espinos E, et al. Differential effects of X-ALK fusion proteins on proliferation, transformation, and invasion properties of NIH3T3 cells. *Oncogene*. 2004 Aug 12;23(36):6071-82.
39. Armstrong F, Lamant L, Hieblot C, Delsol G, Touriol C. TPM3-ALK expression induces changes in cytoskeleton organisation and confers higher metastatic capacities than other ALK fusion proteins. *Eur J Cancer*. 2007 Mar;43(4):640-6.
40. Fujimoto J, Shiota M, Iwahara T, Seki N, Satoh H, Mori S, et al. Characterization of the transforming activity of p80, a hyperphosphorylated protein in a Ki-1 lymphoma cell line with chromosomal translocation t(2;5). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Apr 30;93(9):4181-6.
41. Barreca A, Lasorsa E, Riera L, Machiorlatti R, Piva R, Ponzoni M, et al. Anaplastic lymphoma kinase in human cancer. *J Mol Endocrinol*. 2011;47(1):R11-R23.
42. Chiarle R, Simmons WJ, Cai H, Dhall G, Zamo A, Raz R, et al. Stat3 is required for ALK-mediated lymphomagenesis and provides a possible therapeutic target. *Nat Med*. 2005 Jun;11(6):623-9.
43. Chiarle R, Voena C, Ambrogio C, Piva R, Inghirami G. The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008 Jan;8(1):11-23.
44. Marzec M, Zhang Q, Goradia A, Raghunath PN, Liu X, Paessler M, et al. Oncogenic kinase NPM/ALK induces through STAT3 expression of immunosuppressive protein CD274 (PD-L1, B7-H1). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Dec 30;105(52):20852-7.
45. Kasprzycka M, Marzec M, Liu X, Zhang Q, Wasik MA. Nucleophosmin/anaplastic lymphoma kinase (NPM/ALK) oncoprotein induces the T regulatory cell phenotype by activating STAT3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jun 27;103(26):9964-9.
46. Nieborowska-Skorska M, Slupianek A, Xue L, Zhang Q, Raghunath PN, Hoser G, et al. Role of signal transducer and activator of transcription 5 in nucleophosmin/ anaplastic lymphoma kinase-mediated malignant transformation of lymphoid cells. *Cancer Res*. 2001 Sep 1;61(17):6517-23.
47. Ruchatz H, Coluccia AM, Stano P, Marchesi E, Gambacorti-Passerini C. Constitutive activation of Jak2 contributes to proliferation and resistance to apoptosis in NPM/ALK-transformed cells. *Exp Hematol*. 2003 Apr;31(4):309-15.
48. Zhang Q, Wang HY, Liu X, Wasik MA. STAT5A is epigenetically silenced by the tyrosine kinase NPM1-ALK and acts as a tumor suppressor by reciprocally inhibiting NPM1-ALK expression. *Nat Med*. 2007 Nov;13(11):1341-8.
49. Bai RY, Ouyang T, Miething C, Morris SW, Peschel C, Duyster J. Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase associated with anaplastic large-cell lymphoma activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt antiapoptotic signaling pathway. *Blood*. 2000 Dec 15;96(13):4319-27.
50. Slupianek A, Nieborowska-Skorska M, Hoser G, Morrione A, Majewski M, Xue L, et al. Role of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in nucleophosmin/anaplastic lymphoma kinase-mediated lymphomagenesis. *Cancer Res*. 2001 Mar 1;61(5):2194-9.

51. Gu TL, Tothova Z, Scheijen B, Griffin JD, Gilliland DG, Sternberg DW. NPM-ALK fusion kinase of anaplastic large-cell lymphoma regulates survival and proliferative signaling through modulation of FOXO3a. *Blood*. 2004 Jun 15;103(12):4622-9.
52. Marzec M, Kasprzycka M, Liu X, El-Salem M, Halasa K, Raghunath PN, et al. Oncogenic tyrosine kinase NPM/ALK induces activation of the rapamycin-sensitive mTOR signaling pathway. *Oncogene*. 2007 Mar 12.
53. Bai RY, Dieter P, Peschel C, Morris SW, 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*. 1998 Dec;18(12):6951-61.
54. Vega F, Medeiros LJ, Leventaki V, Atwell C, Cho-Vega JH, Tian L, 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*. 2006 Jul 1;66(13):6589-97.
55. Leventaki V, Drakos E, Medeiros LJ, Lim MS, Elenitoba-Johnson KS, Claret FX, et al. NPM-ALK oncogenic kinase promotes cell-cycle progression through activation of JNK/cJun signaling in anaplastic large-cell lymphoma. *Blood*. 2007 Sep 1;110(5):1621-30.
56. Cussac D, Greenland C, Roche S, Bai RY, Duyster J, Morris SW, et al. Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase of anaplastic large-cell lymphoma recruits, activates, and uses pp60c-src to mediate its mitogenicity. *Blood*. 2004 Feb 15;103(4):1464-71.
57. Ambrogio C, Voena C, Manazza AD, Martinengo C, Costa C, Kirchhausen T, et al. The anaplastic lymphoma kinase controls cell shape and growth of anaplastic large cell lymphoma through Cdc42 activation. *Cancer Res*. 2008 Nov 1;68(21):8899-907.
58. Wright CW, Rumble JM, Duckett CS. CD30 activates both the canonical and alternative NF-kappaB pathways in anaplastic large cell lymphoma cells. *J Biol Chem*. 2007 Apr 6;282(14):10252-62.
59. Horie R, Watanabe M, Ishida T, Koiwa T, Aizawa S, Itoh K, et al. The NPM-ALK oncoprotein abrogates CD30 signaling and constitutive NF-kappaB activation in anaplastic large cell lymphoma. *Cancer Cell*. 2004 Apr;5(4):353-64.
60. Ohno H, Nishikori M, Maesako Y, Haga H. Reappraisal of BCL3 as a molecular marker of anaplastic large cell lymphoma. *Int J Hematol*. 2005 Dec;82(5):397-405.
61. Piva R, Pellegrino E, Inghirami G. Identification and validation of the anaplastic large cell lymphoma signature. *Adv Exp Med Biol*. 2007;604:129-36.
62. Thompson MA, Stumph J, Henrickson SE, Rosenwald A, Wang Q, Olson S, et al. Differential gene expression in anaplastic lymphoma kinase-positive and anaplastic lymphoma kinase-negative anaplastic large cell lymphomas. *Hum Pathol*. 2005 May;36(5):494-504.
63. Lamant L, de Reynies A, Duplantier MM, Rickman DS, Sabourdy F, Giuriato S, et al. Gene-expression profiling of systemic anaplastic large-cell lymphoma reveals differences based on ALK status and two distinct morphologic ALK+ subtypes. *Blood*. 2007 Mar 1;109(5):2156-64.
64. Piva R, Pellegrino E, Mattioli M, Agnelli L, Lombardi L, Boccalatte F, et al. Functional validation of the anaplastic lymphoma kinase signature identifies CEBPB and BCL2A1 as critical target genes. *J Clin Invest*. 2006 Dec;116(12):3171-82.
65. Piva R, Chiarle R, Manazza AD, Taulli R, Simmons W, Ambrogio C, et al. Ablation of oncogenic ALK is a viable therapeutic approach for anaplastic large-cell lymphomas. *Blood*. 2006 Jan 15;107(2):689-97.

66. Piva R, Agnelli L, Pellegrino E, Todoerti K, Grosso V, Tamagno I, et al. Gene expression profiling uncovers molecular classifiers for the recognition of anaplastic large-cell lymphoma within peripheral T-cell neoplasms. *J Clin Oncol.* 2010 Mar 20;28(9):1583-90.
67. Eckerle S, Brune V, Doring C, Tiacci E, Bohle V, Sundstrom C, et al. Gene expression profiling of isolated tumour cells from anaplastic large cell lymphomas: insights into its cellular origin, pathogenesis and relation to Hodgkin lymphoma. *Leukemia.* 2009 Nov;23(11):2129-38.
68. Bohling SD, Jenson SD, Crockett DK, Schumacher JA, Elenitoba-Johnson KS, Lim MS. Analysis of gene expression profile of TPM3-ALK positive anaplastic large cell lymphoma reveals overlapping and unique patterns with that of NPM-ALK positive anaplastic large cell lymphoma. *Leuk Res.* 2008 Mar;32(3):383-93.
69. Sjostrom C, Seiler C, Crockett DK, Tripp SR, Elenitoba Johnson KS, Lim MS. Global proteome profiling of NPM/ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Exp Hematol.* 2007 Aug;35(8):1240-8.
70. Cussac D, Pichereaux C, Colomba A, Capilla F, Pont F, Gaits-Iacovoni F, et al. Proteomic analysis of anaplastic lymphoma cell lines: identification of potential tumour markers. *Proteomics.* 2006 May;6(10):3210-22.
71. Lim MS, Carlson ML, Crockett DK, Fillmore GC, Abbott DR, Elenitoba-Johnson OF, et al. The proteomic signature of NPM/ALK reveals deregulation of multiple cellular pathways. *Blood.* 2009 Aug 20;114(8):1585-95.
72. Crockett DK, Lin Z, Elenitoba-Johnson KS, Lim MS. Identification of NPM-ALK interacting proteins by tandem mass spectrometry. *Oncogene.* 2004 Apr 8;23(15):2617-29.
73. Ambrogio C, Voena C, Manazza AD, Piva R, Riera L, Barberis L, et al. p130Cas mediates the transforming properties of the anaplastic lymphoma kinase. *Blood.* 2005 Dec 1;106(12):3907-16.
74. Wu F, Wang P, Young LC, Lai R, Li L. Proteome-wide identification of novel binding partners to the oncogenic fusion gene protein, NPM-ALK, using tandem affinity purification and mass spectrometry. *Am J Pathol.* 2009 Feb;174(2):361-70.
75. Galietta A, Gunby RH, Redaelli S, Stano P, Carniti C, Bachi A, et al. NPM/ALK binds and phosphorylates the RNA/DNA binding protein PSF in anaplastic large cell lymphoma. *Blood.* 2007 May 30.
76. Fawal M, Armstrong F, Ollier S, Dupont H, Touriol C, Monsarrat B, et al. A "liaison dangereuse" between AUF1/hnRNPd and the oncogenic tyrosine kinase NPM-ALK. *Blood.* 2006 Oct 15;108(8):2780-8.
77. Pfeifer W, Levi E, Petrogiannis-Haliotis T, Lehmann L, Wang Z, Kadin ME. A murine xenograft model for human CD30+ anaplastic large cell lymphoma. Successful growth inhibition with an anti-CD30 antibody (HeFi-1). *Am J Pathol.* 1999 Oct;155(4):1353-9.
78. Giuriato S, Faumont N, Bousquet E, Foisseau M, Bibonne A, Moreau M, et al. Development of a conditional bioluminescent transplant model for TPM3-ALK-induced tumorigenesis as a tool to validate ALK-dependent cancer targeted therapy. *Cancer Biol Ther.* 2007 Aug;6(8):1318-23.
79. Miething C, Grundler R, Fend F, Hoepfl J, Mugler C, von Schilling C, et al. The oncogenic fusion protein nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase (NPM-ALK) induces two distinct malignant phenotypes in a murine retroviral transplantation model. *Oncogene.* 2003 Jul 24;22(30):4642-7.
80. Miething C, Grundler R, Mugler C, C P, J. D. A new method of retroviral lineage specific expression utilizing the Cre/Lox system induces T-lymphoid malignancy in a mouse model of ALCL. *Blood* 2005(104):248.

