

Université Bordeaux Segalen

Année 2011

Thèse n° 1872

THÈSE

Pour le
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX II
Mention Sciences, Technologies, Santé
Option Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Présentée et soutenue publiquement le :

20 Décembre 2011

Par

Claire DRULLION

Née le 16 Octobre 1985 à Pau (64)

RÉPONSE ET RÉSISTANCE AUX INHIBITEURS DE TYROSINE KINASES DANS LE

MODÈLE DE LA LMC :

IDENTIFICATION ET RÉGULATION DES MORTS CELLULAIRES

Travail réalisé au sein de l'équipe « Hématopoïèse Leucémique et Cibles Thérapeutiques »

INSERM U 1035

Membres du Jury

Mr. Vincent Praloran	Professeur, Université Bordeaux 2	Président
Mme. Véronique Maguer-Satta	Docteur, CRCL Lyon	Rapporteur
Mr. Patrick Auberger	Docteur, C3M Nice	Rapporteur
Mr. Jean-Max Pasquet	Docteur, Université Bordeaux 2	Directeur de thèse

À ma famille,

TABLE DES MATIÈRES

Tables des matières

REMERCIEMENTS.....	1
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	5
LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX.....	8
INTRODUCTION.....	10
I. La leucémie myéloïde chronique.....	11
I.A. Hématopoïèse normale	11
I.A.1 Définition	11
I.A.2 Les compartiments hématopoïétiques	12
I.A.2.a Les cellules souches hématopoïétiques	13
I.A.2.b Les progéniteurs.....	13
I.A.2.c Les précurseurs et les cellules matures	13
I.A.3 La régulation de l'hématopoïèse	14
I.A.3.a Le microenvironnement	14
I.A.3.b Les facteurs de croissance.....	14
I.A.3.b.1 Les facteurs positifs de l'hématopoïèse	15
I.A.3.b.2 Les facteurs négatifs de l'hématopoïèse	16
I.A.3.c La Régulation génétique	18
I.B. Hématopoïèse leucémique dans la LMC	19
I.B.1 La Leucémie Myéloïde Chronique (LMC)	20
I.B.1.a Une maladie évolutive.....	21
I.B.1.b Physiopathologie moléculaire	22
I.B.1.b.1 ABL.....	23
I.B.1.b.2 BCR	25
I.B.1.b.3 Le rôle oncogénique de Bcr-Abl.....	26
I.B.1.c Voies de signalisation activées par Bcr-Abl.....	27
I.B.1.c.1 Implication de la Voie Ras	27
I.B.1.c.2 Voie PI3K/Akt	29
I.B.1.c.3 Implication de la voie JAK	32
I.B.1.c.4 Les protéines STAT	33
I.B.1.d Conséquences de la signalisation de Bcr-Abl dans la cellule leucémique.....	35
I.B.1.d.1 Inhibition de l'apoptose.....	35
I.B.1.d.2 Modulation des protéines de la famille Bcl-2.....	35
I.B.1.d.3 Activation de la voie anti-apoptotique NFκB.....	36

I.B.1.d.4	L'effet anti-apoptotique de Hsp70	38
I.B.1.e	Bcr-Abl et prolifération.....	39
I.B.1.f	Adhésion	40
I.B.1.g	Instabilité génétique.....	42
II.	Thérapeutiques dans le LMC.....	43
II.A	Thérapeutiques non ciblées	43
II.A.1	Chimiothérapies.....	43
II.A.2	Interféron α (INF α).....	44
II.A.3	Allogreffe	45
II.B.	Thérapeutiques ciblées.....	46
II.B.1	Inhibiteur de tyrosine kinase (ITK) de 1 ^{er} génération : imatinib	46
II.B.1.a	L'imatinib: une thérapeutique de premier choix.....	46
II.B.2	ITK de seconde génération.....	48
II.B.2.a	Le nilotinib	48
II.B.2.b	Le dasatinib	49
II.B.3	Troisième génération pour vaincre la mutation T315I	50
II.B.4	Les ITK allostériques.....	51
II.C.	Les résistances aux ITK	52
II.C.1	Résistances primaires	52
II.C.2	Résistances secondaires.....	52
II.C.2.a	Les résistances dépendantes de Bcr-Abl	53
II.C.2.b	Resistance indépendante de Bcr-ABI ²³³	54
II.C.2.b.1	Efflux et influx de l'imatinib par les transporteurs P-glycoprotéine (Pgp) ou hOCT1	54
II.C.2.b.2	Acide α -glucophorine (AGP)	55
II.C.2.b.3	Surexpression de Src kinases.....	55
II.C.2.b.4	D'autres voies de signalisation modulées	56
III.	Les morts cellulaires	57
III.A.	Classification des morts cellulaires.....	58
III.B.	L'apoptose ou la mort programmée.....	60
III.B.1	La voie extrinsèque	61
III.B.2	La voie intrinsèque.....	61
III.B.2.a	La famille Bcl-2 : des régulateurs de l'apoptose.....	61
III.B.2.a.1	Les protéines anti-apoptotiques cytoplasmiques.....	61
III.B.2.a.2	Les protéines pro-apoptotiques à domaine BH3 seulement	62
III.B.2.b	Rôle de la mitochondrie	63
III.B.2.c	Lien entre l'apoptose intrinsèque et extrinsèque	64

III.B.3	Les caspases comme exécuteurs de l'apoptose.....	64
III.B.3.a	Structure et activation des caspases	64
III.B.3.b	Les substrats des caspases	65
III.B.4	Les autres molécules impliquées dans l'apoptose	66
III.B.5	La protéine p53	67
III.B.6	Les modifications morphologiques d'une cellule apoptotique.....	67
III.B.7	Les pathologies associées à un défaut ou à un excès d'apoptose	68
III.C.	La nécrose.....	69
III.C.1	Les modifications morphologiques d'une cellule nécrotique	70
III.C.2	La nécrose n'est pas qu'une mort accidentelle	70
III.C.3	La nécrose non programmée	71
III.C.3.a	La nécrose « secondaire »	71
III.C.3.b	La nécroptose ou nécrose-like	71
III.D.	La sénescence.....	73
III.D.1	Sénescence répliquative.....	73
III.D.2	Sénescence accéléré	74
III.D.3	Les voies de signalisation	74
III.D.3.a	Les protéines CDKI (Cyclin Dependant Kinase Inhibitor).....	74
III.D.3.b	Les protéines Rb et p53.....	75
III.D.3.c	Rôle des ROS intracellulaires	76
III.D.4	Les modifications morphologiques et biochimiques de la cellule sénescence	77
III.D.5	Les pathologies associées à la sénescence	78
III.D.6	Un paradoxe entre anti et pro-tumoral	79
III.E.	L'Autophagie.....	80
III.E.1	La dégradation par les lysosomes	80
III.E.2	Les différents types d'autophagies	80
	• La micro autophagie	81
	• L'autophagie dépendante des chaperonnes	81
	• La macro autophagie	82
III.E.3	L'autophagie ou macroautophagie	82
III.E.3.a	Formation de l'autophagosome	82
III.E.3.b	Initiation de l'autophagie par ULK1	83
III.E.3.c	La nucléation régulée par le complexe Bécline-1/ATG7	85
III.E.3.d	L'élongation du phagophore régulée par deux systèmes	85
III.E.3.d.1	Le système ATG12-ATG5.....	86
III.E.3.d.2	Le système LC3B	86
III.E.3.e	La fusion entre l'autophagosome et le lysosome	86
III.E.4	L'Autophagie est-elle un mécanisme de mort ?	87

III.E.5	Les pathologies associées à un défaut d'autophagie	88
III.E.6	Autophagie et les morts cellulaires.....	89
III.E.6.a	Les liens entre l'apoptose et l'autophagie	89
III.E.6.b	Les liens entre l'autophagie et la sénescence	91
III.F.	Morts cellulaires et réponse aux ITK	92
OBJECTIFS		94
RÉSULTATS.....		98
I. RÉSULTATS : PARTIE 1.....		100
Comment meurt une cellule de LMC en réponse aux ITK ?		100
La sénescence induite par l'imatinib dans les K562 est potentialisée par l'inhibition des caspases de façon dépendante de l'autophagie.....		100
I.A.	Introduction.....	100
I.B.	Article 1	103
I.C.	Conclusion	133
II. RÉSULTATS : PARTIE 2.....		134
Surexpression de Bcr-Abl dans la résistance au dasatinib : un modèle d'étude de la hiérarchie entre l'apoptose et la sénescence induite par l'oncogène Bcr-Abl (OIS).....		134
II.A.	Présentation du modèle	134
II.B.	Résultats	138
II.C.	Conclusion	144
III. RÉSULTATS: PARTIE 3		147
Peut-on contrecarrer les résistances aux ITK par des morts non apoptotiques ?		147
Acide mycophénolique, un agent capable de dépasser les résistances aux ITK par la mort apoptotique ou par la sénescence like des cellules résistantes de LMC.....		147
III.A.	Indroduction	147
III.B.	Article 2	150
III.C.	Conclusion	178
CONCLUSION ET DISCUSSION		181
I. DISCUSSION		182
I.A.	Comment meure une cellule leucémique en réponse aux ITK?	183
I.A.1	La sénescence, une mort secondaire ?	183

I.A.2	Hiérarchie et/ou coopération entre l'apoptose, la sénescence et l'autophagie ?	184
I.B.	Quelles morts cellulaires pour contourner les résistances aux ITK ?	187
I.B.1	Contourner la résistance aux ITK par des morts non apoptotiques	188
I.B.2	Une dualité entre l'apoptose et la sénescence.....	189
I.C.	La sénescence, une CICD prometteuse contre le cancer ?	190
I.C.1	Le rôle contradictoire de la sénescence : anti-tumoral ou pro-tumoral.....	190
I.C.2	Similarité entre un état sénescence et quiescence	191
II.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	192
	RÉFÉRENCES.....	194
	ANNEXES	233
I.	Annexe 1.....	233
	Article : Quantitative phosphoproteomics revealed interplay between Syk and Lyn in the resistance to nilotinib in chronic myeloid leukemia cells. Gioia R, Leroy C, Drullion C, Lagarde V, Etienne G, Dulucq S, Lippert E, Roche S, Mahon FX, Pasquet JM. Blood. 2011. Aug 25;118(8):2211-21.	233
II.	Annexe 2.....	233
	Article soumis et en préparation	233
	Communications orales et posters	233

REMERCIEMENTS

Remerciements

Voilà, trois ans déjà et me voici à quelques mètres de la ligne d'arrivée. Cette thèse a été pour moi, une aventure très enrichissante tant au niveau scientifique qu'humain. Une aventure avec des embûches mais également de très bons moments.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir accepté d'être présents aujourd'hui pour juger de mon travail de thèse.