81. Turner SD, Alexander DR. What have we learnt from mouse models of NPM-ALK-induced lymphomagenesis? *Leukemia*. 2005 Jul;19(7):1128-34.
82. Chiarle R, Gong JZ, Guasparri I, Pesci A, Cai J, Liu J, et al. NPM-ALK transgenic mice spontaneously develop T-cell lymphomas and plasma cell tumors. *Blood*. 2003 Mar 1;101(5):1919-27.
83. Turner SD, Tooze R, Maclennan K, Alexander DR. Vav-promoter regulated oncogenic fusion protein NPM-ALK in transgenic mice causes B-cell lymphomas with hyperactive Jun kinase. *Oncogene*. 2003 Oct 30;22(49):7750-61.
84. Turner SD, Merz H, Yeung D, Alexander DR. CD2 promoter regulated nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase in transgenic mice causes B lymphoid malignancy. *Anticancer Res*. 2006 Sep-Oct;26(5A):3275-9.
85. Giuriato S, Foisseau M, Dejean E, Felsher DW, Al Saati T, Demur C, et al. Conditional TPM3-ALK and NPM-ALK transgenic mice develop reversible ALK-positive early B-cell lymphoma/leukemia. *Blood*. 2010 May 20;115(20):4061-70.
86. Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Ota Y, Sekiguchi Y, Hatano S, et al. Identification of a novel fusion, SQSTM1-ALK, in ALK-positive large B-cell lymphoma. *Haematologica*. 2011 Mar;96(3):464-7.
87. Van Roosbroeck K, Cools J, Dierickx D, Thomas J, Vandenberghe P, Stul M, et al. ALK-positive large B-cell lymphomas with cryptic SEC31A-ALK and NPM1-ALK fusions. *Haematologica*. 2010 Mar;95(3):509-13.
88. Ma Z, Hill DA, Collins MH, Morris SW, Sumegi J, Zhou M, et al. Fusion of ALK to the Ran-binding protein 2 (RANBP2) gene in inflammatory myofibroblastic tumor. *Genes Chromosomes Cancer*. 2003 May;37(1):98-105.
89. Panagopoulos I, Nilsson T, Domanski HA, Isaksson M, Lindblom P, Mertens F, et al. Fusion of the SEC31L1 and ALK genes in an inflammatory myofibroblastic tumor. *Int J Cancer*. 2006 Mar 1;118(5):1181-6.
90. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 2007 Aug 2;448(7153):561-6.
91. Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, Soda M, Hatano S, Inamura K, et al. KIF5B-ALK, a novel fusion oncokinase identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2009 May 1;15(9):3143-9.
92. Debelenko LV, Raimondi SC, Daw N, Shivakumar BR, Huang D, Nelson M, et al. Renal cell carcinoma with novel VCL-ALK fusion: new representative of ALK-associated tumor spectrum. *Mod Pathol*. 2011 Mar;24(3):430-42.
93. Gunby RH, Tartari CJ, Porchia F, Donella-Deana A, Scapozza L, Gambacorti-Passerini C. An enzyme-linked immunosorbent assay to screen for inhibitors of the oncogenic anaplastic lymphoma kinase. *Haematologica*. 2005 Jul;90(7):988-90.
94. Wan W, Albom MS, Lu L, Quail MR, Becknell NC, Weinberg LR, et al. Anaplastic lymphoma kinase activity is essential for the proliferation and survival of anaplastic large-cell lymphoma cells. *Blood*. 2006 Feb 15;107(4):1617-23.
95. Mesaros EF, Burke JP, Parrish JD, Dugan BJ, Anzalone AV, Angeles TS, et al. Novel 2,3,4,5-tetrahydro-benzo[d]azepine derivatives of 2,4-diaminopyrimidine, selective and orally bioavailable ALK inhibitors with antitumor efficacy in ALCL mouse models. *Bioorg Med Chem Lett*. 2011 Jan 1;21(1):463-6.
96. Galkin AV, Melnick JS, Kim S, Hood TL, Li N, Li L, et al. Identification of NVP-TAE684, a potent, selective, and efficacious inhibitor of NPM-ALK. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jan 2;104(1):270-5.
97. Sabbatini P, Korenchuk S, Rowand JL, Groy A, Liu Q, Leperi D, et al. GSK1838705A inhibits the insulin-like growth factor-1 receptor and anaplastic lymphoma kinase and shows

- antitumor activity in experimental models of human cancers. *Mol Cancer Ther.* 2009 Oct;8(10):2811-20.
98. Merkel O, Hamacher F, Sift E, Kenner L, Greil R. Novel Therapeutic Options in Anaplastic Large Cell Lymphoma: Molecular Targets and Immunological Tools. *Mol Cancer Ther.* 2011 Jul;10(7):1127-36.
99. Turturro F, Arnold MD, Frist AY, Pulford K. Model of inhibition of the NPM-ALK kinase activity by herbimycin A. *Clin Cancer Res.* 2002 Jan;8(1):240-5.
100. 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.* 2002 Mar 1;62(5):1559-66.
101. Boije Af Gennas G, Mologni L, Ahmed S, Rajaratnam M, Marin O, Lindholm N, et al. Design, Synthesis, and Biological Activity of Urea Derivatives as Anaplastic Lymphoma Kinase Inhibitors. *ChemMedChem.* 2011 Jun 30.
102. Rodig SJ, Shapiro GI. Crizotinib, a small-molecule dual inhibitor of the c-Met and ALK receptor tyrosine kinases. *Curr Opin Investig Drugs.* 2010 Dec;11(12):1477-90.
103. Gambacorti-Passerini C, Messa C, Pogliani EM. Crizotinib in anaplastic large-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 2011 Feb 24;364(8):775-6.
104. Katayama R, Khan TM, Benes C, Lifshits E, Ebi H, Rivera VM, et al. Therapeutic strategies to overcome crizotinib resistance in non-small cell lung cancers harboring the fusion oncogene EML4-ALK. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 May 3;108(18):7535-40.
105. Pulford K, Falini B, Banham AH, Codrington D, Robertson H, Hatton C, et al. Immune response to the ALK oncogenic tyrosine kinase in patients with anaplastic large-cell lymphoma. *Blood.* 2000 Aug 15;96(4):1605-7.
106. Ait-Tahar K, Damm-Welk C, Burkhardt B, Zimmermann M, Klapper W, Reiter A, 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.* 2010 Apr 22;115(16):3314-9.
107. Passoni L, Scardino A, Bertazzoli C, Gallo B, Coluccia AM, Lemonnier FA, et al. ALK as a novel lymphoma-associated tumor antigen: identification of 2 HLA-A2.1-restricted CD8+ T-cell epitopes. *Blood.* 2002 Mar 15;99(6):2100-6.
108. Chiarle R, Martinengo C, Mastini C, Ambrogio C, D'Escamard V, Forni G, et al. The anaplastic lymphoma kinase is an effective oncoantigen for lymphoma vaccination. *Nat Med.* 2008 Jun;14(6):676-80.
109. Akira S, Isshiki H, Sugita T, Tanabe O, Kinoshita S, Nishio Y, et al. A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J.* 1990 Jun;9(6):1897-906.
110. Zahn CA. CCAAT/enhancer-binding protein beta: its role in breast cancer and associations with receptor tyrosine kinases. *Expert Rev Mol Med.* 2009;11:e12.
111. Tsukada J, Yoshida Y, Kominato Y, Auron PE. The CCAAT/enhancer (C/EBP) family of basic-leucine zipper (bZIP) transcription factors is a multifaceted highly-regulated system for gene regulation. *Cytokine.* 2011 Apr;54(1):6-19.
112. Kowenz-Leutz E, Twamley G, Ansieau S, Leutz A. Novel mechanism of C/EBP beta (NF-M) transcriptional control: activation through derepression. *Genes Dev.* 1994 Nov 15;8(22):2781-91.
113. Williams SC, Baer M, Dillner AJ, Johnson PF. CRP2 (C/EBP beta) contains a bipartite regulatory domain that controls transcriptional activation, DNA binding and cell specificity. *EMBO J.* 1995 Jul 3;14(13):3170-83.

114. Tahirov TH, Sato K, Ichikawa-Iwata E, Sasaki M, Inoue-Bungo T, Shiina M, et al. Mechanism of c-Myb-C/EBP beta cooperation from separated sites on a promoter. *Cell*. 2002 Jan 11;108(1):57-70.
115. Mink S, Jaswal S, Burk O, Klempnauer KH. The v-Myb oncoprotein activates C/EBPbeta expression by stimulating an autoregulatory loop at the C/EBPbeta promoter. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Oct 28;1447(2-3):175-84.
116. Niehof M, Kubicka S, Zender L, Manns MP, Trautwein C. Autoregulation enables different pathways to control CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBP beta) transcription. *J Mol Biol*. 2001 Jun 15;309(4):855-68.
117. Niehof M, Manns MP, Trautwein C. CREB controls LAP/C/EBP beta transcription. *Mol Cell Biol*. 1997 Jul;17(7):3600-13.
118. Vogel CF, Sciullo E, Park S, Liedtke C, Trautwein C, Matsumura F. Dioxin increases C/EBPbeta transcription by activating cAMP/protein kinase A. *J Biol Chem*. 2004 Mar 5;279(10):8886-94.
119. Berrier A, Siu G, Calame K. Transcription of a minimal promoter from the NF-IL6 gene is regulated by CREB/ATF and SP1 proteins in U937 promonocytic cells. *J Immunol*. 1998 Sep 1;161(5):2267-75.
120. Lin WC, Shen BJ, Tsay YG, Yen HC, Lee SC, Chang CJ. Transcriptional activation of C/EBPbeta gene by c-Jun and ATF2. *DNA Cell Biol*. 2002 Aug;21(8):551-60.
121. Zhang K, Guo W, Yang Y, Wu J. JAK2/STAT3 pathway is involved in the early stage of adipogenesis through regulating C/EBPbeta transcription. *J Cell Biochem*. 2011 Feb;112(2):488-97.
122. Chen C, Dudenhausen EE, Pan YX, Zhong C, Kilberg MS. Human CCAAT/enhancer-binding protein beta gene expression is activated by endoplasmic reticulum stress through an unfolded protein response element downstream of the protein coding sequence. *J Biol Chem*. 2004 Jul 2;279(27):27948-56.
123. Gantt KR, Jain RG, Dudek RW, Pekala PH. HuB localizes to polysomes and alters C/EBP-beta expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Jan 16;313(3):619-22.
124. Gantt K, Cherry J, Tenney R, Karschner V, Pekala PH. An early event in adipogenesis, the nuclear selection of the CCAAT enhancer-binding protein {beta} (C/EBP{beta}) mRNA by HuR and its translocation to the cytosol. *J Biol Chem*. 2005 Jul 1;280(26):24768-74.
125. Cherry J, Jones H, Karschner VA, Pekala PH. Post-transcriptional control of CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBPbeta) expression: formation of a nuclear HuR-C/EBPbeta mRNA complex determines the amount of message reaching the cytosol. *J Biol Chem*. 2008 Nov 7;283(45):30812-20.
126. Goethe R, Basler T, Phi-van L. Regulation of C/EBPbeta mRNA expression and C/EBPbeta promoter activity by protein kinases A and C in a myelomonocytic cell line (HD11). *Inflamm Res*. 2007 Jul;56(7):274-81.
127. He M, Xu Z, Ding T, Kuang DM, Zheng L. MicroRNA-155 regulates inflammatory cytokine production in tumor-associated macrophages via targeting C/EBPbeta. *Cell Mol Immunol*. 2009 Oct;6(5):343-52.
128. Wang B, Majumder S, Nuovo G, Kutay H, Volinia S, Patel T, et al. Role of microRNA-155 at early stages of hepatocarcinogenesis induced by choline-deficient and amino acid-defined diet in C57BL/6 mice. *Hepatology*. 2009 Oct;50(4):1152-61.
129. Sun W, Shen W, Yang S, Hu F, Li H, Zhu TH. miR-223 and miR-142 attenuate hematopoietic cell proliferation, and miR-223 positively regulates miR-142 through LMO2 isoforms and CEBP-beta. *Cell Res*. 2010 Oct;20(10):1158-69.



130. Descombes P, Schibler U. A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA. *Cell*. 1991 Nov 1;67(3):569-79.
131. Ossipow V, Descombes P, Schibler U. CCAAT/enhancer-binding protein mRNA is translated into multiple proteins with different transcription activation potentials. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Sep 1;90(17):8219-23.
132. Kozak M. The scanning model for translation: an update. *J Cell Biol*. 1989 Feb;108(2):229-41.
133. Alam T, An MR, Papaconstantinou J. Differential expression of three C/EBP isoforms in multiple tissues during the acute phase response. *J Biol Chem*. 1992 Mar 15;267(8):5021-4.
134. Welm AL, Timchenko NA, Darlington GJ. C/EBPalpha regulates generation of C/EBPbeta isoforms through activation of specific proteolytic cleavage. *Mol Cell Biol*. 1999 Mar;19(3):1695-704.
135. Baer M, Johnson PF. Generation of truncated C/EBPbeta isoforms by in vitro proteolysis. *J Biol Chem*. 2000 Aug 25;275(34):26582-90.
136. Calkhoven CF, Muller C, Leutz A. Translational control of C/EBPalpha and C/EBPbeta isoform expression. *Genes Dev*. 2000 Aug 1;14(15):1920-32.
137. Lincoln AJ, Monczak Y, Williams SC, Johnson PF. Inhibition of CCAAT/enhancer-binding protein alpha and beta translation by upstream open reading frames. *J Biol Chem*. 1998 Apr 17;273(16):9552-60.
138. Xiong W, Hsieh CC, Kurtz AJ, Rabek JP, Papaconstantinou J. Regulation of CCAAT/enhancer-binding protein-beta isoform synthesis by alternative translational initiation at multiple AUG start sites. *Nucleic Acids Res*. 2001 Jul 15;29(14):3087-98.
139. Wethmar K, Begay V, Smink JJ, Zaragoza K, Wiesenthal V, Dorken B, et al. C/EBPbetaDeltaORF mice--a genetic model for uORF-mediated translational control in mammals. *Genes Dev*. 2010 Jan 1;24(1):15-20.
140. Timchenko LT, Iakova P, Welm AL, Cai ZJ, Timchenko NA. Calreticulin interacts with C/EBPalpha and C/EBPbeta mRNAs and represses translation of C/EBP proteins. *Mol Cell Biol*. 2002 Oct;22(20):7242-57.
141. Timchenko NA, Welm AL, Lu X, Timchenko LT. CUG repeat binding protein (CUGBP1) interacts with the 5' region of C/EBPbeta mRNA and regulates translation of C/EBPbeta isoforms. *Nucleic Acids Res*. 1999 Nov 15;27(22):4517-25.
142. Baldwin BR, Timchenko NA, Zahnow CA. Epidermal growth factor receptor stimulation activates the RNA binding protein CUG-BP1 and increases expression of C/EBPbeta-LIP in mammary epithelial cells. *Mol Cell Biol*. 2004 May;24(9):3682-91.
143. Lamb J, Ramaswamy S, Ford HL, Contreras B, Martinez RV, Kittrell FS, et al. A mechanism of cyclin D1 action encoded in the patterns of gene expression in human cancer. *Cell*. 2003 Aug 8;114(3):323-34.
144. Hata K, Nishimura R, Ueda M, Ikeda F, Matsubara T, Ichida F, et al. A CCAAT/enhancer binding protein beta isoform, liver-enriched inhibitory protein, regulates commitment of osteoblasts and adipocytes. *Mol Cell Biol*. 2005 Mar;25(5):1971-9.
145. Nakajima T, Kinoshita S, Sasagawa T, Sasaki K, Naruto M, Kishimoto T, et al. Phosphorylation at threonine-235 by a ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Mar 15;90(6):2207-11.
146. Hanlon M, Sturgill TW, Sealy L. ERK2- and p90(Rsk2)-dependent pathways regulate the CCAAT/enhancer-binding protein-beta interaction with serum response factor. *J Biol Chem*. 2001 Oct 19;276(42):38449-56.
147. Wegner M, Cao Z, Rosenfeld MG. Calcium-regulated phosphorylation within the leucine zipper of C/EBP beta. *Science*. 1992 Apr 17;256(5055):370-3.

148. Buck M, Poli V, van der Geer P, Chojkier M, Hunter T. Phosphorylation of rat serine 105 or mouse threonine 217 in C/EBP beta is required for hepatocyte proliferation induced by TGF alpha. *Mol Cell*. 1999 Dec;4(6):1087-92.
149. Tang QQ, Gronborg M, Huang H, Kim JW, Otto TC, Pandey A, et al. Sequential phosphorylation of CCAAT enhancer-binding protein beta by MAPK and glycogen synthase kinase 3beta is required for adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jul 12;102(28):9766-71.
150. Kim JW, Tang QQ, Li X, Lane MD. Effect of phosphorylation and S-S bond-induced dimerization on DNA binding and transcriptional activation by C/EBPbeta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Feb 6;104(6):1800-4.
151. Cesena TI, Cardinaux JR, Kwok R, Schwartz J. CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) beta is acetylated at multiple lysines: acetylation of C/EBPbeta at lysine 39 modulates its ability to activate transcription. *J Biol Chem*. 2007 Jan 12;282(2):956-67.
152. Cesena TI, Cui TX, Subramanian L, Fulton CT, Iniguez-Lluhi JA, Kwok RP, et al. Acetylation and deacetylation regulate CCAAT/enhancer binding protein beta at K39 in mediating gene transcription. *Mol Cell Endocrinol*. 2008 Jul 16;289(1-2):94-101.
153. Xu M, Nie L, Kim SH, Sun XH. STAT5-induced Id-1 transcription involves recruitment of HDAC1 and deacetylation of C/EBPbeta. *EMBO J*. 2003 Feb 17;22(4):893-904.
154. Pless O, Kowenz-Leutz E, Knoblich M, Lausen J, Beyermann M, Walsh MJ, et al. G9a-mediated lysine methylation alters the function of CCAAT/enhancer-binding protein-beta. *J Biol Chem*. 2008 Sep 26;283(39):26357-63.
155. Liu S, Croniger C, Arizmendi C, Harada-Shiba M, Ren J, Poli V, et al. Hypoglycemia and impaired hepatic glucose production in mice with a deletion of the C/EBPbeta gene. *J Clin Invest*. 1999 Jan;103(2):207-13.
156. Croniger CM, Millward C, Yang J, Kawai Y, Arinze IJ, Liu S, et al. Mice with a deletion in the gene for CCAAT/enhancer-binding protein beta have an attenuated response to cAMP and impaired carbohydrate metabolism. *J Biol Chem*. 2001 Jan 5;276(1):629-38.
157. Greenbaum LE, Li W, Cressman DE, Peng Y, Ciliberto G, Poli V, et al. CCAAT enhancer-binding protein beta is required for normal hepatocyte proliferation in mice after partial hepatectomy. *J Clin Invest*. 1998 Sep 1;102(5):996-1007.
158. Millward CA, Heaney JD, Sinasac DS, Chu EC, Bederman IR, Gilge DA, et al. Mice with a deletion in the gene for CCAAT/enhancer-binding protein beta are protected against diet-induced obesity. *Diabetes*. 2007 Jan;56(1):161-7.
159. Carmona MC, Hondares E, Rodriguez de la Concepcion ML, Rodriguez-Sureda V, Peinado-Onsurbe J, Poli V, et al. Defective thermoregulation, impaired lipid metabolism, but preserved adrenergic induction of gene expression in brown fat of mice lacking C/EBPbeta. *Biochem J*. 2005 Jul 1;389(Pt 1):47-56.
160. Screpanti I, Romani L, Musiani P, Modesti A, Fattori E, Lazzaro D, et al. Lymphoproliferative disorder and imbalanced T-helper response in C/EBP beta-deficient mice. *EMBO J*. 1995 May 1;14(9):1932-41.
161. Tanaka T, Akira S, Yoshida K, Umemoto M, Yoneda Y, Shirafuji N, et al. Targeted disruption of the NF-IL6 gene discloses its essential role in bacteria killing and tumor cytotoxicity by macrophages. *Cell*. 1995 Jan 27;80(2):353-61.
162. Cooper CL, Berrier AL, Roman C, Calame KL. Limited expression of C/EBP family proteins during B lymphocyte development. Negative regulator Ig/EBP predominates early and activator NF-IL-6 is induced later. *J Immunol*. 1994 Dec 1;153(11):5049-58.
163. Chen X, Liu W, Ambrosino C, Ruocco MR, Poli V, Romani L, et al. Impaired generation of bone marrow B lymphocytes in mice deficient in C/EBPbeta. *Blood*. 1997 Jul 1;90(1):156-64.

164. Akagi T, Saitoh T, O'Kelly J, Akira S, Gombart AF, Koeffler HP. Impaired response to GM-CSF and G-CSF, and enhanced apoptosis in C/EBPbeta-deficient hematopoietic cells. *Blood*. 2008 Mar 15;111(6):2999-3004.
165. Tominaga H, Maeda S, Hayashi M, Takeda S, Akira S, Komiya S, et al. CCAAT/enhancer-binding protein beta promotes osteoblast differentiation by enhancing Runx2 activity with ATF4. *Mol Biol Cell*. 2008 Dec;19(12):5373-86.
166. Sterneck E, Tessarollo L, Johnson PF. An essential role for C/EBPbeta in female reproduction. *Genes Dev*. 1997 Sep 1;11(17):2153-62.
167. Zhu S, Oh HS, Shim M, Sterneck E, Johnson PF, Smart RC. C/EBPbeta modulates the early events of keratinocyte differentiation involving growth arrest and keratin 1 and keratin 10 expression. *Mol Cell Biol*. 1999 Oct;19(10):7181-90.
168. Eaton EM, Sealy L. Modification of CCAAT/enhancer-binding protein-beta by the small ubiquitin-like modifier (SUMO) family members, SUMO-2 and SUMO-3. *J Biol Chem*. 2003 Aug 29;278(35):33416-21.
169. Berberich-Siebelt F, Berberich I, Andrulis M, Santner-Nanan B, Jha MK, Klein-Hessling S, et al. SUMOylation interferes with CCAAT/enhancer-binding protein beta-mediated c-myc repression, but not IL-4 activation in T cells. *J Immunol*. 2006 Apr 15;176(8):4843-51.
170. Zhu S, Yoon K, Sterneck E, Johnson PF, Smart RC. CCAAT/enhancer binding protein-beta is a mediator of keratinocyte survival and skin tumorigenesis involving oncogenic Ras signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jan 8;99(1):207-12.
171. Zahnow CA, Cardiff RD, Laucirica R, Medina D, Rosen JM. A role for CCAAT/enhancer binding protein beta-liver-enriched inhibitory protein in mammary epithelial cell proliferation. *Cancer Res*. 2001 Jan 1;61(1):261-9.
172. Sundfeldt K, Ivarsson K, Carlsson M, Enerback S, Janson PO, Brannstrom M, et al. The expression of CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) in the human ovary in vivo: specific increase in C/EBPbeta during epithelial tumour progression. *Br J Cancer*. 1999 Mar;79(7-8):1240-8.
173. Regalo G, Canedo P, Suriano G, Resende C, Campos ML, Oliveira MJ, et al. C/EBPbeta is over-expressed in gastric carcinogenesis and is associated with COX-2 expression. *J Pathol*. 2006 Dec;210(4):398-404.
174. Rask K, Thorn M, Ponten F, Kraaz W, Sundfeldt K, Hedin L, et al. Increased expression of the transcription factors CCAAT-enhancer binding protein-beta (C/EBBeta) and C/EBzeta (CHOP) correlate with invasiveness of human colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2000 May 1;86(3):337-43.
175. Oya M, Horiguchi A, Mizuno R, Marumo K, Murai M. Increased activation of CCAAT/enhancer binding protein-beta correlates with the invasiveness of renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2003 Mar;9(3):1021-7.
176. Homma J, Yamanaka R, Yajima N, Tsuchiya N, Genkai N, Sano M, et al. Increased expression of CCAAT/enhancer binding protein beta correlates with prognosis in glioma patients. *Oncol Rep*. 2006 Mar;15(3):595-601.
177. Madireddi MT, Dent P, Fisher PB. AP-1 and C/EBP transcription factors contribute to mda-7 gene promoter activity during human melanoma differentiation. *J Cell Physiol*. 2000 Oct;185(1):36-46.
178. Raught B, Gingras AC, James A, Medina D, Sonenberg N, Rosen JM. Expression of a translationally regulated, dominant-negative CCAAT/enhancer-binding protein beta isoform and up-regulation of the eukaryotic translation initiation factor 2alpha are correlated with neoplastic transformation of mammary epithelial cells. *Cancer Res*. 1996 Oct 1;56(19):4382-6.

179. Tomizawa M, Watanabe K, Saisho H, Nakagawara A, Tagawa M. Down-regulated expression of the CCAAT/enhancer binding protein alpha and beta genes in human hepatocellular carcinoma: a possible prognostic marker. *Anticancer Res.* 2003 Jan-Feb;23(1A):351-4.
180. Bundy LM, Sealy L. CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBPbeta)-2 transforms normal mammary epithelial cells and induces epithelial to mesenchymal transition in culture. *Oncogene.* 2003 Feb 13;22(6):869-83.
181. Carro MS, Lim WK, Alvarez MJ, Bollo RJ, Zhao X, Snyder EY, et al. The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumours. *Nature.* 2010 Jan 21;463(7279):318-25.
182. Hayashida M, Okazaki K, Fukushi J, Sakamoto A, Iwamoto Y. CCAAT/enhancer binding protein beta mediates expression of matrix metalloproteinase 13 in human articular chondrocytes in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009 Mar;60(3):708-16.
183. Raymond L, Eck S, Mollmark J, Hays E, Tomek I, Kantor S, et al. Interleukin-1 beta induction of matrix metalloproteinase-1 transcription in chondrocytes requires ERK-dependent activation of CCAAT enhancer-binding protein-beta. *J Cell Physiol.* 2006 Jun;207(3):683-8.
184. Doyle GA, Pierce RA, Parks WC. Transcriptional induction of collagenase-1 in differentiated monocyte-like (U937) cells is regulated by AP-1 and an upstream C/EBP-beta site. *J Biol Chem.* 1997 May 2;272(18):11840-9.
185. Shimizu Y, Kishimoto T, Ohtsuka M, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, et al. CCAAT/enhancer binding protein-beta promotes the survival of intravascular rat pancreatic tumor cells via antiapoptotic effects. *Cancer Sci.* 2007 Nov;98(11):1706-13.
186. Fries F, Nazarenko I, Hess J, Claas A, Angel P, Zoller M. CEBPbeta, JunD and c-Jun contribute to the transcriptional activation of the metastasis-associated C4.4A gene. *Int J Cancer.* 2007 May 15;120(10):2135-47.
187. Chen GK, Sale S, Tan T, Ermoian RP, Sikic BI. CCAAT/enhancer-binding protein beta (nuclear factor for interleukin 6) transactivates the human MDR1 gene by interaction with an inverted CCAAT box in human cancer cells. *Mol Pharmacol.* 2004 Apr;65(4):906-16.
188. Quintanilla-Martinez L, Pittaluga S, Miething C, Klier M, Rudelius M, Davies-Hill T, et al. NPM-ALK-dependent expression of the transcription factor CCAAT/enhancer binding protein beta in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Blood.* 2006 Sep 15;108(6):2029-36.
189. Pal R, Janz M, Galson DL, Gries M, Li S, Johrens K, et al. C/EBPbeta regulates transcription factors critical for proliferation and survival of multiple myeloma cells. *Blood.* 2009 Oct 29;114(18):3890-8.
190. Heckman CA, Wheeler MA, Boxer LM. Regulation of Bcl-2 expression by C/EBP in t(14;18) lymphoma cells. *Oncogene.* 2003 Sep 11;22(39):7891-9.
191. Anastasov N, Bonzheim I, Rudelius M, Klier M, Dau T, Angermeier D, et al. C/EBPbeta expression in ALK-positive anaplastic large cell lymphomas is required for cell proliferation and is induced by the STAT3 signaling pathway. *Haematologica.* 2010 May;95(5):760-7.
192. Jundt F, Raetzl N, Muller C, Calkhoven CF, Kley K, Mathas S, 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.* 2005 Sep 1;106(5):1801-7.
193. Lopez de Silanes I, Paz Quesada M, Esteller M. Aberrant regulation of messenger RNA 3'-untranslated region in human cancer. *Cell Oncol.* 2007;29(1):1-17.
194. Moore MJ. From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science.* 2005 Sep 2;309(5740):1514-8.