Je remercie le **Pr. Vincent Praloran** d'avoir accepté de présider mon jury et les **Drs. Patrick Auberger** et **Véronique Maguer-Satta** pour tout le temps consacré à la lecture de ma thèse.

En premier lieu, je souhaite remercier le **Pr. De Verneuil** de m'avoir accueilli au sein de son unité U1035.

Je voudrais également remercier tous les membres du village des schtroumfs faisant partie de l'équipe LHLCT dirigée par le **Pr. François-Xavier Mahon** (*alias le grand schtroumf*) que je remercie pour m'avoir donné la chance de réaliser cette thèse au sein de son équipe et d'avoir accepté que j'initie ce projet sur les morts cellulaires.

Jean Max (*alias le schtroumf blessé*), les mots ne seront pas assez forts pour témoigner de ma profonde reconnaissance. Je te remercie de l'œil bienveillant que tu as eu sur moi depuis le premier jour. Tu as su me guider et me soutenir dans mes moments de grands doutes et tu sais ô combien ils ont été nombreux ! J'espère avoir réussi, en trois ans, à hériter de ta force de caractère et de ta rigueur. Malgré mon caractère parfois un peu trop brut, ta patience, ton soutien et ta confiance n'ont jamais failli alors je n'ai qu'un mot à dire : Merci !

Valérie (*alias schtroumf sportif ou maman*), tu es là depuis mes débuts je te remercie de ton soutien et de ta patience. Malgré tes « ça me saoule » que j'avoue m'être un peu accaparés avec le temps, ta sérénité et ton calme sont deux piliers essentiels à l'équipe. Je te remercie pour ton temps et tes relectures pendant l'écriture de cette thèse.

Je n'oublie pas mes collègues et amis de thèse grâce à qui je ne me suis jamais sentie seule :

Marina (*alias schtroumf boudeur*), un grand merci de m'avoir hébergée pendant mes premiers mois de thèse, je sais que ça n'a pas toujours été facile. Depuis 3 ans nous sommes dans le même wagonmission accomplie !! Merci pour ton franc parlé, la grande générosité qui se cache derrière ton fort caractère (on sait toutes les deux que tu as un vrai cœur d'artichaut) et ton soutien depuis tout ce temps.

Kelly (*alias schtroumf qui rit*) toujours positive en toutes circonstances, ton humour et ta gentillesse font de toi une personne que j'apprécie tout particulièrement. Merci encore pour ton soutien.

Romain (*alias schtroumf qui est toujours désigné comme volontaire pour les missions dont on risque de ne pas revenir*), mon cher collègue de bureau. Malgré nos petits différents sur la température optimale du bureau, j'ai apprécié nos trois ans passés face à face. Merci pour ton soutien, pour tes conseils et pour toutes nos discussions scientifiques et les autres.

Pierre-Yves, notre seul médecin parmi la « clique », merci pour ton soutien et ton humour. Ta solidarité pour me rejoindre dans le groupe des « rien ne marche » m'a fait me sentir bien moins seule.

Yann je te souhaite bon courage pour la suite, vive les iPS ! **Marie**, copine de cheveux courts, bonne chance pour ces prochains mois.

Un grand merci aux deux STIM de l'équipe :

Aude (*alias schtroumf amoureux*) merci pour ton soutien. C'est fou, je ne pensais pas qu'une même personne pouvait être à la fois une miss bisounours, miss râleuse et miss panique, alors chapeau !

Séverine, ton arrivée a été une belle surprise, tu es une personne entière un brin rebelle. Ton dynamisme et ta bonne humeur ont été pour moi une bouffée d'air frais. Merci de ton intérêt et du temps passé à lire ma thèse alors que rien ne t'y obligeait.

Je remercie les autres membres de l'équipe :

Valérie, **Bruno** (*alias schtroumf étonné*), **Béatrice** (*alias schtroumf tordu*), **Francis** (*alias schtroumf penseur*), **Eric** (*alias schtroumf grognon*), **Stéphanie** (*alias schtroumfette*), **Stéphane** (*alias schtroumf costaud*), **Cloclo** (*alias schtroumf bavard*), **Aline**, **Alice**, **Mag**, **Véronique**, **Isa**, **Cath**, **Mumu**, **Hamid**, **Johann**, **Aurélie**, **François**, **Fred**, **Manu**, **Simon**, **Miguel**, **Isabelle** ... Ainsi que tous les autres.

*Je voudrais remercier **mes amis** pour leur présence et leur soutien :*

A mes amis de longue date, pour leur soutien et les soirées passées à se remémorer tous nos vieux souvenirs : **Axelle**, **Jean**, **Arno**, **Flo**, **Pierre**, et ma petite caro qui se reconnaîtra.

A mes amis de moins longue date merci de votre soutien : **Sylvaine**, **Diana** pour m'avoir soutenue et encouragée, **Johann** pour avoir été pendant plusieurs années présents malgré mes sautes d'humeur. Je voulais aussi remercier **Benoit**, je me souviendrais longtemps de notre premier café qui a mis son temps à arriver mais qui nous a permis de devenir véritablement amis. Nos discussions et nos fous rires m'ont véritablement permis de m'évader en cette fin de thèse, encore merci.

*Pour finir je remercie **ma famille** sans laquelle je ne serais pas là aujourd'hui :*

Mes parents qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Vous m'avez toujours guidée et poussée dans les étapes de ma vie et je sais que ça n'a pas toujours été facile. Merci de votre soutien de tous les jours et de la confiance que vous me portez. Je vous remercie pour tout. Merci à mes **grands parents** qui auraient aimé être ici pour voir leur petite fille soutenir ce long travail.

Merci à **mes sœurs et beaux-frères** : à Kris et Eric pour vos nombreuses corrections d'anglais et votre accueil lors de mes séjours parisiens, à Domi et Roman, vous étiez il n'y a pas encore si longtemps à ma place, merci pour votre soutien, vos conseils et pour votre écoute dans mes moments de doute. Je n'oublie pas ma petite nièce Margo qui a été source de tendresse.

Enfin à Laura, en quelque sorte ma moitié, un très grand merci pour ta patience, ta joie de vivre et nos moments à deux à vider notre sac chacune son tour ou en même temps d'ailleurs.

À Paul, malgré la distance, tu as su être une épaule sur laquelle j'ai pu me reposer et m'évader. Je te remercie du regard que tu portes sur moi et de ta confiance.

Un dernier merci, et non des moindres à la **Ligue contre le cancer**, sans qui cette thèse n'aurait jamais vu le jour. Continuez à mener ce beau combat qu'est la lutte contre le cancer.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Abréviations

3-MA	3-Méthyl-Adenine
Abl	Abelson
AGP	Acide Glucophorine
AIF	Apoptosis Inducing Factor
APAF-1	Apoptosis Porotease-Activating
ASK1	Apoptosis Signal Inducing Kinase 1
ATG	Autophagy related Gene
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	ATM and Rad3-related
Bcl-2	B Cell Lymphoma-2
BRC	Breakpoint Cluster Region
BFU	Burst Forming Unit
BH	Bcl-2 Homology Domain
CDK	Cyclin-dependent kinase
CDKI	Cyclin-Dependant Kinase Inhibitor
CFU	Colony Forming Unit
CMA	Chaperone-Mediated Autophagy
CSH	Cellule Souche Hématopoïétique
Cyc	Cyclin
DD	Death Domain
DISC	Death Inducing Signaling Complex
DNA-PK	DNA dependent protein kinase
EPO	Erythropoïétine
FADD	Fas Associated Death Domain
FISH	Hybridation in situ fluorescente
FITC	Isothyocyanate de fluoréscéine
FLIP	Flice-Like Inhibitory Protein
FoxO3a	Forkhead box O3a
GAP	GTPases-activating protein
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GIST	Growth Intestinal Stromal Tumor
GTP	Guanosine Triphosphate
HDAC	Histone deacetylase
HIRA	Histone Repression A
HR	Homologous recombinaison
HSP	Heat Shock Protein
HTR	Human Telomerase RNA
IAP	Inhibitor of Apoptosis Proteins
IMPDH	Inosine MonosPhospate DésHydrogénase
INF	Interferon
JAK	Janus Kinase
KO	Knock Down
LAM	Leucémie Aiguë Myéloide

LAMP2A Lysosome Associated Membrane Protéine 2A

LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LMC	Leucémie Myéloïde Chronique
MEC	Matrice Extra Cellulaire
MPA	Mycophénolic Acid
NFKB	Nuclear Factor kappa-B
NHEJ	Non Homologous End-Joining
LAL	Leucémie Aiguë Lymphoïde
NQO2	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 2
OCT	Organic Cation Transporter
OIS	Oncogene Induced Senescence
PCD	Program Cell Death
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
Ph	Philadelphie
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PTP	Pore Transition Permeability
RCC	Réponse Cytogénétique Complète
RE	Reticulum Endoplasmique
RHC	Réponse Hématologique Complète
RIP	Receptor Interacting Protein
RMC	Réponse Moléculaire complète
ROS	Reactive Oxygen Species
SA-β-Gal	Senescence Associated Beta Galactosidase
SAHF	Senescence Associated Heterochromatin Foci
SCF	Stem Cell Factor
SEN	Signal Exportation Nucléaire
SLN	Signal de Localisation Nucléaire
SMD	Syndrome Myélodysplasique
SOS	Son Of Sevenless
TGF	Tumor Growth Factor
TK	Tyrosine Kinase
TNF	Tumor Necrosis Factor
TPO	Thrombopoïétine
TRAIL	TNF-Related Apoptosis Inducing
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Table des figures et des tableaux

<i>Figure 1 : Schéma de l'hématopoïèse représentant les différents stades de formation des cellules sanguines à partir de la cellule souche hématopoïétique.</i>	<i>12</i>
<i>Tableau 1 : Bilan des principaux facteurs de croissance régulant positivement l'hématopoïèse.</i>	<i>15</i>
<i>Figure 2 : Schéma de la régulation de l'Hématopoïèse par les facteurs de croissance.</i>	<i>16</i>
<i>Tableau 2 : Bilan des principaux facteurs de croissance régulant négativement l'hématopoïèse.</i>	<i>17</i>
<i>Figure 3 : Schéma non exhaustif de la régulation de l'hématopoïèse par des facteurs de transcription.</i>	<i>19</i>
<i>Figure 4 : Le chromosome Philadelphie.....</i>	<i>20</i>
<i>Figure 5 : Schéma de l'évolution de la LMC.....</i>	<i>21</i>
<i>Figure 6 : Représentation schématique des points de cassure entre Bcr et Abl conduisant aux différentes protéines de fusion.....</i>	<i>22</i>
<i>Figure 7 : Structure de la protéine Abl.....</i>	<i>23</i>
<i>Figure 8 : Changement de conformation d'Abl via le domaine SH3 et sa myristoylation</i>	<i>24</i>
<i>Figure 9 : Structure de la protéine BCR</i>	<i>26</i>
<i>Figure 10 : Structure de la protéine de fusion p210 Bcr-Abl</i>	<i>27</i>
<i>Figure 11 : Représentation de la voie de signalisation Ras induite par Bcr-Abl</i>	<i>28</i>
<i>Figure 12 : Classification des membres de la famille PI3K . Schéma des structures régulatrices et catalytiques des PI3K.</i>	<i>30</i>
<i>Figure 13 : Représentation de la voie de signalisation PI3K/AKT induite par Bcr-Abl</i>	<i>31</i>
<i>Figure 14 : Activation de la voie JAK/STAT¹.....</i>	<i>32</i>
<i>Figure 15 : Représentation de la régulation des gènes cibles de STAT</i>	<i>34</i>
<i>Figure 16 : Schéma de la balance entre les protéines de la famille Bcl-2 dans la régulation de l'apoptose.</i>	<i>36</i>
<i>Figure 17 : Schéma de l'activation de NFκB induite par Bcr-Abl</i>	<i>37</i>
<i>Figure 18 : Représentation de la voie anti-apoptotique Hsp70 induite par Bcr-Abl.....</i>	<i>38</i>
<i>Figure 19 : Schéma de la régulation du cycle cellulaire par les CDK et CDKI.</i>	<i>40</i>
<i>Figure 20 : Schéma des voies de signalisation activées par les intégrines</i>	<i>41</i>
<i>Tableau 3 : Comparaison de la moyenne des réponses hématologique, cytogénétique et moléculaire ainsi que de la survie des patients après différents traitements.</i>	<i>45</i>
<i>Figure 21 : Interaction entre l'imatinib et le domaine kinase de Bcr-Abl.</i>	<i>46</i>
<i>Tableau 4 : Réponse des patients sous imatinib après 12 mois ou 60 mois de traitement d'après l'essai IRIS.</i>	<i>47</i>

<i>Figure 22: Valeurs des IC50 du, imatinib, dasatinib et nilotinib en fonction des différentes mutations de Bcr-Abl dans les cellules Ba/F3 transfectées.</i>	50
<i>Figure 23 : Bilan des différentes causes de résistances secondaires à l'imatinib d'après¹.</i>	52
<i>Figure 24 : Localisation des différentes mutations sur Bcr-Abl associées à une résistance à l'imatinib. La hauteur indique la fréquence des mutations.</i>	53
<i>Figure 25: Bilan des différentes morts cellulaires d'après la classification de l'ECDO</i>	59
<i>Tableau 5 : Exemples de morts cellulaires en fonction des paramètres morphologiques et biochimiques.</i>	59
<i>Figure 26 : Schématisation des trois voies conduisant à l'apoptose.</i>	60
<i>Figure 27 : Schéma de la structure des protéines de la famille Bcl-2.</i>	62
<i>Figure 28 : Structure des caspases des groupes I, II et III.</i>	65
<i>Tableau 6 : Liste non exhaustive des substrats des caspases effectrices</i>	66
<i>Figure 29: Les grandes étapes du changement morphologique d'une cellule apoptotique.</i>	68
<i>Tableau 7 : Pathologies liées à un défaut ou à un excès d'apoptose.</i>	69
<i>Figure 30 : Les grandes étapes du changement morphologique d'une cellule nécrotique.</i>	70
<i>Figure 31 : Schéma et bilan des mécanismes moléculaires connus lors de la nécroptose.</i>	72
<i>Figure 32 : Hypothèse de la cascade d'évènements impliqués dans la modification morphologique de la cellule au cours de la nécroptose</i>	73
<i>Figure 33: Schéma des voies de signalisation connues dans la sénescence induite par les oncogènes</i>	76
<i>Figure 34 : Schéma des différents types d'autophagies d'après G.Rebboah sur le site Onco-Endocrinologie Nucléaire.</i>	81
<i>Figure 35 : Schéma du mécanisme d'autophagie.</i>	83
<i>Figure 36: Régulation de l'initiation de l'autophagie par le complexe ULK1 dépendant de mTORC1</i>	84
<i>Figure 37 : Régulation de la nucléation du phagophore par les deux systèmes conjugués aux ubiquitine like Atg5/Atg12 et LC3B.</i>	86
<i>Figure 38: Exemple de voies de signalisations impliquées à la fois dans l'apoptose et l'autophagie</i>	90

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I. La leucémie myéloïde chronique

La Leucémie Myéloïde Chronique (LMC) est une hémopathie maligne (ou cancer du sang) appartenant au groupe des syndromes myéloprolifératifs. Elle touche 1 à 2 / 10⁵ personnes par an et représente 15% des leucémies. Elle atteint principalement les adultes, les enfants représentant seulement 10% des LMC. Dans la LMC, la transformation de la cellule souche s'accompagne d'une hyperplasie médullaire de la lignée granulocytaire, ce qui engendre une hyperleucocytose (augmentation des granulocytes dans le sang). Les phases initiales de la maladie sont asymptomatiques, cependant les symptômes tels que la splénomégalie apparaissent avec la progression de la maladie. Jusqu'à présent, aucune cause environnementale ou génétique n'a été tenue pour responsable de la pathologie.

I.A. Hématopoïèse normale

I.A.1 Définition

L'hématopoïèse est un ensemble de mécanismes physiologiques ordonnés permettant de produire les cellules sanguines, les renouvelant ainsi continuellement de façon régulée (érythrocytes, granulocytes, monocytes, lymphocytes, thrombocytes) à travers des étapes de prolifération et de différenciation (Figure 1).

L'hématopoïèse, chez l'homme, débute au niveau du tissu conjonctif embryonnaire jusqu'au 2^{ème} mois, puis se retrouve au niveau du foie fœtal et devient médullaire à partir du 4^{ème} mois. Après la naissance, le siège de l'hématopoïèse est essentiellement dans la moelle osseuse.

L'Homme produit environ 10¹³ cellules hématopoïétiques par jour. Cette forte production est assurée par une petite population de la moelle osseuse dite les « cellules souches hématopoïétiques ». Cette production de cellules sanguines est assurée par un équilibre entre

l'auto-renouvellement de la cellule souche et leur différenciation en progéniteurs conduisant aux différents précurseurs puis aux cellules sanguines matures ¹.

I.A.2 Les compartiments hématopoïétiques

Dans l'hématopoïèse, quatre compartiments cellulaires peuvent être définis : dans la moelle osseuse les cellules souches hématopoïétiques multipotentes, les progéniteurs et les précurseurs sont présents ainsi que les cellules matures qui vont passer dans le sang (Figure 1).

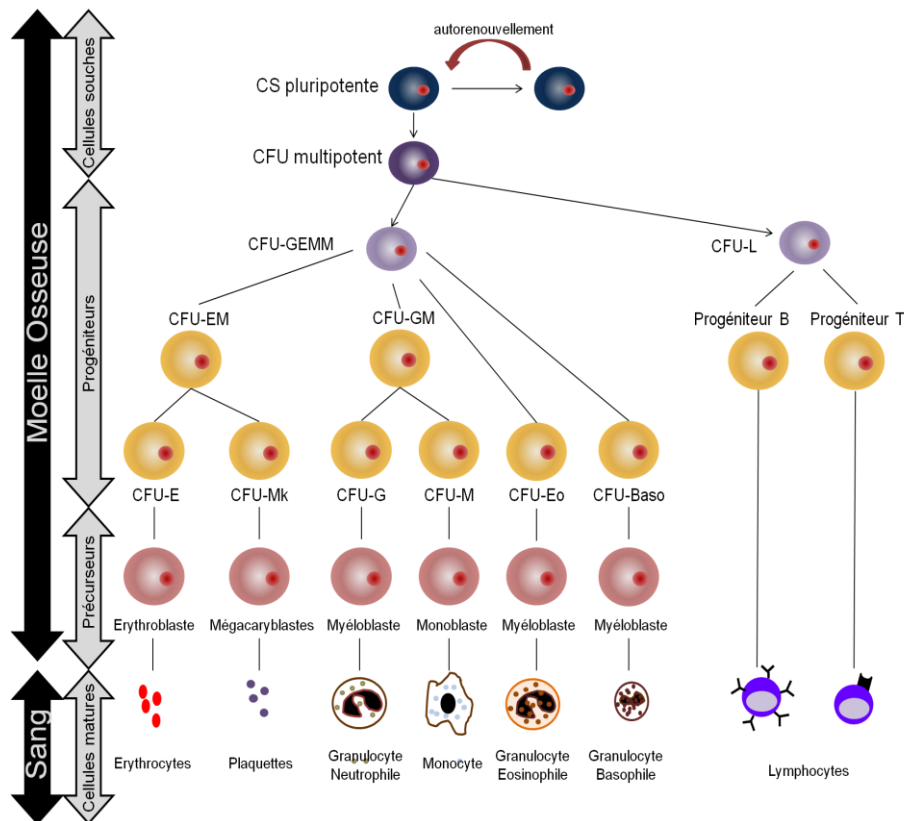


Figure 1 : Schéma de l'hématopoïèse représentant les différents stades de formation des cellules sanguines à partir de la cellule souche hématopoïétique.

Les abréviations : Cellule Souche (CS), Colony Forming Unit (CFU), Mégacaryocyte (GEMM), Granulocyte (G), Erythrocyte (E), Monocyte (M), Mégacaryocyte (Mk), Eosinophile (Eo), Lymphocyte (L).