195. Guhaniyogi J, Brewer G. Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene*. 2001 Mar 7;265(1-2):11-23.
196. Klann E, Dever TE. Biochemical mechanisms for translational regulation in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*. 2004 Dec;5(12):931-42.
197. Anderson P, Kedersha N. Visibly stressed: the role of eIF2, TIA-1, and stress granules in protein translation. *Cell Stress Chaperones*. 2002 Apr;7(2):213-21.
198. Zheng D, Ezzeddine N, Chen CY, Zhu W, He X, Shyu AB. Deadenylation is prerequisite for P-body formation and mRNA decay in mammalian cells. *J Cell Biol*. 2008 Jul 14;182(1):89-101.
199. Tomecki R, Drazkowska K, Dziembowski A. Mechanisms of RNA degradation by the eukaryotic exosome. *Chembiochem*. 2010 May 3;11(7):938-45.
200. Yamashita A, Chang TC, Yamashita Y, Zhu W, Zhong Z, Chen CY, et al. Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol*. 2005 Dec;12(12):1054-63.
201. Beelman CA, Parker R. Degradation of mRNA in eukaryotes. *Cell*. 1995 Apr 21;81(2):179-83.
202. Wang Z, Kiledjian M. The poly(A)-binding protein and an mRNA stability protein jointly regulate an endoribonuclease activity. *Mol Cell Biol*. 2000 Sep;20(17):6334-41.
203. Balagopal V, Parker R. Polysomes, P bodies and stress granules: states and fates of eukaryotic mRNAs. *Curr Opin Cell Biol*. 2009 Jun;21(3):403-8.
204. Kedersha N, Anderson P. Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem Soc Trans*. 2002 Nov;30(Pt 6):963-9.
205. Kedersha N, Stoecklin G, Ayodele M, Yacono P, Lykke-Andersen J, Fritzler MJ, et al. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol*. 2005 Jun 20;169(6):871-84.
206. Kedersha N, Anderson P. Mammalian stress granules and processing bodies. *Methods Enzymol*. 2007;431:61-81.
207. Gatfield D, Unterholzner L, Ciccarelli FD, Bork P, Izaurralde E. Nonsense-mediated mRNA decay in *Drosophila*: at the intersection of the yeast and mammalian pathways. *EMBO J*. 2003 Aug 1;22(15):3960-70.
208. Kashima I, Yamashita A, Izumi N, Kataoka N, Morishita R, Hoshino S, et al. Binding of a novel SMG-1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev*. 2006 Feb 1;20(3):355-67.
209. Buhler M, Steiner S, Mohn F, Paillusson A, Muhlemann O. EJC-independent degradation of nonsense immunoglobulin- $\mu$  mRNA depends on 3' UTR length. *Nat Struct Mol Biol*. 2006 May;13(5):462-4.
210. Garneau NL, Wilusz J, Wilusz CJ. The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Feb;8(2):113-26.
211. Lejeune F, Li X, Maquat LE. Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylating, and exonucleolytic activities. *Mol Cell*. 2003 Sep;12(3):675-87.
212. Isken O, Maquat LE. Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. *Genes Dev*. 2007 Aug 1;21(15):1833-56.
213. van Hoof A, Frischmeyer PA, Dietz HC, Parker R. Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science*. 2002 Mar 22;295(5563):2262-4.
214. Frischmeyer PA, van Hoof A, O'Donnell K, Guerrierio AL, Parker R, Dietz HC. An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science*. 2002 Mar 22;295(5563):2258-61.

215. Inada T, Aiba H. Translation of aberrant mRNAs lacking a termination codon or with a shortened 3'-UTR is repressed after initiation in yeast. *EMBO J.* 2005 Apr 20;24(8):1584-95.
216. Doma MK, Parker R. Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature.* 2006 Mar 23;440(7083):561-4.
217. Mignone F, Graziano P. mRNA Untranslated Region (UTRs). *eLS.* 2011.
218. Vagner S, Galy B, Pyronnet S. Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites. *EMBO Rep.* 2001 Oct;2(10):893-8.
219. Andreev DE, Dmitriev SE, Terenin IM, Prassolov VS, Merrick WC, Shatsky IN. Differential contribution of the m7G-cap to the 5' end-dependent translation initiation of mammalian mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 2009 Oct;37(18):6135-47.
220. Bert AG, Grepin R, Vadas MA, Goodall GJ. Assessing IRES activity in the HIF-1 $\alpha$  and other cellular 5' UTRs. *RNA.* 2006 Jun;12(6):1074-83.
221. Graber TE, Holcik M. Cap-independent regulation of gene expression in apoptosis. *Mol Biosyst.* 2007 Dec;3(12):825-34.
222. Pacheco A, Martinez-Salas E. Insights into the biology of IRES elements through riboproteomic approaches. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:458927.
223. Kozak M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* 1987 Oct 26;15(20):8125-48.
224. Calvo SE, Pagliarini DJ, Mootha VK. Upstream open reading frames cause widespread reduction of protein expression and are polymorphic among humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 May 5;106(18):7507-12.
225. Wang XQ, Rothnagel JA. 5'-untranslated regions with multiple upstream AUG codons can support low-level translation via leaky scanning and reinitiation. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(4):1382-91.
226. Sparanese D, Lee CH. CRD-BP shields c-myc and MDR-1 RNA from endonucleolytic attack by a mammalian endoribonuclease. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(4):1209-21.
227. Grosset C, Chen CY, Xu N, Sonenberg N, Jacquemin-Sablon H, Shyu AB. A mechanism for translationally coupled mRNA turnover: interaction between the poly(A) tail and a c-fos RNA coding determinant via a protein complex. *Cell.* 2000 Sep 29;103(1):29-40.
228. Audic Y, Hartley RS. Post-transcriptional regulation in cancer. *Biol Cell.* 2004 Sep;96(7):479-98.
229. Imataka H, Gradi A, Sonenberg N. A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *EMBO J.* 1998 Dec 15;17(24):7480-9.
230. Grosset C, Boniface R, Duchez P, Solanilla A, Cosson B, Ripoche J. In vivo studies of translational repression mediated by the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor AU-rich element. *J Biol Chem.* 2004 Apr 2;279(14):13354-62.
231. Doyle GA, Bourdeau-Heller JM, Coulthard S, Meisner LF, Ross J. Amplification in human breast cancer of a gene encoding a c-myc mRNA-binding protein. *Cancer Res.* 2000 Jun 1;60(11):2756-9.
232. Richter JD. CPEB: a life in translation. *Trends Biochem Sci.* 2007 Jun;32(6):279-85.
233. Sarkissian M, Mendez R, Richter JD. Progesterone and insulin stimulation of CPEB-dependent polyadenylation is regulated by Aurora A and glycogen synthase kinase-3. *Genes Dev.* 2004 Jan 1;18(1):48-61.
234. Kim JH, Richter JD. Opposing polymerase-deadenylase activities regulate cytoplasmic polyadenylation. *Mol Cell.* 2006 Oct 20;24(2):173-83.
235. Rouhana L, Wang L, Buter N, Kwak JE, Schiltz CA, Gonzalez T, et al. Vertebrate GLD2 poly(A) polymerases in the germline and the brain. *RNA.* 2005 Jul;11(7):1117-30.

236. Cao Q, Richter JD. Dissolution of the maskin-eIF4E complex by cytoplasmic polyadenylation and poly(A)-binding protein controls cyclin B1 mRNA translation and oocyte maturation. *EMBO J.* 2002 Jul 15;21(14):3852-62.
237. Chkheidze AN, Lyakhov DL, Makeyev AV, Morales J, Kong J, Liebhaber SA. Assembly of the alpha-globin mRNA stability complex reflects binary interaction between the pyrimidine-rich 3' untranslated region determinant and poly(C) binding protein alphaCP. *Mol Cell Biol.* 1999 Jul;19(7):4572-81.
238. Ostareck DH, Ostareck-Lederer A, Shatsky IN, Hentze MW. Lipoxygenase mRNA silencing in erythroid differentiation: The 3'UTR regulatory complex controls 60S ribosomal subunit joining. *Cell.* 2001 Jan 26;104(2):281-90.
239. Messias AC, Harnisch C, Ostareck-Lederer A, Sattler M, Ostareck DH. The DICE-binding activity of KH domain 3 of hnRNP K is affected by c-Src-mediated tyrosine phosphorylation. *J Mol Biol.* 2006 Aug 18;361(3):470-81.
240. Pantopoulos K. Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Mar;1012:1-13.
241. Whitfield ML, Zheng LX, Baldwin A, Ohta T, Hurt MM, Marzluff WF. Stem-loop binding protein, the protein that binds the 3' end of histone mRNA, is cell cycle regulated by both translational and posttranslational mechanisms. *Mol Cell Biol.* 2000 Jun;20(12):4188-98.
242. Rattenbacher B, Beisang D, Wiesner DL, Jeschke JC, von Hohenberg M, St Louis-Vlasova IA, et al. Analysis of CUGBP1 targets identifies GU-repeat sequences that mediate rapid mRNA decay. *Mol Cell Biol.* 2010 Aug;30(16):3970-80.
243. Vlasova IA, Bohjanen PR. Posttranscriptional regulation of gene networks by GU-rich elements and CELF proteins. *RNA Biol.* 2008 Oct-Dec;5(4):201-7.
244. Vlasova IA, Tahoe NM, Fan D, Larsson O, Rattenbacher B, Sternjohn JR, et al. Conserved GU-rich elements mediate mRNA decay by binding to CUG-binding protein 1. *Mol Cell.* 2008 Feb 1;29(2):263-70.
245. Moraes KC, Wilusz CJ, Wilusz J. CUG-BP binds to RNA substrates and recruits PARN deadenylase. *RNA.* 2006 Jun;12(6):1084-91.
246. Peng SS, Chen CY, Shyu AB. Functional characterization of a non-AUUUA AU-rich element from the c-jun proto-oncogene mRNA: evidence for a novel class of AU-rich elements. *Mol Cell Biol.* 1996 Apr;16(4):1490-9.
247. Barreau C, Watrin T, Beverley Osborne H, Paillard L. Protein expression is increased by a class III AU-rich element and tethered CUG-BP1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Sep 1;347(3):723-30.
248. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2011 Jan;39(Database issue):D152-7.
249. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell.* 2003 Dec 26;115(7):787-98.
250. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell.* 2005 Jan 14;120(1):15-20.
251. Rajewsky N. microRNA target predictions in animals. *Nat Genet.* 2006 Jun;38 Suppl:S8-13.
252. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006 Apr;6(4):259-69.
253. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 2004 Oct 13;23(20):4051-60.
254. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol.* 2006 Dec;13(12):1097-101.

255. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):281-97.
256. Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*. 2004 Dec 15;18(24):3016-27.
257. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. 2003 Dec 15;17(24):3011-6.
258. Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*. 2004 Feb;10(2):185-91.
259. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*. 2001 Aug 3;293(5531):834-8.
260. Kawamata T, Yoda M, Tomari Y. Multilayer checkpoints for microRNA authenticity during RISC assembly. *EMBO Rep*. 2011;12(9):944-9.
261. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*. 2010 Aug 12;466(7308):835-40.
262. Selbach M, Schwanhauser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*. 2008 Sep 4;455(7209):58-63.
263. Yekta S, Shih IH, Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*. 2004 Apr 23;304(5670):594-6.
264. Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*. 2004 Sep 3;305(5689):1437-41.
265. Behm-Ansant I, Rehwinkel J, Doerks T, Stark A, Bork P, Izaurralde E. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev*. 2006 Jul 15;20(14):1885-98.
266. Maroney PA, Yu Y, Fisher J, Nilsen TW. Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nat Struct Mol Biol*. 2006 Dec;13(12):1102-7.
267. Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyuk E, et al. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science*. 2005 Sep 2;309(5740):1573-6.
268. Petersen CP, Bordeleau ME, Pelletier J, Sharp PA. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell*. 2006 Feb 17;21(4):533-42.
269. Nottrott S, Simard MJ, Richter JD. Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat Struct Mol Biol*. 2006 Dec;13(12):1108-14.
270. Wang B, Yanez A, Novina CD. MicroRNA-repressed mRNAs contain 40S but not 60S components. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Apr 8;105(14):5343-8.
271. Humphreys DT, Westman BJ, Martin DI, Preiss T. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Nov 22;102(47):16961-6.
272. Eberhardt W, Doller A, Akool el S, Pfeilschifter J. Modulation of mRNA stability as a novel therapeutic approach. *Pharmacol Ther*. 2007 Apr;114(1):56-73.
273. Beilharz TH, Humphreys DT, Clancy JL, Thermann R, Martin DI, Hentze MW, et al. microRNA-mediated messenger RNA deadenylation contributes to translational repression in mammalian cells. *PLoS One*. 2009;4(8):e6783.
274. Leung AK, Calabrese JM, Sharp PA. Quantitative analysis of Argonaute protein reveals microRNA-dependent localization to stress granules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Nov 28;103(48):18125-30.
275. Sen GL, Blau HM. Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat Cell Biol*. 2005 Jun;7(6):633-6.