I.A.2.a Les cellules souches hématopoïétiques

En 1961, l'équipe de Till a injecté des cellules murines de la moelle osseuse à des souris préalablement irradiées. Après plusieurs semaines, l'hématopoïèse a été reconstruite et des nodules (Colony Forming Unit) au niveau de la rate sont apparus. En reproduisant cette même expérience avec des cellules dans lesquelles des anomalies chromosomiques ont été induites, il a été montré que toutes les cellules d'une colonie provenaient d'une même cellule mère puisqu'elles présentaient les mêmes anomalies chromosomiques. Le concept de la cellule souche hématopoïétique (CSH) à la base de la production des cellules hématopoïétiques était né ^{2,3}. Les CSH bien qu'en faible quantité dans la moelle osseuse ont deux propriétés essentielles : leur capacité d'auto-renouvellement et leur caractère multipotent. L'auto-renouvellement est à l'origine du maintien du pool de CSH dans la moelle osseuse et le caractère multipotent autorise une différenciation qui engage la cellule vers un progéniteur puis une lignée particulière.

Il existe ainsi un contrôle du pool de CSH, par l'auto-renouvellement des cellules souches et leur diminution suite à un engagement dans la différenciation.

I.A.2.b Les progéniteurs

En 1966, il a été mis en évidence l'existence de progéniteurs hématopoïétiques à partir de CSH en milieu semi solide ⁴.

Les cellules engagées dans la différenciation perdent progressivement leur capacité d'auto-renouvellement et deviennent des progéniteurs lymphoïdes ou myéloïdes. Les cellules polymphocytaires vont alors pouvoir se différencier en lymphocytes T ou B alors que les progéniteurs myéloïdes communs (CFU-GEMM) peuvent tendre à une multitude de lignages CFU-GM, CFU-G, CFU-M, CFU-MK, CFU-Eo, CFU-B et CFU-E.

I.A.2.c Les précurseurs et les cellules matures

En 1990, le terme de précurseurs multipotents a vu le jour dans l'équipe de Till et MacCulloch après l'observation de la génération de différentes lignées hématopoïétiques à

partir de l'injection de cellules provenant des nodules spléniques d'un même type histologique chez la souris. Ces précurseurs multipotents ont également été observés chez l'Homme après la mise en culture sur cellules stromales⁵. Les précurseurs sont les premières cellules hématopoïétiques morphologiquement identifiables et ont perdu leur capacité à s'auto-renouveler. Ils vont se multiplier puis se différencier. Seules les cellules matures et fonctionnelles vont ensuite passer dans la circulation sanguine : polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et basophiles, hématies, plaquettes, lymphocytes et monocytes.

I.A.3 La régulation de l'hématopoïèse

I.A.3.a Le microenvironnement

Le microenvironnement constitue un milieu indispensable au maintien, à l'engagement et à la différenciation des cellules hématopoïétiques. Il est constitué de cellules stromales et d'une matrice extracellulaire (MEC). Les cellules stromales telles que les fibroblastes, les ostéoblastes, les cellules endothéliales, les adipocytes et les macrophages sont à l'origine de la sécrétion de nombreux facteurs de croissance indispensables à l'hématopoïèse.

La MEC est constituée de protéines de type collagènes, les fibronectines, les laminines, des protéoglycanes, les thrombospondines qui permettent l'adhésion des cellules hématopoïétiques.

L'interaction entre les cellules hématopoïétiques et le stroma médullaire est indispensable pour le maintien de l'auto-renouvellement et la survie des cellules hématopoïétiques. Par exemple, il est indispensable que les CSH se lient au microenvironnement *via* leur adhésion aux ostéoblastes dans la moelle osseuse pour un bon déroulement de l'hématopoïèse⁶.

I.A.3.b Les facteurs de croissance

Les facteurs de croissance sont des glycoprotéines qui agissent principalement de manière paracrine et qui sont nécessaires à la différenciation et à la survie des cellules hématopoïétiques. Compte tenu de la complexité de la régulation de l'hématopoïèse par les facteurs de transcription, je décrirai de façon simplifiée les différents facteurs de régulation.

Il existe deux grandes catégories de facteurs de croissance.

I.A.3.b.1 Les facteurs positifs de l'hématopoïèse

Les facteurs positifs se subdivisent en trois groupes (Tableau 1) :

		Facteurs de croissance	Cibles
Facteurs Positifs	Facteurs de promotion	IL6, IL-1, SCF, Flt3l, LIF	Cellules souches - ↑ nombre de cellules souches en cycle - Sensibilise aux autres facteurs de croissance
	Facteurs restreints	G-CSF (lignée granuleuse neutrophile) M-CSF (lignée monocyttaire) IL-5 (lignée granuleuse éosinophile) IL-4 (lignée granuleuse basophile) IL-6, IL-11 (lignée mégacaryocytaire) EPO (lignée érythropoïétique) TPO (mégacaryocyte) IL-7 (Lignée lymphocytaire)	Progéniteurs engagés - ↑ prolifération Précurseurs - Favorise la maturation
	Facteurs multipotents	IL-3 GM-CSF	Cellules souche immatures - Favorise la survie et la différenciation

Tableau 1 : Bilan des principaux facteurs de croissance régulant positivement l'hématopoïèse.

Les **CSF (Cell Stimulating Factor)** induisent la formation de colonies de cellules hématopoïétiques. Certains sont des facteurs multipotents, ils agissent sur les progéniteurs précoces et ne sont pas spécifiques d'un lignage (TPO, GM-CSF et IL-3) alors que d'autres ont une action plus restreinte à un lignage (Erythropoïétine, Epo). IL-3 et GM-CSF ont un rôle dans la prolifération et la survie des progéniteurs primitifs. Cependant, ils peuvent également agir sur des cellules plus tardives de l'hématopoïèse.

Il existe **des facteurs synergiques** qui agissent, en présence des CSF, sur les précurseurs hématopoïétiques et les cellules souches. IL-1, IL-6 et LIF (Leukemia Inhibitory Factor) ou encore le Stem Cell Factor (SCF) ont un rôle important dans l'entrée en cycle des cellules en présence de certains CSF ⁷.

Les facteurs restreints agissent tardivement dans l'hématopoïèse et sont spécifiques d'un lignage. L'EPO, le G-CSF, le M-CSF, l'IL-5 ou la TPO sont impliqués dans le caractère

fonctionnel des cellules matures. Cette notion de facteurs restreints reste cependant très schématique puisque la TPO peut également être impliquée dans la régulation des cellules CSH (Figure 2).

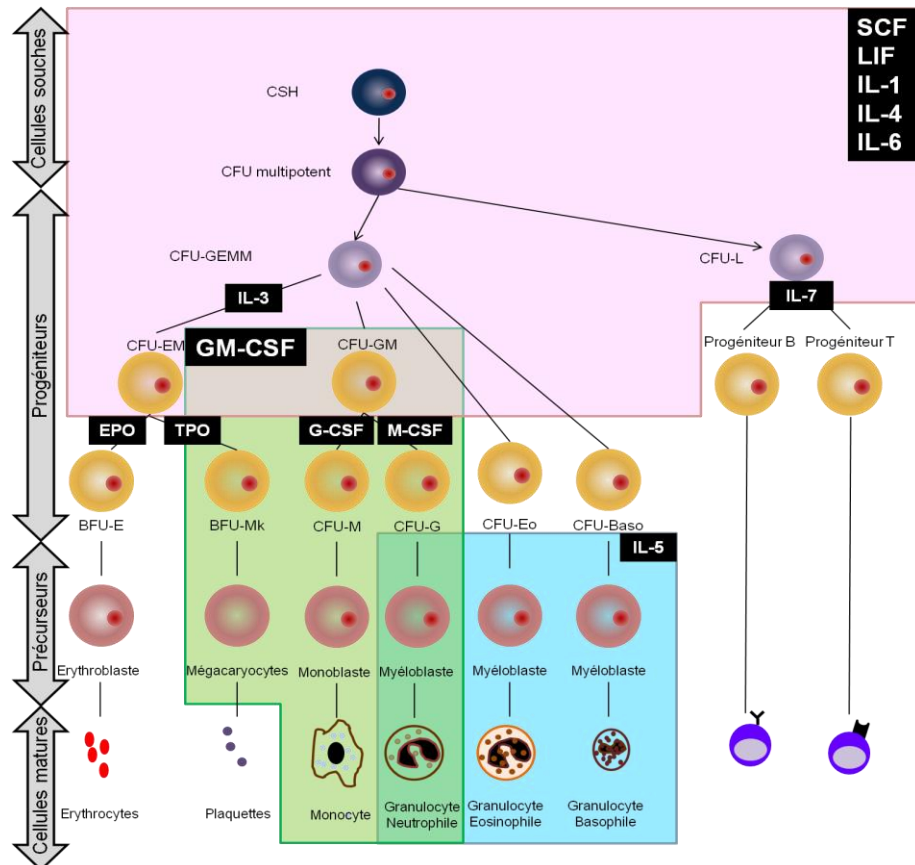


Figure 2 : Schéma de la régulation de l'Hématopoïèse par les facteurs de croissance.

Les abréviations: Granulocyte Monocyte – Colony Stimulating Factor (GM-CSF), Colony Forming Unit (CFU), Stem Cell Factor (SCF), Interleukine (IL), Erythropoïétine (EPO), Thrombopoïétine (TPO).

I.A.3.b.2 Les facteurs négatifs de l'hématopoïèse

Le TGF β

Il existe trois isoformes du facteur TGF β : TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 (Transforming Growth Factor β) chez les mammifères jouant un rôle dans la prolifération et la différenciation cellulaire au cours de l'hématopoïèse. TGF- β 1 est l'isoforme majoritairement

retrouvé au cours de l'hématopoïèse. Jusqu'à récemment, le TGF- β 1 était considéré comme un facteur exclusivement négatif de l'hématopoïèse. En effet, le TGF- β inhibe le cycle cellulaire des progéniteurs. L'inhibition de la prolifération par ce facteur pourrait s'expliquer par une inhibition de la protéine c-Myc et une induction de CDKI (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors) telle que la p21 ou la p27⁸.

La neutralisation du TGF- β 1 produit par les progéniteurs et les cellules stromales par une approche anti-sens a également permis de mettre en évidence son rôle dans le maintien de l'état quiescent des CSH *in vivo*⁹⁻¹¹.