276. Shaw G, Kamen R. A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell*. 1986 Aug 29;46(5):659-67.
277. Bakheet T, Williams BR, Khabar KS. ARED 3.0: the large and diverse AU-rich transcriptome. *Nucleic Acids Res*. 2006 Jan 1;34(Database issue):D111-4.
278. Bakheet T, Frevel M, Williams BR, Greer W, Khabar KS. ARED: human AU-rich element-containing mRNA database reveals an unexpectedly diverse functional repertoire of encoded proteins. *Nucleic Acids Res*. 2001 Jan 1;29(1):246-54.
279. Bakheet T, Williams BR, Khabar KS. ARED 2.0: an update of AU-rich element mRNA database. *Nucleic Acids Res*. 2003 Jan 1;31(1):421-3.
280. Fan J, Heller NM, Gorospe M, Atasoy U, Stellato C. The role of post-transcriptional regulation in chemokine gene expression in inflammation and allergy. *Eur Respir J*. 2005 Nov;26(5):933-47.
281. Chen CY, Shyu AB. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci*. 1995 Nov;20(11):465-70.
282. Xu N, Chen CY, Shyu AB. Modulation of the fate of cytoplasmic mRNA by AU-rich elements: key sequence features controlling mRNA deadenylation and decay. *Mol Cell Biol*. 1997 Aug;17(8):4611-21.
283. Meisner NC, Hackermuller J, Uhl V, Aszodi A, Jaritz M, Auer M. mRNA openers and closers: modulating AU-rich element-controlled mRNA stability by a molecular switch in mRNA secondary structure. *Chembiochem*. 2004 Oct 4;5(10):1432-47.
284. Gruber AR, Fallmann J, Kratochvill F, Kovarik P, Hofacker IL. AREsite: a database for the comprehensive investigation of AU-rich elements. *Nucleic Acids Res*. 2011 Jan;39(Database issue):D66-9.
285. Shyu AB, Belasco JG, Greenberg ME. Two distinct destabilizing elements in the c-fos message trigger deadenylation as a first step in rapid mRNA decay. *Genes Dev*. 1991 Feb;5(2):221-31.
286. Gao M, Wilusz CJ, Peltz SW, Wilusz J. A novel mRNA-decapping activity in HeLa cytoplasmic extracts is regulated by AU-rich elements. *EMBO J*. 2001 Mar 1;20(5):1134-43.
287. Lin WJ, Duffy A, Chen CY. Localization of AU-rich element-containing mRNA in cytoplasmic granules containing exosome subunits. *J Biol Chem*. 2007 Jul 6;282(27):19958-68.
288. von Roretz C, Gallouzi IE. Decoding ARE-mediated decay: is microRNA part of the equation? *J Cell Biol*. 2008 Apr 21;181(2):189-94.
289. Gherzi R, Lee KY, Briata P, Wegmuller D, Moroni C, Karin M, et al. A KH domain RNA binding protein, KSRP, promotes ARE-directed mRNA turnover by recruiting the degradation machinery. *Mol Cell*. 2004 Jun 4;14(5):571-83.
290. Lykke-Andersen J, Wagner E. Recruitment and activation of mRNA decay enzymes by two ARE-mediated decay activation domains in the proteins TTP and BRF-1. *Genes Dev*. 2005 Feb 1;19(3):351-61.
291. Yang F, Peng Y, Schoenberg DR. Endonuclease-mediated mRNA decay requires tyrosine phosphorylation of polysomal ribonuclease 1 (PMR1) for the targeting and degradation of polyribosome-bound substrate mRNA. *J Biol Chem*. 2004 Nov 19;279(47):48993-9002.
292. Stoecklin G, Mayo T, Anderson P. ARE-mRNA degradation requires the 5'-3' decay pathway. *EMBO Rep*. 2006 Jan;7(1):72-7.
293. Franks TM, Lykke-Andersen J. TTP and BRF proteins nucleate processing body formation to silence mRNAs with AU-rich elements. *Genes Dev*. 2007 Mar 15;21(6):719-35.
294. Chou CF, Mulky A, Maitra S, Lin WJ, Gherzi R, Kappes J, et al. Tethering KSRP, a decay-promoting AU-rich element-binding protein, to mRNAs elicits mRNA decay. *Mol Cell Biol*. 2006 May;26(10):3695-706.

295. Chen CY, Gherzi R, Ong SE, Chan EL, Raijmakers R, Pruijn GJ, et al. AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell*. 2001 Nov 16;107(4):451-64.
296. Mukherjee D, Gao M, O'Connor JP, Raijmakers R, Pruijn G, Lutz CS, et al. The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contain AU-rich elements. *EMBO J*. 2002 Jan 15;21(1-2):165-74.
297. Anderson JR, Mukherjee D, Muthukumaraswamy K, Moraes KC, Wilusz CJ, Wilusz J. Sequence-specific RNA binding mediated by the RNase PH domain of components of the exosome. *RNA*. 2006 Oct;12(10):1810-6.
298. Wang Z, Kiledjian M. Identification of an erythroid-enriched endoribonuclease activity involved in specific mRNA cleavage. *EMBO J*. 2000 Jan 17;19(2):295-305.
299. Tourriere H, Gallouzi IE, Chebli K, Capony JP, Mouaikel J, van der Geer P, et al. RasGAP-associated endoribonuclease G3Bp: selective RNA degradation and phosphorylation-dependent localization. *Mol Cell Biol*. 2001 Nov;21(22):7747-60.
300. Schoenberg DR. The end defines the means in bacterial mRNA decay. *Nat Chem Biol*. 2007 Sep;3(9):535-6.
301. Gallouzi IE, Parker F, Chebli K, Maurier F, Labourier E, Barlat I, et al. A novel phosphorylation-dependent RNase activity of GAP-SH3 binding protein: a potential link between signal transduction and RNA stability. *Mol Cell Biol*. 1998 Jul;18(7):3956-65.
302. Barreau C, Paillard L, Osborne HB. AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res*. 2005;33(22):7138-50.
303. Keene JD. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat Rev Genet*. 2007 Jul;8(7):533-43.
304. Taylor GA, Carballo E, Lee DM, Lai WS, Thompson MJ, Patel DD, et al. A pathogenetic role for TNF alpha in the syndrome of cachexia, arthritis, and autoimmunity resulting from tristetraprolin (TTP) deficiency. *Immunity*. 1996 May;4(5):445-54.
305. Lai WS, Carballo E, Strum JR, Kennington EA, Phillips RS, Blackshear PJ. Evidence that tristetraprolin binds to AU-rich elements and promotes the deadenylation and destabilization of tumor necrosis factor alpha mRNA. *Mol Cell Biol*. 1999 Jun;19(6):4311-23.
306. Carballo E, Lai WS, Blackshear PJ. Evidence that tristetraprolin is a physiological regulator of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor messenger RNA deadenylation and stability. *Blood*. 2000 Mar 15;95(6):1891-9.
307. Ogilvie RL, Abelson M, Hau HH, Vlasova I, Blackshear PJ, Bohjanen PR. Tristetraprolin down-regulates IL-2 gene expression through AU-rich element-mediated mRNA decay. *J Immunol*. 2005 Jan 15;174(2):953-61.
308. Stoecklin G, Tenenbaum SA, Mayo T, Chittur SV, George AD, Baroni TE, et al. Genome-wide analysis identifies interleukin-10 mRNA as target of tristetraprolin. *J Biol Chem*. 2008 Apr 25;283(17):11689-99.
309. Datta S, Biswas R, Novotny M, Pavicic PG, Jr., Herjan T, Mandal P, et al. Tristetraprolin regulates CXCL1 (KC) mRNA stability. *J Immunol*. 2008 Feb 15;180(4):2545-52.
310. Sawaoka H, Dixon DA, Oates JA, Boutaud O. Tristetraprolin binds to the 3'-untranslated region of cyclooxygenase-2 mRNA. A polyadenylation variant in a cancer cell line lacks the binding site. *J Biol Chem*. 2003 Apr 18;278(16):13928-35.
311. Lai WS, Parker JS, Grissom SF, Stumpo DJ, Blackshear PJ. Novel mRNA targets for tristetraprolin (TTP) identified by global analysis of stabilized transcripts in TTP-deficient fibroblasts. *Mol Cell Biol*. 2006 Dec;26(24):9196-208.
312. Lai WS, Carballo E, Thorn JM, Kennington EA, Blackshear PJ. Interactions of CCCH zinc finger proteins with mRNA. Binding of tristetraprolin-related zinc finger proteins to AU-rich elements and destabilization of mRNA. *J Biol Chem*. 2000 Jun 9;275(23):17827-37.

313. Cao H, Urban JF, Jr., Anderson RA. Insulin increases tristetraprolin and decreases VEGF gene expression in mouse 3T3-L1 adipocytes. *Obesity (Silver Spring)*. 2008 Jun;16(6):1208-18.
314. Ronkina N, Menon MB, Schwermann J, Tiedje C, Hitti E, Kotlyarov A, et al. MAPKAP kinases MK2 and MK3 in inflammation: complex regulation of TNF biosynthesis via expression and phosphorylation of tristetraprolin. *Biochem Pharmacol*. 2010 Dec 15;80(12):1915-20.
315. Phillips RS, Ramos SB, Blackshear PJ. Members of the tristetraprolin family of tandem CCCH zinc finger proteins exhibit CRM1-dependent nucleocytoplasmic shuttling. *J Biol Chem*. 2002 Mar 29;277(13):11606-13.
316. Bustin SA, Nie XF, Barnard RC, Kumar V, Pascall JC, Brown KD, et al. Cloning and characterization of ERF-1, a human member of the Tis11 family of early-response genes. *DNA Cell Biol*. 1994 May;13(5):449-59.
317. Ning ZQ, Norton JD, Li J, Murphy JJ. Distinct mechanisms for rescue from apoptosis in Ramos human B cells by signaling through CD40 and interleukin-4 receptor: role for inhibition of an early response gene, Berg36. *Eur J Immunol*. 1996 Oct;26(10):2356-63.
318. Stoecklin G, Colombi M, Raineri I, Leuenberger S, Mallaun M, Schmidlin M, et al. Functional cloning of BRF1, a regulator of ARE-dependent mRNA turnover. *Embo J*. 2002 Sep 2;21(17):4709-18.
319. Stumpo DJ, Byrd NA, Phillips RS, Ghosh S, Maronpot RR, Castranio T, et al. Chorioallantoic fusion defects and embryonic lethality resulting from disruption of Zfp36L1, a gene encoding a CCCH tandem zinc finger protein of the Tristetraprolin family. *Mol Cell Biol*. 2004 Jul;24(14):6445-55.
320. Keene JD. Biological clocks and the coordination theory of RNA operons and regulons. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2007;72:157-65.
321. Garcia-Mayoral MF, Diaz-Moreno I, Hollingworth D, Ramos A. The sequence selectivity of KSRP explains its flexibility in the recognition of the RNA targets. *Nucleic Acids Res*. 2008 Sep;36(16):5290-6.
322. Min H, Turck CW, Nikolic JM, Black DL. A new regulatory protein, KSRP, mediates exon inclusion through an intronic splicing enhancer. *Genes Dev*. 1997 Apr 15;11(8):1023-36.
323. Rehbein M, Wege K, Buck F, Schweizer M, Richter D, Kindler S. Molecular characterization of MARTA1, a protein interacting with the dendritic targeting element of MAP2 mRNAs. *J Neurochem*. 2002 Sep;82(5):1039-46.
324. Trabucchi M, Briata P, Filipowicz W, Ramos A, Gherzi R, Rosenfeld MG. KSRP promotes the maturation of a group of miRNA precursors. *Adv Exp Med Biol*. 2010;700:36-42.
325. Izquierdo JM, Valcarcel J. Two isoforms of the T-cell intracellular antigen 1 (TIA-1) splicing factor display distinct splicing regulation activities. Control of TIA-1 isoform ratio by TIA-1-related protein. *J Biol Chem*. 2007 Jul 6;282(27):19410-7.
326. Forch P, Puig O, Kedersha N, Martinez C, Granneman S, Seraphin B, et al. The apoptosis-promoting factor TIA-1 is a regulator of alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell*. 2000 Nov;6(5):1089-98.
327. Zhu H, Hasman RA, Young KM, Kedersha NL, Lou H. U1 snRNP-dependent function of TIAR in the regulation of alternative RNA processing of the human calcitonin/CGRP pre-mRNA. *Mol Cell Biol*. 2003 Sep;23(17):5959-71.
328. Gueydan C, Droogmans L, Chalou P, Huez G, Caput D, Krays V. Identification of TIAR as a protein binding to the translational regulatory AU-rich element of tumor necrosis factor alpha mRNA. *J Biol Chem*. 1999 Jan 22;274(4):2322-6.

329. Piecyk M, Wax S, Beck AR, Kedersha N, Gupta M, Maritim B, et al. TIA-1 is a translational silencer that selectively regulates the expression of TNF-alpha. *EMBO J.* 2000 Aug 1;19(15):4154-63.
330. Dember LM, Kim ND, Liu KQ, Anderson P. Individual RNA recognition motifs of TIA-1 and TIAR have different RNA binding specificities. *J Biol Chem.* 1996 Feb 2;271(5):2783-8.
331. Forch P, Puig O, Martinez C, Seraphin B, Valcarcel J. The splicing regulator TIA-1 interacts with U1-C to promote U1 snRNP recruitment to 5' splice sites. *EMBO J.* 2002 Dec 16;21(24):6882-92.
332. Anderson P, Kedersha N. Stressful initiations. *J Cell Sci.* 2002 Aug 15;115(Pt 16):3227-34.
333. Dixon DA. Regulation of COX-2 expression in human cancers. *Prog Exp Tumor Res.* 2003;37:52-71.
334. Yu Q, Cok SJ, Zeng C, Morrison AR. Translational repression of human matrix metalloproteinases-13 by an alternatively spliced form of T-cell-restricted intracellular antigen-related protein (TIAR). *J Biol Chem.* 2003 Jan 17;278(3):1579-84.
335. Kandasamy K, Joseph K, Subramaniam K, Raymond JR, Tholanikunnel BG. Translational control of beta2-adrenergic receptor mRNA by T-cell-restricted intracellular antigen-related protein. *J Biol Chem.* 2005 Jan 21;280(3):1931-43.
336. Lopez de Silanes I, Galban S, Martindale JL, Yang X, Mazan-Mamczarz K, Indig FE, et al. Identification and functional outcome of mRNAs associated with RNA-binding protein TIA-1. *Mol Cell Biol.* 2005 Nov;25(21):9520-31.
337. Kharraz Y, Salmand PA, Camus A, Auriol J, Gueydan C, Kruys V, et al. Impaired embryonic development in mice overexpressing the RNA-binding protein TIAR. *PLoS One.* 2010;5(6):e11352.
338. Zhang T, Delestienne N, Huez G, Kruys V, Gueydan C. Identification of the sequence determinants mediating the nucleo-cytoplasmic shuttling of TIAR and TIA-1 RNA-binding proteins. *J Cell Sci.* 2005 Dec 1;118(Pt 23):5453-63.
339. Kedersha NL, Gupta M, Li W, Miller I, Anderson P. RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J Cell Biol.* 1999 Dec 27;147(7):1431-42.
340. Yamasaki S, Stoecklin G, Kedersha N, Simarro M, Anderson P. T-cell intracellular antigen-1 (TIA-1)-induced translational silencing promotes the decay of selected mRNAs. *J Biol Chem.* 2007 Oct 12;282(41):30070-7.
341. Beck AR, Miller IJ, Anderson P, Streuli M. RNA-binding protein TIAR is essential for primordial germ cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Mar 3;95(5):2331-6.
342. Wagner BJ, DeMaria CT, Sun Y, Wilson GM, Brewer G. Structure and genomic organization of the human AUF1 gene: alternative pre-mRNA splicing generates four protein isoforms. *Genomics.* 1998 Mar 1;48(2):195-202.
343. Gratacos FM, Brewer G. The role of AUF1 in regulated mRNA decay. *WIREs RNA.* 2010;1:457-73.
344. Dreyfuss G, Kim VN, Kataoka N. Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 Mar;3(3):195-205.
345. Zhang W, Wagner BJ, Ehrenman K, Schaefer AW, DeMaria CT, Crater D, et al. Purification, characterization, and cDNA cloning of an AU-rich element RNA-binding protein, AUF1. *Mol Cell Biol.* 1993 Dec;13(12):7652-65.
346. Loflin P, Chen CY, Shyu AB. Unraveling a cytoplasmic role for hnRNP D in the in vivo mRNA destabilization directed by the AU-rich element. *Genes Dev.* 1999 Jul 15;13(14):1884-97.

347. Raineri I, Wegmueller D, Gross B, Certa U, Moroni C. Roles of AUF1 isoforms, HuR and BRF1 in ARE-dependent mRNA turnover studied by RNA interference. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(4):1279-88.
348. DeMaria CT, Brewer G. AUF1 binding affinity to A+U-rich elements correlates with rapid mRNA degradation. *J Biol Chem.* 1996 May 24;271(21):12179-84.
349. Wilson GM, Sun Y, Lu H, Brewer G. Assembly of AUF1 oligomers on U-rich RNA targets by sequential dimer association. *J Biol Chem.* 1999 Nov 19;274(47):33374-81.
350. Sinsimer KS, Gratacos FM, Knapinska AM, Lu J, Krause CD, Wierzbowski AV, et al. Chaperone Hsp27, a novel subunit of AUF1 protein complexes, functions in AU-rich element-mediated mRNA decay. *Mol Cell Biol.* 2008 Sep;28(17):5223-37.
351. Hinman MN, Lou H. Diverse molecular functions of Hu proteins. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Oct;65(20):3168-81.
352. Laroia G, Cuesta R, Brewer G, Schneider RJ. Control of mRNA decay by heat shock-ubiquitin-proteasome pathway. *Science.* 1999 Apr 16;284(5413):499-502.
353. Xu N, Chen CY, Shyu AB. Versatile role for hnRNP D isoforms in the differential regulation of cytoplasmic mRNA turnover. *Mol Cell Biol.* 2001 Oct;21(20):6960-71.
354. Good PJ. A conserved family of elav-like genes in vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 May 9;92(10):4557-61.
355. Wang X, Tanaka Hall TM. Structural basis for recognition of AU-rich element RNA by the HuD protein. *Nat Struct Biol.* 2001 Feb;8(2):141-5.
356. Lopez de Silanes I, Olmo N, Turnay J, Gonzalez de Buitrago G, Perez-Ramos P, Guzman-Aranguez A, et al. Acquisition of resistance to butyrate enhances survival after stress and induces malignancy of human colon carcinoma cells. *Cancer Res.* 2004 Jul 1;64(13):4593-600.
357. Fialcowitz-White EJ, Brewer BY, Ballin JD, Willis CD, Toth EA, Wilson GM. Specific protein domains mediate cooperative assembly of HuR oligomers on AU-rich mRNA-destabilizing sequences. *J Biol Chem.* 2007 May 21.
358. Fan XC, Steitz JA. HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Dec 22;95(26):15293-8.
359. Gorospe M. HuR in the mammalian genotoxic response: post-transcriptional multitasking. *Cell Cycle.* 2003 Sep-Oct;2(5):412-4.
360. Abdelmohsen K, Gorospe M. Posttranscriptional regulation of cancer traits by HuR. *WIREs RNA.* 2010;1(2):201-350.
361. Brennan CM, Steitz JA. HuR and mRNA stability. *Cell Mol Life Sci.* 2001 Feb;58(2):266-77.
362. Guttinger S, Muhlhauter P, Koller-Eichhorn R, Brennecke J, Kutay U. Transportin2 functions as importin and mediates nuclear import of HuR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Mar 2;101(9):2918-23.
363. Rebane A, Aab A, Steitz JA. Transportins 1 and 2 are redundant nuclear import factors for hnRNP A1 and HuR. *RNA.* 2004 Apr;10(4):590-9.
364. Gallouzi IE, Brennan CM, Steitz JA. Protein ligands mediate the CRM1-dependent export of HuR in response to heat shock. *RNA.* 2001 Sep;7(9):1348-61.
365. Kim HH, Abdelmohsen K, Gorospe M. Regulation of HuR by DNA Damage Response Kinases. *J Nucleic Acids.* 2010;2010.
366. Doller A, Schlepckow K, Schwalbe H, Pfeilschifter J, Eberhardt W. Tandem phosphorylation of serine 221 and 318 by PKC $\delta$  coordinates mRNA binding and nucleo-cytoplasmic shuttling of HuR. *Mol Cell Biol.* 2010 Jan 19.
367. Li H, Park S, Kilburn B, Jelinek MA, Henschen-Edman A, Aswad DW, et al. Lipopolysaccharide-induced methylation of HuR, an mRNA-stabilizing protein, by CARM1.

- Coactivator-associated arginine methyltransferase. *J Biol Chem*. 2002 Nov 22;277(47):44623-30.
368. Kim HH, Abdelmohsen K, Lal A, Pullmann R, Jr., Yang X, Galban S, et al. Nuclear HuR accumulation through phosphorylation by Cdk1. *Genes Dev*. 2008 Jul 1;22(13):1804-15.
369. Kim HH, Yang X, Kuwano Y, Gorospe M. Modification at HuR(S242) alters HuR localization and proliferative influence. *Cell Cycle*. 2008 Nov 1;7(21):3371-7.
370. Kim HH, Gorospe M. Phosphorylated HuR shuttles in cycles. *Cell Cycle*. 2008 Oct;7(20):3124-6.
371. Srikantan S, Gorospe M. UneCLIPsing HuR Nuclear Function. *Mol Cell*. 2011 Aug 5;43(3):319-21.
372. Abdelmohsen K, Srikantan S, Yang X, Lal A, Kim HH, Kuwano Y, et al. Ubiquitin-mediated proteolysis of HuR by heat shock. *EMBO J*. 2009 May 6;28(9):1271-82.
373. Abdelmohsen K, Pullmann R, Jr., Lal A, Kim HH, Galban S, Yang X, et al. Phosphorylation of HuR by Chk2 regulates SIRT1 expression. *Mol Cell*. 2007 Feb 23;25(4):543-57.
374. Mukherjee N, Corcoran DL, Nusbaum JD, Reid DW, Georgiev S, Hafner M, et al. Integrative Regulatory Mapping Indicates that the RNA-Binding Protein HuR Couples Pre-mRNA Processing and mRNA Stability. *Mol Cell*. 2011 Aug 5;43(3):327-39.
375. Lebedeva S, Jens M, Theil K, Schwanhausser B, Selbach M, Landthaler M, et al. Transcriptome-wide Analysis of Regulatory Interactions of the RNA-Binding Protein HuR. *Mol Cell*. 2011 Aug 5;43(3):340-52.
376. Izquierdo JM. Hu antigen R (HuR) functions as an alternative pre-mRNA splicing regulator of Fas apoptosis-promoting receptor on exon definition. *J Biol Chem*. 2008 Jul 4;283(27):19077-84.
377. Zhu H, Zhou HL, Hasman RA, Lou H. Hu proteins regulate polyadenylation by blocking sites containing U-rich sequences. *J Biol Chem*. 2007 Jan 26;282(4):2203-10.
378. Zhu H, Hasman RA, Barron VA, Luo G, Lou H. A nuclear function of Hu proteins as neuron-specific alternative RNA processing regulators. *Mol Biol Cell*. 2006 Dec;17(12):5105-14.
379. Abdelmohsen K, Lal A, Kim HH, Gorospe M. Posttranscriptional orchestration of an anti-apoptotic program by HuR. *Cell Cycle*. 2007 Jun 1;6(11):1288-92.
380. Katsanou V, Milatos S, Yiakouvaki A, Sgantzis N, Kotsoni A, Alexiou M, et al. The RNA-binding protein Elavl1/HuR is essential for placental branching morphogenesis and embryonic development. *Mol Cell Biol*. 2009 May;29(10):2762-76.
381. Ghosh M, Aguila HL, Michaud J, Ai Y, Wu MT, Hemmes A, et al. Essential role of the RNA-binding protein HuR in progenitor cell survival in mice. *J Clin Invest*. 2009 Dec;119(12):3530-43.
382. Ishimaru D, Ramalingam S, Sengupta TK, Bandyopadhyay S, Dellis S, Tholanikunnel BG, et al. Regulation of Bcl-2 expression by HuR in HL60 leukemia cells and A431 carcinoma cells. *Mol Cancer Res*. 2009 Aug;7(8):1354-66.
383. Lal A, Kawai T, Yang X, Mazan-Mamczarz K, Gorospe M. Antiapoptotic function of RNA-binding protein HuR effected through prothymosin alpha. *Embo J*. 2005 May 18;24(10):1852-62.
384. Mazan-Mamczarz K, Galban S, Lopez de Silanes I, Martindale JL, Atasoy U, Keene JD, et al. RNA-binding protein HuR enhances p53 translation in response to ultraviolet light irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jul 8;100(14):8354-9.
385. Kawai T, Lal A, Yang X, Galban S, Mazan-Mamczarz K, Gorospe M. Translational control of cytochrome c by RNA-binding proteins TIA-1 and HuR. *Mol Cell Biol*. 2006 Apr;26(8):3295-307.