Le TNF α

Le TNF α (Tumor Necrosis Factor α) est un facteur de croissance non hématopoïétique synthétisé par les monocytes et les lymphocytes T. Il a un rôle bidirectionnel en fonction des facteurs de croissance présents. *In vivo*, il inhibe l'érythropoïèse et stimule la myélopoïèse alors qu'*in vitro*, associé à d'autres facteurs, il induit la croissance des progéniteurs CD34⁺. Il a récemment été décrit que le TNF α inhibait la différenciation érythropoïétique *via* une modification de la balance entre les facteurs de transcription GATA1 et GATA2 indispensables au bon déroulement de l'érythropoïèse. TNF α induit l'expression du facteur de transcription PU-1 inactivant GATA1¹² (Tableau 2).

	Facteurs de croissance	Cibles
Facteurs Négatifs	TGF- β 1	- ↓ Prolifération des progéniteurs précoces <i>in vitro</i> - Maintient l'état quiescent des cellules souche <i>in vivo</i>
	TNF- α	- Inhibe la différenciation érythropoïétique

Tableau 2 : Bilan des principaux facteurs de croissance régulant négativement l'hématopoïèse.

Autres facteurs négatifs

Il existe d'autres inhibiteurs dont le rôle est moins bien connu. Par exemple l'**AcSDKP** (le tétrapeptide Acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro) a été isolé à partir de moelle osseuse de veau fœtal¹³

puis synthétisé sous le nom de séraspanide. Il inhibe la synthèse de l'ADN des progéniteurs (CFU-GM, CFU-E et BFU-E) murins et humains ^{14,15}. Il est capable de bloquer le cycle des cellules hématopoïétiques humaines normales mais n'a aucun effet sur les progéniteurs de LMC. Cependant une corrélation a pu être établie entre le niveau de Ac SDKP et la progression des LAM ^{16,17}.

La **MIP1 α** (Macrophage Inflammatory Protein 1 α) est une glycoprotéine de 8 kDa produite par les macrophages. Son rôle est complexe car elle est capable de bloquer la mise en cycle des progéniteurs immatures (CFU-GEMM, BFU-E, CFU-GM) et au contraire de stimuler les CFU-GM matures ^{18,19}.

Cependant, ces deux inhibiteurs de l'hématopoïèse ne semblent pas avoir d'effet sur le cycle des progéniteurs de LMC ²⁰.

De même, le rôle du **VEGF** (Vascular Endothelial Growth Factor) n'est pas clairement établi. Il est possible qu'il agisse au niveau des CFU-GM et CFU-E bien que cela reste à confirmer. Malgré tout, le VEGF est capable d'inhiber l'apoptose induite après irradiation des CSH ²¹. Le rôle de certains facteurs de croissance négatifs reste encore à déterminer.

I.A.3.c La Régulation génétique

De nombreux facteurs de transcription interviennent lors de l'hématopoïèse primitive ou définitive. Certains ont un rôle important dans le renouvellement de la cellule souche hématopoïétique alors que d'autres jouent un rôle indispensable dans la différenciation des différents lignages. De façon non exhaustive, l'hématopoïèse primitive au niveau de l'hémangioblaste est régulée par le « Stem Cell Leukemia hematopoietic transcription factor » (SCL), GATA-2, Lmo-2 et AML-1. L'auto-renouvellement des cellules souches est régulé par Ikaros, HOX B4, GATA-2 alors que la différenciation se fait *via* une diversité de facteurs comme par exemple le facteur PU-1 codé par le gène suppresseur de tumeurs Spi-1 qui est indispensable pour l'engagement myéloïde et pour les lymphocytes B ²² (Figure3).

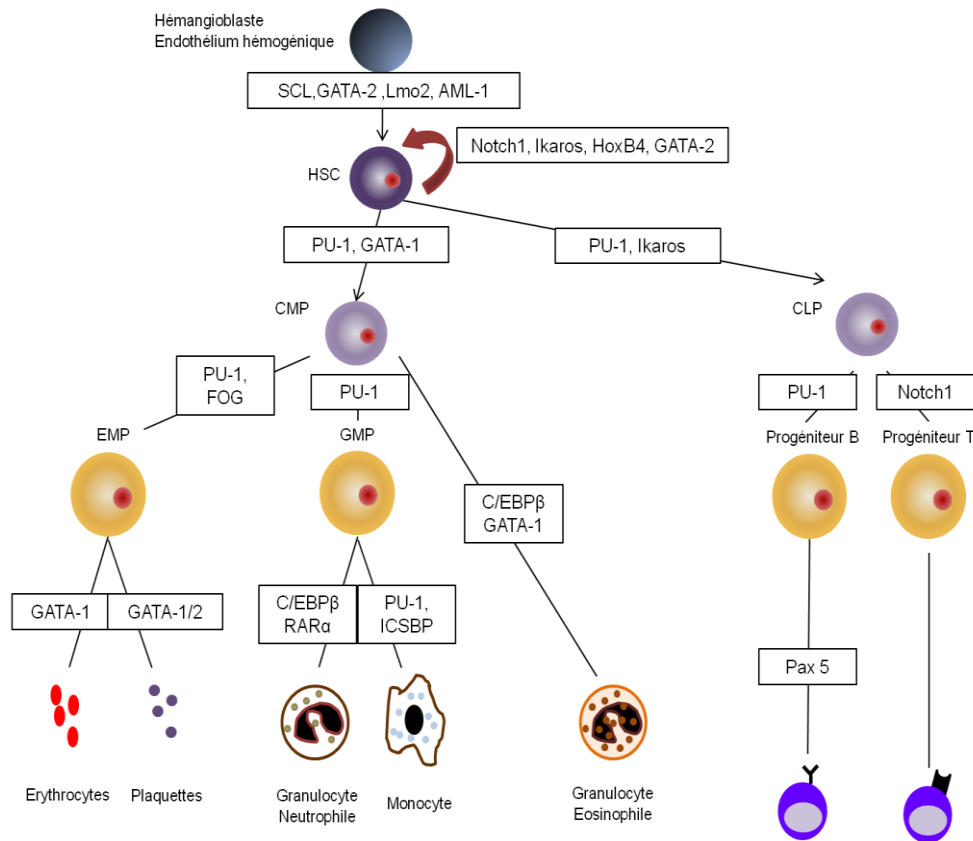


Figure 3 : Schéma non exhaustif de la régulation de l'hématopoïèse par des facteurs de transcription.

I.B. Hématopoïèse leucémique dans la LMC

Les hémopathies malignes sont dues à une prolifération clonale des cellules hématopoïétiques médullaires. Ces hémopathies touchent les cellules au niveau de la moelle osseuse ou au niveau des ganglions lymphatiques^{23,24}.

Il existe différentes catégories d'hémopathies :

- **Les Syndromes Myéloprolifératifs (SMP)** pour lesquels la prolifération des cellules hématopoïétiques a lieu sans blocage de la maturation. Certains SMP touchent les globules rouges (Polyglobulie de Vaquez), les lignées granulaires (Leucémie Myéloïde Chronique, splénomégalie), ou les plaquettes (thrombocytémie essentielle).

- **Les Leucémies Aiguës Myéloïdes (LAM) ou Lymphoïdes (LAL)** pour lesquelles la maturation des cellules hématopoïétiques est bloquée.
- **Les Syndromes Lymphoprolifératifs Chroniques** dus à une accumulation des altérations de l'apoptose ou encore à des anomalies qualitatives myélodysplasiques.

I.B.1 La Leucémie Myéloïde Chronique (LMC)

La LMC fait partie des syndromes myéloprolifératifs. Elle est donc une hémopathie maligne clonale de la CSH. Cette pathologie se traduit par une hyperplasie médullaire et une hyperleucocytose. Elle est associée à une anomalie chromosomique (chromosome Philadelphie ou Ph⁺). Cette anomalie chromosomique est le résultat d'une translocation réciproque t (22q ; 9q) entre les chromosomes 9, où se situe le gène Abl, et le chromosome 22 possédant le gène Bcr. Cette translocation aboutit à un gène de fusion Bcr-Abl codant pour une protéine Bcr-Abl dont l'activité tyrosine kinase est dérégulée et suffisante pour développer une LMC. En 1960, l'équipe de Nowell a mis en évidence l'anomalie chromosome Philadelphie (Ph⁺) caractéristique de la LMC ²⁵ (Figure 4).

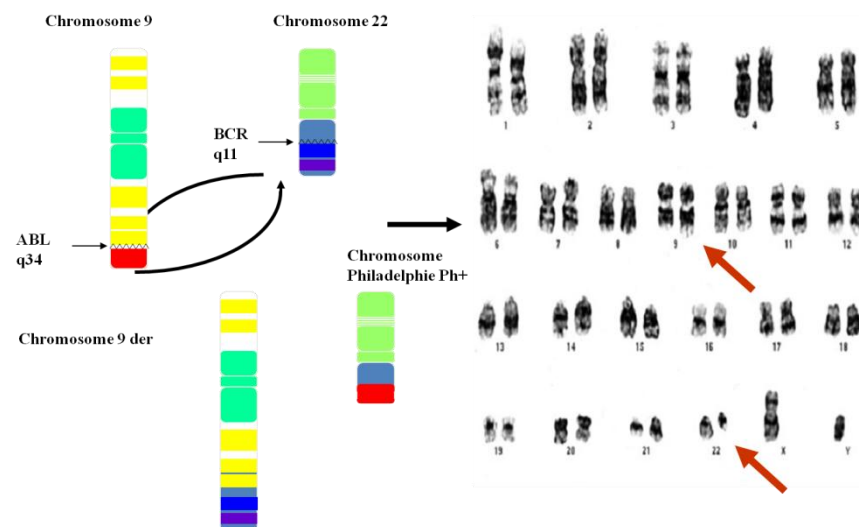


Figure 4 : Le chromosome Philadelphie, résultat d'une translocation réciproque entre les chromosomes 9 et 22.

I.B.1.a Une maladie évolutive

La LMC évolue schématiquement en trois phases si elle n'est pas traitée.^{24,26} (Figure 5).

La phase chronique, d'une durée de 3 à 5 ans, est souvent identifiée suite à une numération sanguine montrant une anomalie de la lignée granuleuse avec une hyperleucocytose et 95% de cellules granuleuses. Elle est caractérisée par une hyperplasie médullaire (cellules granuleuses, mégacaryocytaires et érythroïdes). Son diagnostic est confirmé par un caryotype dans lequel 95% des patients atteints de LMC présentent le chromosome Philadelphie.

La phase d'accélération est un stade intermédiaire mais pas toujours clairement identifiable. Elle se caractérise par une augmentation de la clonogénicité des cellules possédant le chromosome Philadelphie et une présence de 10 à 20 % de blastes dans le sang²⁷. Des anomalies additionnelles peuvent apparaître de façons isolées ou associées au chromosome Philadelphie. Parmi ces anomalies, on trouve par exemple les trisomies 8, 17, 19 et 21, une duplication du chromosome Ph, où encore plus rarement des délétions du chromosome Y. Ces anomalies entraînent souvent une résistance des cellules aux thérapeutiques²⁸.

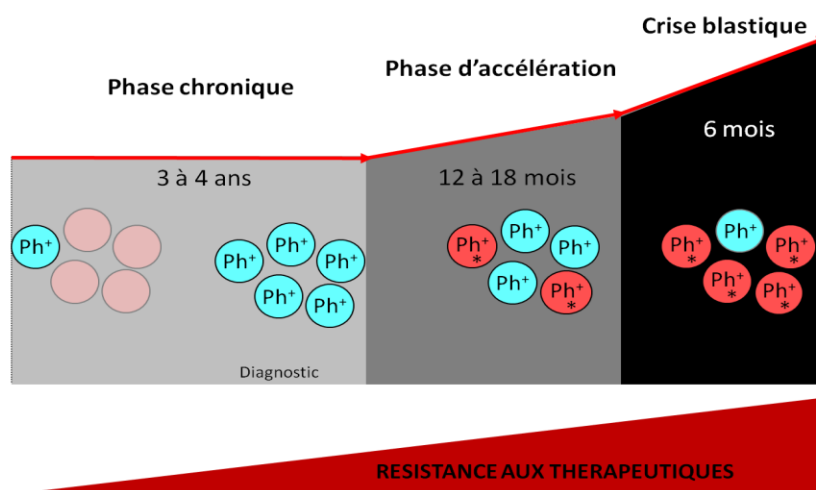


Figure 5 : Schéma de l'évolution de la LMC.

*Ph⁺ correspond au chromosome Philadelphie et * aux anomalies génétiques additionnelles.*

La phase blastique ou crise blastique est marquée par une insuffisance médullaire et un blocage de la maturation des cellules hématopoïétiques à l'origine de la présence de plus de 20% de blastes dans le sang et dans la moelle osseuse. Dans environ 60 % des cas, la crise blastique présente des caractéristiques d'une Leucémie Aiguë Myéloblastique (LAM). Dans 30% des cas, cette crise blastique est de type lymphoïde et chez seulement 10% des patients, on retrouve à la fois des myéloblastes et des lymphoblastes²⁹.

Cette phase est critique car aucune thérapeutique actuelle n'est efficace. On estime la survie d'un patient en crise blastique à 6 mois²⁹⁻³¹.

I.B.1.b Physiopathologie moléculaire

En fonction de la localisation des points de cassures sur le gène Bcr, plusieurs types de leucémies peuvent être générées selon l'oncogène transcrit : p190 Bcr-Abl, p210 Bcr-Abl ou encore p230 Bcr-Abl (Figure 6).

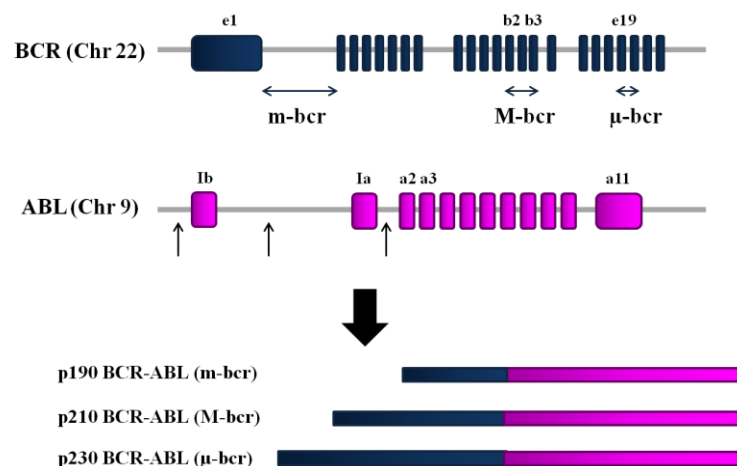


Figure 6 : Représentation schématique des points de cassure entre Bcr et Abl conduisant aux différentes protéines de fusion.

Les abréviations: Break Cluster Region (BCR), Abelson (ABL), les exons (e1, b2, b3, e19, a2, a3, a11, 1b).

La protéine **p190 Bcr-Abl** est le résultat d'une cassure dans la région « mineur » du gène bcr (m-bcr) donnant lieu à une translocation e1a2 mRNA de Bcr-Abl. Cette protéine est à l'origine de 70% des LAL Ph⁺ et de rares LAM^{32,33}.

La protéine **p210 Bcr-Abl** est le résultat d'une cassure dans la région « majeure » du gène BCR (M-Bcr) qui donne naissance à un ARNm b2a2 ou b3a2³⁴. Cette protéine est retrouvée dans 95% des LMC, 30% des LAL et plus rarement dans les LAM²⁷.

La protéine **p230 Bcr-Abl** est le produit d'un point de cassure dans la « micro » région du gène BCR (μ-bcr) donnant lieu à un ARNm e19a2. Cette fusion est retrouvée dans certains cas de leucémies chroniques à polynucléaires neutrophiles.

Ces isoformes de la protéine Bcr-Abl ont une activité TK différente à l'origine du processus tumorigène. En effet, la partie Abl reste relativement stable lors de la translocation, il semble donc que l'activité leucémogène dépende essentiellement du point de cassure dans le gène Bcr. L'oncogène p190 Bcr-Abl possède un pouvoir leucémogène plus important que les formes p210 Bcr-Abl et p230 Bcr-Abl alors que la forme p230 Bcr-Abl possède une activité TK moins importante^{35,36}.

I.B.1.b.1 ABL

Le gène ABL est composé de 11 exons conduisant à un transcrit différent en fonction du premier exon 1a ou 1b, et à deux polypeptides respectivement de 1130 et 1149 acides aminés. Abl est l'homologue de l'oncogène v-Abl porté par le virus leucémogène murin Abelson, c'est une tyrosine kinase de 145kDa ubiquitaire (Figure 7).

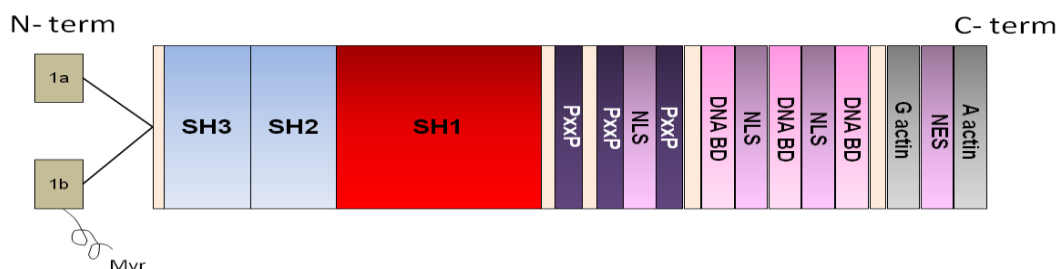


Figure 7 : Structure de la protéine Abl³⁷.

Les abréviations des différentes régions : Src-homology (SH), domaine riche en proline (PxxP), exon 1a ou 1b, myristoylation (Myr), Nuclear Localisation Signal (NLS), Nuclear Export Signal (NES), DNA Binding Domaine (DNA BD).

La **région N-terminale** de la protéine Abl présente une structure similaire aux protéines de la famille des Src kinases avec des domaines homologues (SH) possédant l'activité TK (SH1), la capacité d'interagir avec des tyrosines phosphorylées (SH2) ou des séquences riches en proline (SH3)^{38 39}. Abl est une protéine capable de s'auto-inhiber à travers son état myristoylé et *via* des interactions intramoléculaires impliquant ses domaines SH2-SH3⁴⁰.

Le domaine SH1 possède l'activité TK d'Abl avec le domaine de fixation de l'ATP et le domaine catalytique phospho-transférase⁴¹.

Le domaine SH2 est capable de fixer les tyrosines phosphorylées de protéines adaptatrices comme Crkl participant ainsi à la transmission du signal. Par exemple, l'activation de la voie PI-3-Kinase qui a un rôle important dans la capacité de transformation⁴¹.

Le domaine SH3 a un rôle inhibiteur sur l'activité d'Abl. Il stabilise Abl sous sa forme inactive par interaction avec une proline (Pro242 située entre les domaines SH1 et SH2) (Figure 8).

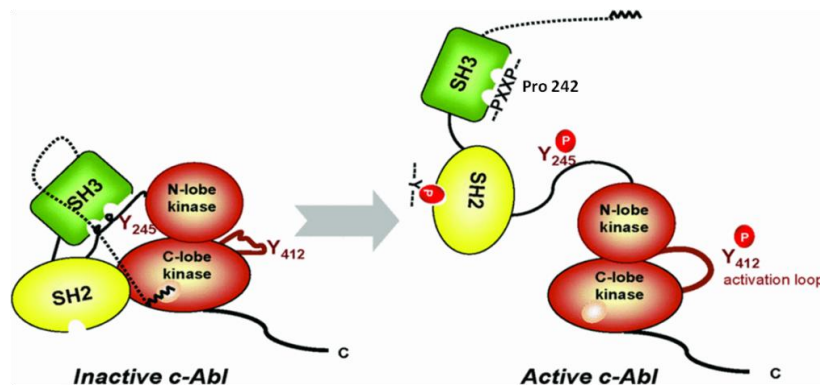


Figure 8 : Changement de conformation d'Abl via le domaine SH3 et sa myristoylation⁴².

Les abréviations : Src Homologous Domain (SH), Proline (P ou Pro), Tyrosine (Y).

Cette régulation de l'activité TK par modification de la conformation est également retrouvée dans la famille des Src kinases. Une mutation dans le domaine SH3^{43,44} ou une mutation du résidu Pro242 entraîne une augmentation de l'activité kinase d'Abl *in vivo*⁴⁵.