386. Kullmann M, Gopfert U, Siewe B, Hengst L. ELAV/Hu proteins inhibit p27 translation via an IRES element in the p27 5'UTR. *Genes Dev.* 2002 Dec 1;16(23):3087-99.
387. Wang W, Caldwell MC, Lin S, Furneaux H, Gorospe M. HuR regulates cyclin A and cyclin B1 mRNA stability during cell proliferation. *EMBO J.* 2000 May 15;19(10):2340-50.
388. Yuan Z, Sanders AJ, Ye L, Wang Y, Jiang WG. Knockdown of human antigen R reduces the growth and invasion of breast cancer cells in vitro and affects expression of cyclin D1 and MMP-9. *Oncol Rep.* 2011 Jul;26(1):237-45.
389. Guo X, Hartley RS. HuR contributes to cyclin E1 deregulation in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res.* 2006 Aug 15;66(16):7948-56.
390. Galban S, Kuwano Y, Pullmann R, Jr., Martindale JL, Kim HH, Lal A, et al. RNA-binding proteins HuR and PTB promote the translation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell Biol.* 2008 Jan;28(1):93-107.
391. Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol.* 2000 Apr;88(4):1474-80.
392. Levy NS, Chung S, Furneaux H, Levy AP. Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem.* 1998 Mar 13;273(11):6417-23.
393. Dixon DA, Tolley ND, King PH, Nabors LB, McIntyre TM, Zimmerman GA, et al. Altered expression of the mRNA stability factor HuR promotes cyclooxygenase-2 expression in colon cancer cells. *J Clin Invest.* 2001 Dec;108(11):1657-65.
394. Giuliano F, Warner TD. Origins of prostaglandin E2: involvements of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in human and rat systems. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002 Dec;303(3):1001-6.
395. Tamura K, Sakurai T, Kogo H. Relationship between prostaglandin E2 and vascular endothelial growth factor (VEGF) in angiogenesis in human vascular endothelial cells. *Vascul Pharmacol.* 2006 Jun;44(6):411-6.
396. Mazan-Mamczarz K, Hagner PR, Corl S, Srikantan S, Wood WH, Becker KG, et al. Post-transcriptional gene regulation by HuR promotes a more tumorigenic phenotype. *Oncogene.* 2008 Oct 16;27(47):6151-63.
397. Dean JL, Wait R, Mahtani KR, Sully G, Clark AR, Saklatvala J. The 3' untranslated region of tumor necrosis factor alpha mRNA is a target of the mRNA-stabilizing factor HuR. *Mol Cell Biol.* 2001 Feb;21(3):721-30.
398. Atasoy U, Curry SL, Lopez de Silanes I, Shyu AB, Casolaro V, Gorospe M, et al. Regulation of eotaxin gene expression by TNF-alpha and IL-4 through mRNA stabilization: involvement of the RNA-binding protein HuR. *J Immunol.* 2003 Oct 15;171(8):4369-78.
399. Esnault S, Malter JS. Hyaluronic acid or TNF-alpha plus fibronectin triggers granulocyte macrophage-colony-stimulating factor mRNA stabilization in eosinophils yet engages differential intracellular pathways and mRNA binding proteins. *J Immunol.* 2003 Dec 15;171(12):6780-7.
400. Nabors LB, Gillespie GY, Harkins L, King PH. HuR, a RNA stability factor, is expressed in malignant brain tumors and binds to adenine- and uridine-rich elements within the 3' untranslated regions of cytokine and angiogenic factor mRNAs. *Cancer Res.* 2001 Mar 1;61(5):2154-61.
401. Sengupta S, Jang BC, Wu MT, Paik JH, Furneaux H, Hla T. The RNA-binding protein HuR regulates the expression of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem.* 2003 Jul 4;278(27):25227-33.
402. Katsanou V, Papadaki O, Milatos S, Blackshear PJ, Anderson P, Kollias G, et al. HuR as a negative posttranscriptional modulator in inflammation. *Mol Cell.* 2005 Sep 16;19(6):777-89.

403. Dong R, Lu JG, Wang Q, He XL, Chu YK, Ma QJ. Stabilization of Snail by HuR in the process of hydrogen peroxide induced cell migration. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Apr 27;356(1):318-21.
404. Huwiler A, Akool el S, Aschrafi A, Hamada FM, Pfeilschifter J, Eberhardt W. ATP potentiates interleukin-1 beta-induced MMP-9 expression in mesangial cells via recruitment of the ELAV protein HuR. *J Biol Chem*. 2003 Dec 19;278(51):51758-69.
405. Tran H, Maurer F, Nagamine Y. Stabilization of urokinase and urokinase receptor mRNAs by HuR is linked to its cytoplasmic accumulation induced by activated mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2. *Mol Cell Biol*. 2003 Oct;23(20):7177-88.
406. David PS, Tanveer R, Port JD. FRET-detectable interactions between the ARE binding proteins, HuR and p37AUF1. *RNA*. 2007 Sep;13(9):1453-68.
407. Toba G, White K. The third RNA recognition motif of Drosophila ELAV protein has a role in multimerization. *Nucleic Acids Res*. 2008 Mar;36(4):1390-9.
408. Fan XC, Steitz JA. Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs. *Embo J*. 1998 Jun 15;17(12):3448-60.
409. Chang N, Yi J, Guo G, Liu X, Shang Y, Tong T, et al. HuR uses AUF1 as a cofactor to promote p16INK4 mRNA decay. *Mol Cell Biol*. 2010 Aug;30(15):3875-86.
410. Leandersson K, Riesbeck K, Andersson T. Wnt-5a mRNA translation is suppressed by the Elav-like protein HuR in human breast epithelial cells. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(14):3988-99.
411. Bhattacharyya SN, Habermacher R, Martine U, Closs EI, Filipowicz W. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell*. 2006 Jun 16;125(6):1111-24.
412. Lim SJ, Lee SH, Joo SH, Song JY, Choi SI. Cytoplasmic expression of HuR is related to cyclooxygenase-2 expression in colon cancer. *Cancer Res Treat*. 2009 Jun;41(2):87-92.
413. Erkinheimo TL, Lassus H, Sivula A, Sengupta S, Furneaux H, Hla T, et al. Cytoplasmic HuR expression correlates with poor outcome and with cyclooxygenase 2 expression in serous ovarian carcinoma. *Cancer Res*. 2003 Nov 15;63(22):7591-4.
414. Heinonen M, Bono P, Narko K, Chang SH, Lundin J, Joensuu H, et al. Cytoplasmic HuR expression is a prognostic factor in invasive ductal breast carcinoma. *Cancer Res*. 2005 Mar 15;65(6):2157-61.
415. Guo X, Wu Y, Hartley RS. MicroRNA-125a represses cell growth by targeting HuR in breast cancer. *RNA Biol*. 2009 Nov-Dec;6(5):575-83.
416. Xu F, Zhang X, Lei Y, Liu X, Liu Z, Tong T, et al. Loss of repression of HuR translation by miR-16 may be responsible for the elevation of HuR in human breast carcinoma. *J Cell Biochem*. 2010 Oct 15;111(3):727-34.
417. Abdelmohsen K, Kim MM, Srikantan S, Mercken EM, Brennan SE, Wilson GM, et al. miR-519 suppresses tumor growth by reducing HuR levels. *Cell Cycle*. 2010 Apr 1;9(7):1354-9.
418. Abdelmohsen K, Srikantan S, Kuwano Y, Gorospe M. miR-519 reduces cell proliferation by lowering RNA-binding protein HuR levels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Dec 23;105(51):20297-302.
419. Kang MJ, Ryu BK, Lee MG, Han J, Lee JH, Ha TK, et al. NF-kappaB activates transcription of the RNA-binding factor HuR, via PI3K-AKT signaling, to promote gastric tumorigenesis. *Gastroenterology*. 2008 Dec;135(6):2030-42, 42 e1-3.
420. Yi J, Chang N, Liu X, Guo G, Xue L, Tong T, et al. Reduced nuclear export of HuR mRNA by HuR is linked to the loss of HuR in replicative senescence. *Nucleic Acids Res*. 2010 Mar;38(5):1547-58.



421. van Kouwenhove M, Kedde M, Agami R. MicroRNA regulation by RNA-binding proteins and its implications for cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(9):644-56.
422. Kim HH, Kuwano Y, Srikantan S, Lee EK, Martindale JL, Gorospe M. HuR recruits let-7/RISC to repress c-Myc expression. *Genes Dev*. 2009 Aug 1;23(15):1743-8.
423. Jing Q, Huang S, Guth S, Zarubin T, Motoyama A, Chen J, et al. Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell*. 2005 Mar 11;120(5):623-34.
424. Vasudevan S, Steitz JA. AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell*. 2007 Mar 23;128(6):1105-18.
425. Anastasov N, Bonzheim I, Rudelius M, Klier M, Dau T, Angermeier D, et al. C/EBP $\beta$  expression in ALK<sup>+</sup> anaplastic large cell lymphomas (ALCL) is required for cell proliferation and is induced by the STAT3 signaling pathway. *Haematologica*. 2009 Dec 16.
426. Jones H, Carver M, Pekala PH. HuR binds to a single site on the C/EBP $\beta$  mRNA of 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Mar 30;355(1):217-20.
427. Morris SW, Naeve C, Mathew P, James PL, Kirstein MN, Cui X, et al. ALK, the chromosome 2 gene locus altered by the t(2;5) in non-Hodgkin's lymphoma, encodes a novel neural receptor tyrosine kinase that is highly related to leukocyte tyrosine kinase (LTK). *Oncogene*. 1997 May 8;14(18):2175-88.
428. Bergalet J, Fawal M, Lopez C, Desjobert C, Lamant L, Delsol G, et al. HuR-mediated control of C/EBP $\beta$  mRNA stability and translation in ALK-positive anaplastic large cell lymphomas. *Mol Cancer Res*. 2011 Apr;9(4):485-96.
429. Bevilacqua A, Ceriani MC, Capaccioli S, Nicolini A. Post-transcriptional regulation of gene expression by degradation of messenger RNAs. *J Cell Physiol*. 2003 Jun;195(3):356-72.
430. Frevel MA, Bakheet T, Silva AM, Hissong JG, Khabar KS, Williams BR. p38 Mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent signaling of mRNA stability of AU-rich element-containing transcripts. *Mol Cell Biol*. 2003 Jan;23(2):425-36.
431. Ruggiero T, Trabucchi M, Ponassi M, Corte G, Chen CY, al-Haj L, et al. Identification of a set of KSRP target transcripts upregulated by PI3K-AKT signaling. *BMC Mol Biol*. 2007;8:28.
432. Carballo E, Lai WS, Blackshear PJ. Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor- $\alpha$  production by tristetraprolin. *Science*. 1998 Aug 14;281(5379):1001-5.
433. Ma WJ, Cheng S, Campbell C, Wright A, Furneaux H. Cloning and characterization of HuR, a ubiquitously expressed Elav-like protein. *J Biol Chem*. 1996 Apr 5;271(14):8144-51.
434. Robinow S, Campos AR, Yao KM, White K. The elav gene product of *Drosophila*, required in neurons, has three RNP consensus motifs. *Science*. 1988 Dec 16;242(4885):1570-2.
435. Pullmann R, Jr., Juhaszova M, Lopez de Silanes I, Kawai T, Mazan-Mamczarz K, Halushka MK, et al. Enhanced proliferation of cultured human vascular smooth muscle cells linked to increased function of RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem*. 2005 Jun 17;280(24):22819-26.
436. Lopez de Silanes I, Lal A, Gorospe M. HuR: post-transcriptional paths to malignancy. *RNA Biol*. 2005 Jan;2(1):11-3.
437. Meisner NC, Hintersteiner M, Mueller K, Bauer R, Seifert JM, Naegeli HU, et al. Identification and mechanistic characterization of low-molecular-weight inhibitors for HuR. *Nat Chem Biol*. 2007 Aug;3(8):508-15.
438. Doller A, Akool ES, Huwiler A, Muller R, Radeke HH, Pfeilschifter J, et al. Posttranslational modification of the AU-rich element binding protein HuR by PKC $\delta$  elicits angiotensin II-induced stabilization and nuclear export of COX-II mRNA. *Mol Cell Biol*. 2008 Feb 19.