Le **domaine C-terminal** possède un signal d'exportation nucléaire (SEN) et trois signaux de localisation nucléaire (SLN) permettant sa localisation alternée entre le noyau et le cytoplasme, un site de liaison à l'actine et un domaine de liaison à l'ADN (DNA BD). La fonction de la protéine Abl dépend essentiellement de sa localisation nucléaire ou cytoplasmique dans la cellule ³⁷. En effet, l'exon 1b sous forme myristoylé permet une localisation membranaire d'Abl et la phosphorylation de l'exon 1a (majoritaire) entraîne une localisation nucléaire prédominante ⁴⁶.

Localisée dans le noyau, la protéine c-Abl tient un rôle essentiel dans la régulation négative du cycle cellulaire ^{47,48}. Depuis 1993, Welch et Wang, ont montré que c-Abl était capable d'interagir directement avec la protéine Rb *via* le domaine SH1 lui permettant d'être recruté sous sa forme inactive dans le complexe E2F-ADN. La formation de ce complexe va permettre un blocage du cycle cellulaire en phase G1/S. Lors d'un dommage à l'ADN, c-Abl va s'accumuler dans le noyau, activer ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) et phosphoryler la partie C-terminale de l'ARN polymérase de type II induisant une augmentation de la transcription de certains gènes ^{49 50 51}. c-Abl est également capable d'interagir avec les protéines pro-apoptotiques p53 et p73 ⁵².

Au niveau cytoplasmique, Abl active les intégrines et participe à la transduction du signal et à la réorganisation du cytosquelette ⁵³.

I.B.1.b.2 BCR

Le gène Bcr code pour une protéine kinase cytoplasmique de 160 kDa exprimée de façon ubiquitaire (Figure 9).

La **région N-terminale** possède un domaine d'activité sérine-thréonine kinase ainsi qu'un domaine d'oligomérisation de type coiled-coiled responsable de l'activité transformante de la molécule ^{54 55}. La régulation de la protéine Bcr se fait à travers la phosphorylation de résidus tyrosine. Par exemple, la phosphorylation de la Tyr177 par diverses kinases (Fes, Hck, Bcr-Abl) permet le recrutement de protéines adaptatrices *via* leur

domaine SH2 (par exemple Grb2) ⁵⁶. Au contraire la phosphorylation de la Tyr 260 inhibe l'activité kinase ⁴⁹.

La **partie centrale** de la protéine est composée d'un domaine DBL-like, homologue à la pleckstrine, qui a un rôle de stimulation de l'échange GTP-GDP par la protéine Rho-GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) ⁵⁷.

En **C-terminal**, la protéine contient un domaine GTPasique pouvant agir sur les protéines Rac stimulant l'activité NADPH oxydase dans les neutrophiles ⁵⁸.

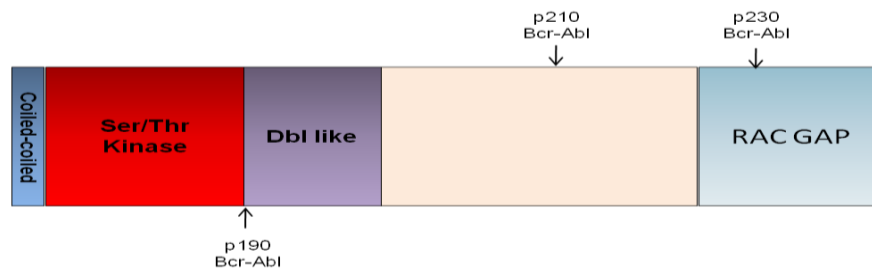


Figure 9 : Structure de la protéine BCR ³⁷.

Les abréviations : Sérine/Thréonine (Ser/Thr), RAC GTPase Activating Protein (RAC GAP).

La fonction de la protéine Bcr reste encore mal connue. Elle semble avoir un rôle important dans la transduction du signal *via* son activité GAP qui régule négativement l'activité GTPasique de p21 rac2.

I.B.1.b.3 Le rôle oncogénique de Bcr-Abl

C'est en 1990 que le rôle de la protéine p210 Bcr-Abl dans la LMC a été montré par la greffe de cellules hématopoïétiques murines possédant un rétrovirus codant pour la p210 Bcr-Abl. En effet, les souris greffées présentent un syndrome myéloprolifératif similaire à la LMC ⁵⁹. La fusion des gènes Bcr et Abl conduit à une protéine chimérique Bcr-Abl qui a perdu ses domaines de régulations négatives, exacerbant ainsi sa signalisation (Figure 10).

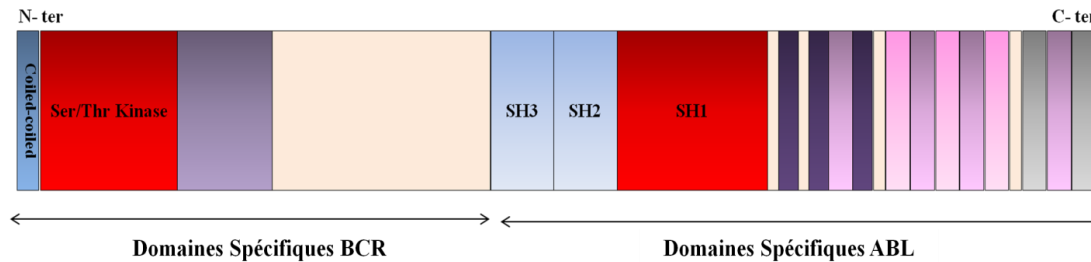


Figure 10 : Structure de la protéine de fusion p210 Bcr-Abl ³⁷.

Le domaine coiled-coiled de Bcr permet une dimérisation de l'oncogène puis une transphosphorylation dans le domaine kinase. Ainsi l'activation de Bcr-Abl ne dépend plus que de l'équilibre entre la forme monomérique et dimérique de l'oncogène.

La TK Bcr-Abl phosphoryle de nombreuses protéines : adaptatrices (CRKL, CBL, SHC, p62 DOK ou encore Grb2 ou GAB2), kinases (PI3K, Fes, Hck, Lyn) ⁶⁰, phosphatases (SHP-1, SHP-2), des protéines impliquées dans l'organisation du cytosquelette (Paxilline, Talline) et d'autres protéines (STAT5, Ras) initiant de nombreuses voies de signalisations ⁶¹. Bcr-Abl grâce à son activité tyrosine kinase dérégulée va conduire à des modifications de l'adhésion, de la prolifération et de la survie cellulaire.

I.B.1.c Voies de signalisation activées par Bcr-Abl

I.B.1.c.1 Implication de la Voie Ras

La protéine Ras appartient à la famille des petites protéines G monomériques comprenant : Kras, Hras, Wras. Elle possède une activité GTPasique et est activée dans de nombreux cancers (90% des cancers du pancréas, 50% dans les cancers du colon ou de la thyroïde, 30% dans les cancers du foie et les leucémies myéloïdes) ^{62 63}. Elle est impliquée dans la prolifération, la survie des cellules mais également dans la différenciation, l'angiogenèse et le remodelage cytosquelettique des cellules.

Suite à la phosphorylation de Bcr sur la tyrosine 177, la protéine adaptatrice Grb2 va s'associer à Bcr-Abl via son domaine SH2 ⁶⁴. Cette interaction va stimuler le facteur d'échange SOS (Son Of Sevenless, protéine de la famille des GEF) qui va modifier la conformation tridimensionnelle de la protéine Ras et permettre la stabilisation de cette

dernière sous sa forme active (Ras-GTP). Ceci permet le recrutement à la membrane et l'activation de la protéine Raf-1 (sérine/thréonine kinase). Raf-1 va alors initier les voies MEK-1 et MEK-2 puis ERK. ERK, sous sa forme phosphorylée, va se localiser dans le noyau ou cibler des facteurs de transcription comme STAT5. Cette localisation nucléaire est à l'origine d'une surexpression anormale de gènes impliqués dans la prolifération tels que c-Fos, c-Myc, c-Jun, Elk, Ets, CREB et une diminution des gènes impliqués dans le cycle cellulaire et l'apoptose (notamment Bim en induisant sa dégradation par le protéasome ou les CDKI p21 et p27)^{65 66} (Figure 11).

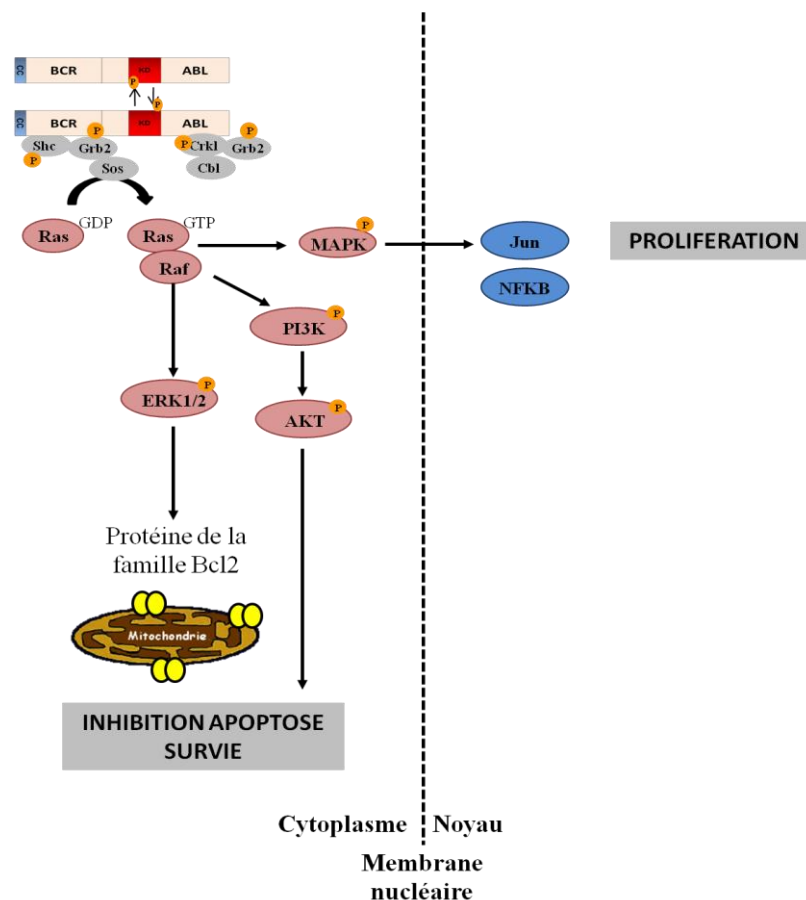


Figure 11 : Représentation de la voie de signalisation Ras induite par Bcr-Abl.