439. Doller A, Huwiler A, Muller R, Radeke HH, Pfeilschifter J, Eberhardt W. Protein kinase C alpha-dependent phosphorylation of the mRNA-stabilizing factor HuR: implications for posttranscriptional regulation of cyclooxygenase-2. *Mol Biol Cell*. 2007 Jun;18(6):2137-48.
440. Colomba A, Courilleau D, Ramel D, Billadeau DD, Espinos E, Delsol G, et al. Activation of Rac1 and the exchange factor Vav3 are involved in NPM-ALK signaling in anaplastic large cell lymphomas. *Oncogene*. 2008 Apr 24;27(19):2728-36.
441. Christensen JG, Zou HY, Arango ME, Li Q, Lee JH, McDonnell SR, et al. Cytoreductive antitumor activity of PF-2341066, a novel inhibitor of anaplastic lymphoma kinase and c-Met, in experimental models of anaplastic large-cell lymphoma. *Mol Cancer Ther*. 2007 Dec;6(12 Pt 1):3314-22.
442. Lombardo LJ, Lee FY, Chen P, Norris D, Barrish JC, Behnia K, et al. Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *J Med Chem*. 2004 Dec 30;47(27):6658-61.
443. Dormoy-Raclet V, Menard I, Clair E, Kurban G, Mazroui R, Di Marco S, et al. The RNA-binding protein HuR promotes cell migration and cell invasion by stabilizing the beta-actin mRNA in a U-rich-element-dependent manner. *Mol Cell Biol*. 2007 Aug;27(15):5365-80.
444. Zamo A, Chiarle R, Piva R, Howes J, Fan Y, Chilosi M, et al. Anaplastic lymphoma kinase (ALK) activates Stat3 and protects hematopoietic cells from cell death. *Oncogene*. 2002 Feb 7;21(7):1038-47.
445. Huttlin EL, Jedrychowski MP, Elias JE, Goswami T, Rad R, Beausoleil SA, et al. A tissue-specific atlas of mouse protein phosphorylation and expression. *Cell*. 2010 Dec 23;143(7):1174-89.
446. Artemenko KA, Bergstrom Lind S, Elfineh L, Mayrhofer C, Zubarev RA, Bergquist J, et al. Optimization of immunoaffinity enrichment and detection: toward a comprehensive characterization of the phosphotyrosine proteome of K562 cells by liquid chromatography-mass spectrometry. *Analyst*. 2011 May 7;136(9):1971-8.
447. Olsen JV, Vermeulen M, Santamaria A, Kumar C, Miller ML, Jensen LJ, et al. Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Sci Signal*. 2010;3(104):ra3.
448. Gu TL, Mercher T, Tyner JW, Goss VL, Walters DK, Cornejo MG, et al. A novel fusion of RBM6 to CSF1R in acute megakaryoblastic leukemia. *Blood*. 2007 Jul 1;110(1):323-33.
449. Rush J, Moritz A, Lee KA, Guo A, Goss VL, Spek EJ, et al. Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells. *Nat Biotechnol*. 2005 Jan;23(1):94-101.
450. Chiarugi V, Ruggiero M. Role of three cancer "master genes" p53, bcl2 and c-myc on the apoptotic process. *Tumori*. 1996 May-Jun;82(3):205-9.
451. Liao B, Hu Y, Brewer G. Competitive binding of AUF1 and TIAR to MYC mRNA controls its translation. *Nat Struct Mol Biol*. 2007 Jun;14(6):511-8.
452. Marderosian M, Sharma A, Funk AP, Vartanian R, Masri J, Jo OD, et al. Tristetraprolin regulates Cyclin D1 and c-Myc mRNA stability in response to rapamycin in an Akt-dependent manner via p38 MAPK signaling. *Oncogene*. 2006 Oct 12;25(47):6277-90.
453. Fawal M, Jean-Jean O, Vanzo N, Morello D. Novel mRNA-containing cytoplasmic granules in ALK-transformed cells. *Mol Biol Cell*. 2011 Mar;22(6):726-35.
454. Fawal M, Espinos E, Jean-Jean O, Morello D. Looking for the functions of RNA granules in ALK-transformed cells. *Bioarchitecture*. 2011 Mar;1(2):91-5.
455. Merkel O, Hamacher F, Laimer D, Sifft E, Trajanoski Z, Scheideler M, et al. Identification of differential and functionally active miRNAs in both anaplastic lymphoma

- kinase (ALK)+ and ALK- anaplastic large-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Sep 14;107(37):16228-33.
456. Desjobert C, Renalier MH, Bergalet J, Dejean E, Joseph N, Kruczynski A, et al. MiR-29a down-regulation in ALK-positive anaplastic large cell lymphomas contributes to apoptosis blockade through MCL-1 overexpression. *Blood*. 2011 Jun 16;117(24):6627-37.
457. Dejean E, Renalier MH, Foisseau M, Agirre X, Joseph N, de Paiva GR, et al. Hypoxia-microRNA-16 downregulation induces VEGF expression in anaplastic lymphoma kinase (ALK)-positive anaplastic large-cell lymphomas. *Leukemia*. 2011 Jul 22.
458. Wu F, Wang P, Zhang J, Young LC, Lai R, Li L. Studies of phosphoproteomic changes induced by nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase (ALK) highlight deregulation of tumor necrosis factor (TNF)/Fas/TNF-related apoptosis-induced ligand signaling pathway in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Mol Cell Proteomics*. 2010 Jul;9(7):1616-32.
459. Tian Q, Taupin J, Elledge S, Robertson M, Anderson P. Fas-activated serine/threonine kinase (FAST) phosphorylates TIA-1 during Fas-mediated apoptosis. *J Exp Med*. 1995 Sep 1;182(3):865-74.
460. Izquierdo JM, Valcarcel J. Fas-activated serine/threonine kinase (FAST K) synergizes with TIA-1/TIAR proteins to regulate Fas alternative splicing. *J Biol Chem*. 2007 Jan 19;282(3):1539-43.
461. Reinhardt HC, Hasskamp P, Schmedding I, Morandell S, van Vugt MA, Wang X, et al. DNA damage activates a spatially distinct late cytoplasmic cell-cycle checkpoint network controlled by MK2-mediated RNA stabilization. *Mol Cell*. 2010 Oct 8;40(1):34-49.
462. Sanda MG, Dunn RL, Michalski J, Sandler HM, Northouse L, Hembroff L, et al. Quality of life and satisfaction with outcome among prostate-cancer survivors. *N Engl J Med*. 2008 Mar 20;358(12):1250-61.
463. Marchese FP, Aubareda A, Tudor C, Saklatvala J, Clark AR, Dean JL. MAPKAP kinase 2 blocks tristetraprolin-directed mRNA decay by inhibiting CAF1 deadenylase recruitment. *J Biol Chem*. 2010 Sep 3;285(36):27590-600.
464. Filippova N, Yang X, Wang Y, Gillespie GY, Langford C, King PH, et al. The RNA-binding protein HuR promotes glioma growth and treatment resistance. *Mol Cancer Res*. 2011 May;9(5):648-59.
465. Shen Z, Ye D, Zhang X, Jiang Z, Xiao B, Guo J. Inhibitory effect of HuR gene small interfering RNA segment on laryngeal carcinoma Hep-2 cell growth. *J Laryngol Otol*. 2010 Nov;124(11):1183-9.
466. Chae MJ, Sung HY, Kim EH, Lee M, Kwak H, Chae CH, et al. Chemical inhibitors destabilize HuR binding to the AU-rich element of TNF-alpha mRNA. *Exp Mol Med*. 2009 Nov 30;41(11):824-31.



## **Un nouveau rôle de la tyrosine kinase oncogénique NPM-ALK dans le contrôle de l'expression génique au niveau post-transcriptionnel.**

### **RESUME:**

La protéine hybride à activité tyrosine kinase, NPM-ALK est exprimée dans 75% des Lymphomes Anaplasiques à Grandes Cellules (LAGC). Bien que le phénotype tumoral de ces lymphomes soit en partie associé à l'activation constitutive de nombreuses voies de signalisation (MAPK, PI3K/AKT, Jak/STAT et PLC- $\beta$ ), l'identification de nouveaux partenaires de NPM-ALK a permis d'envisager l'existence de nouveaux mécanismes moléculaires participants à son pouvoir oncogénique. Ainsi, la découverte d'interactions entre NPM-ALK et des protéines de liaisons aux ARNm (RNA-Binding protein, RBPs), nous a poussé à émettre l'hypothèse, qu'outre son effet sur la transcription, la tyrosine kinase oncogénique NPM-ALK pouvait également moduler l'expression génique au niveau post-transcriptionnel.

Dans la première partie de mon travail (article n°1), j'ai montré que HuR, une AUBP (AU-binding protein qui contrôle le devenir d'ARNm dont l'extrémité 3' non traduite présente des motifs riches en Adénines et Uridines (AU-rich element, ARE), augmente la stabilité et le niveau de traduction de l'ARNm-ARE C/EBP $\beta$  dans les LAGC ALK+. J'ai également démontré que la tyrosine kinase NPM-ALK augmente l'activité de HuR en modulant ses propriétés biologiques telles que son affinité pour ses ARNm cibles et son recrutement au niveau des polysomes. J'ai enfin déterminé que NPM-ALK et HuR co-localisent dans des granules cytoplasmiques et que HuR est phosphorylée sur résidus tyrosine dans les LAGC ALK+.

Dans la deuxième partie de mon travail (manuscrit en préparation), et grâce à la génération d'une série de mutants de HuR, j'ai : 1/ identifié les résidus tyrosine, phosphorylés dans les LAGC ALK+; 2/ démontré l'implication directe de la tyrosine kinase NPM-ALK dans cette phosphorylation; 3/ recherché l'impact de ces phosphorylations sur les propriétés biologiques de HuR (affinité envers ses cibles et localisation subcellulaire). Plus particulièrement, j'ai montré que la phosphorylation du résidu tyr26, localisé dans le motif de reconnaissance aux ARN (RRM1), joue un rôle essentiel dans l'affinité de HuR pour ses ARNm cibles. Il reste aujourd'hui à préciser le rôle de ces phosphorylations dans l'adressage de HuR et de ses cibles aux polysomes. Enfin, il faut démontrer la relevance fonctionnelle de cette phosphorylation sur l'émergence et le maintien des LAGC ALK+.

Parallèlement à ce projet qui a été au centre de ma thèse, j'ai également participé à un travail de l'équipe qui a permis de mettre en évidence l'implication de la tyrosine kinase NPM-ALK dans le contrôle de l'expression d'un miRNA, par méthylation de son promoteur. Ce travail s'est basé sur l'exemple du contrôle de l'expression de la protéine anti-apoptotique Mcl1 par le miR-29a.

Ces différents travaux sont à l'origine d'une part, de la découverte de deux nouveaux acteurs de la lymphomagenèse dépendante de ALK, l'AUBP HuR et les miRNAs. Ils valident d'autre part le rôle original de NPM-ALK dans la régulation de l'expression génique au niveau post-transcriptionnel.

**MOTS-CLES:** Tyrosine kinase NPM-ALK, Lymphomes Anaplasiques à Grandes Cellules, HuR, phosphorylation, miRNAs, métabolisme des ARNm

## **A new role of the oncogenic tyrosine kinase NPM-ALK in the control of gene expression at the post-transcriptional level**

### **ABSTRACT:**

The NPM-ALK chimeric protein is expressed in 75% of Anaplastic Large Cell Lymphomas. Although the oncogenic features of these lymphomas are in part due to the constitutive activation of many signalling pathways such as MAPK, PI3K/AKT, Jak/STAT et PLC- $\alpha$ , the identification of new partners of NPM-ALK would allow to consider new molecular mechanisms that could also participate to this phenotype. Thereby, interactions between NPM-ALK and RNA-Binding Proteins (RBPs) led us to postulate that, in addition to its recognized role in transcriptional activation, the oncogenic tyrosine kinase NPM-ALK could also modulate gene expression at the post-transcriptional level.

In the first part of my work (1st article), I have shown that HuR, an AU-rich Binding Protein (AUBP), that bind to Adenine and Uridine rich elements (ARE) in the 3' untranslated region of some mRNAs, controls the stability and the level of translation of C/EBP $\alpha$  mRNA in ALK+ ALCL. I have also demonstrated that the tyrosine kinase NPM-ALK increases HuR activity by modulating its biological properties such as its binding affinity on its mRNA targets or its recruitment into actively translating polysomes. Lastly, we have determined that NPM-ALK and HuR colocalize into cytoplasmic granules and that HuR is phosphorylated on tyrosine residus in ALK+ ALCL.

In the second part of my work (publication in prep.), by testing different point mutated versions of HuR, I have: 1/ identified the tyrosine residues that are phosphorylated in ALK+ ALCL; 2/ demonstrated the direct involvement of the tyrosine kinase NPM-ALK in this phosphorylation event; 3/ measured the impact of these phosphorylations on HuR biological properties (affinity toward its targets mRNAs and subcellular localization). More particularly, I have shown that the phosphorylation on tyrosine residue 26 within the RNA recognition motif (RRM) 1 is essential for NPM-ALK-mediated HuR binding to ARE-mRNAs. It remains now to clarify the role of these phosphorylations in the recruitment of HuR into polysomes and to demonstrate the functional relevance of these phosphorylations on the emergence and the maintenance of ALK+ ALCL.

In the same time, I have taken part in another work in the team dealing with the role of the tyrosine kinase NPM-ALK in the control of miRNA expression, by methylation events. This project focused on the example of the control of the expression of the anti-apoptotic MCL-1 by miR-29a.

These different works led us first, to discover new actors of ALK-dependant lymphomagenesis, the AUBP HuR and miRNAs. They also validated the original role of NPM-ALK in the regulation of gene expression at post-transcriptional level.

**KEYWORDS:** NPM-ALK Tyrosine kinase, Anaplasiques Large Cell Lymphomas, phosphorylation, miRNAs, mRNA metabolism