Lorsque l'on bloque les effets de la voie Ras dans des lignées cellulaires de LMC, par des stratégies ARN anti-sens ou par des dominants négatifs de Ras, les cellules cessent de

proliférer et meurent. Il a ainsi été montré que l'effet oncogénique de Bcr-Abl est dépendant de la voie Ras mais qu'il impliquait également la protéine JNK (c-Jun N-terminal kinase)⁶⁷
68.

Dans la LMC, la voie Ras est donc activée de façon constitutive par Bcr-Abl mais elle peut également être activée par la voie des tyrosine kinases JAK, les récepteurs couplés aux protéines G et les signaux calciques. Ras active à son tour la voie des MAPK et la voie PI3K
69.

I.B.1.c.2 Voie PI3K/Akt

L'activation de la voie phosphatidyl-inositol-3-kinase (PI3K) par Bcr-Abl implique deux protéines adaptatrices Crkl et Cbl dans les cellules Bcr-Abl⁺⁷⁰. En 1994, l'équipe de Ten Hoever a montré une corrélation étroite entre l'expression de Bcr-Abl et la phosphorylation de Crkl^{71,72}. Crkl est la protéine tyrosine phosphorylée majoritaire dans les neutrophiles de patients atteints de LMC⁷³. Elle peut interagir avec Bcr-Abl de façon directe par son domaine SH3 et transduire le signal en se liant à une seconde protéine adaptatrice Cbl par son domaine SH2⁷⁴. La protéine adaptatrice Cbl est également capable d'interagir directement avec Bcr-Abl par son domaine SH2 pour activer la voie Ras⁷⁵.

Les protéines adaptatrices Grb2 et Crkl sont donc indispensables pour le maintien de la prolifération des cellules Bcr-Abl ainsi que pour l'effet transformant de Bcr-Abl^{76,77 78}.

La voie PI3K est impliquée dans la prolifération, la survie, le trafic intracellulaire. La PI3K est une enzyme hétérodimérique à activité sérine/thréonine kinase. Il existe huit PI3K regroupées en 3 classes (PI3K-I, PI3K-II, PI3K-III) selon leur structure et leur régulation. Les différentes classes de PI3K catalysent la même réaction de phosphorylation, mais ont des substrats préférentiels différents. Les PI3K-IA sont des hétérodimères formés de deux sous-unités : une sous-unité catalytique (p110 α , β , δ) et une sous unité régulatrice (p85 α , β , p55 δ) activée par les tyrosine kinases. Cette classe est donc activée par l'oncogène Bcr-Abl. A noter que la classe de PI3K-IB a une sous-unité régulatrice p101 proche de la structure de p100. De plus, l'absence de domaine SH2 marque une différence fonctionnelle importante entre ces deux types de PI3K (Figure 12).

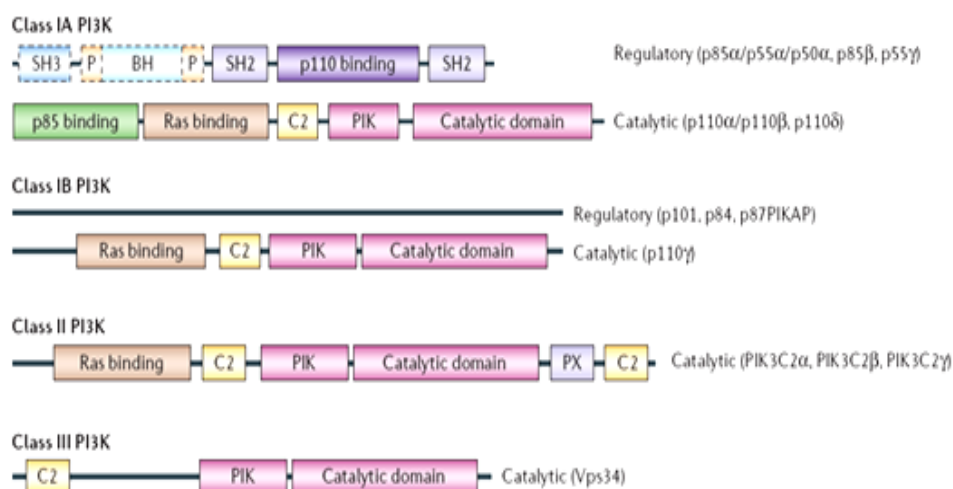


Figure 12 : Classification des membres de la famille PI3K ⁷⁹. Schéma des structures régulatrices et catalytiques des PI3K.

Les membres des classes II et III sont composés uniquement d'une sous-unité catalytique. La PI3K classe III est un homologue de la Vsp34 (vacuolar protein-sorting defective 34) initialement décrite chez *Saccharomyces cerevisiae*. Elle s'associe à une sérine/thréonine kinase p150 (homologie de Vsp15p chez la levure) pour jouer un rôle dans le trafic membranaire et vésiculaire. Elle est capable d'activer la voie mTOR et est impliquée, comme nous le verrons plus loin, dans le mécanisme d'autophagie ⁸⁰.

La structure des PI3K reflète nécessairement des fonctions différentes. Les domaines SH2 des sous-unités régulatrices de la classe IA en font d'importants médiateurs des RTK (Récepteur Tyrosine Kinase), d'où leur rôle dans la croissance, la migration et la prolifération des cellules Bcr-Abl ⁺.

La liaison de p85 à p110 contrôle aussi la stabilité et l'activité de p110 en exerçant sur lui une constante inhibition. Lorsque p110 est actif, la PI3K se localise près de la membrane et phosphoryle le PI-4,5-P₂ (PIP₂) pour générer du PI-(3,4,5)-P₃ (PIP₃). Ce PIP₃ est un véritable messenger secondaire qui sert à recruter et à activer différentes protéines exprimant un domaine homologue à la pleckstrine (domaine PH) telles que la protéine kinase B (PKB/Akt) ou certaines phospholipases C (PLCγ).

C'est sous sa forme phosphorylée que p-Crk1 recrute la PI3K lui permettant de phosphoryler à son tour le PIP2 pour produire du PIP3. Cette activité kinase peut être contrebalancée par des phosphatases PTEN (Phosphatase and Tensin homologue) et SHIP 1/2 (SH2 domain-containing Inositol 5'-Phosphatase). En aval, la sérine/thréonine kinase AKT va être recrutée *via* son domaine PH par interaction avec la PIP3 puis être activée par phosphorylation *via* PKD1 et PKD2 (phosphoinositide-dependent protein kinase) (Figure 13).

AKT possède de multiples substrats impliqués dans la résistance à l'apoptose et la prolifération. Par exemple, la phosphorylation de la protéine pro-apoptotique Bad entraîne sa séquestration dans le cytoplasme par la protéine 14-3-3. La libération de Bcl-xl au niveau de la mitochondrie permet alors une inhibition du mécanisme apoptotique⁸¹. De plus, Akt inhibe l'activation de gène pro-apoptotique (Bim) en phosphorylant le facteur de transcription FOXO3a ce qui empêche sa translocation dans le noyau⁸². Cette kinase inhibe également la sérine thréonine kinase GSK3 et mTOR^{83 84}.

Elle peut aussi activer le cycle cellulaire *via* la séquestration dans le cytoplasme de plusieurs CDKI (p21 Waf1 et p27 Kip2) sous leur forme phosphorylée⁸⁵⁻⁸⁹.

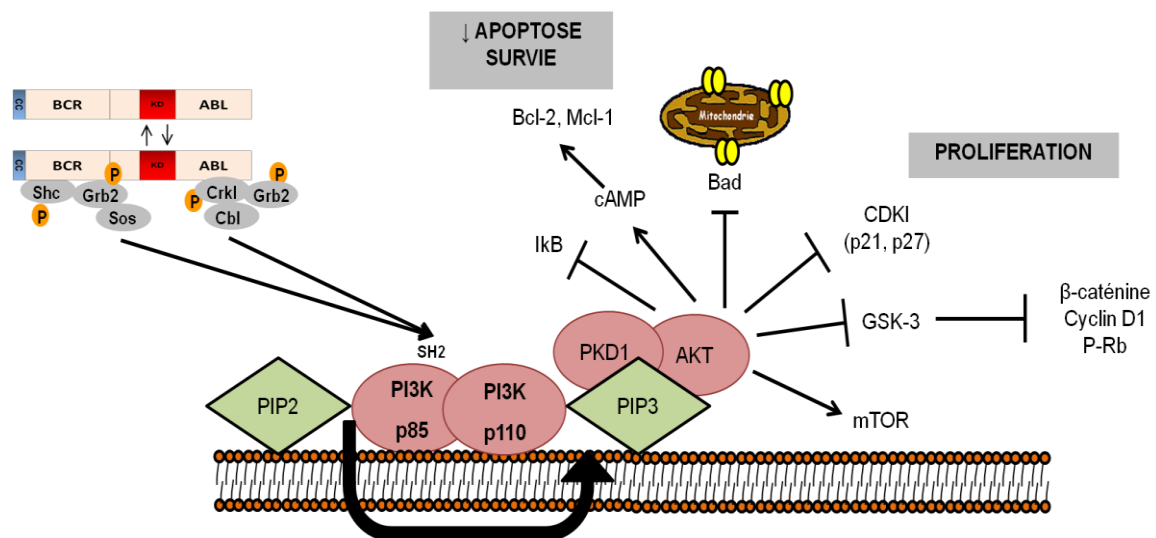


Figure 13 : Représentation de la voie de signalisation PI3K/AKT induite par Bcr-Abl.

I.B.1.c.3 Implication de la voie JAK

Les Janus tyrosine kinases (JAK) sont activées par des récepteurs aux cytokines. La fixation du ligand sur le récepteur modifie leur conformation permettant leur dimérisation et l'activation des JAK. Chez les mammifères, quatre membres de la famille des tyrosine kinases JAK ont été identifiés : JAK1, JAK2, JAK3 et Tyr 2. Elles sont toutes ubiquitaires à l'exception de JAK2 qui est retrouvée dans les cellules hématopoïétiques. Elles jouent un rôle important dans la prolifération, la différenciation, le cycle cellulaire mais également l'apoptose des cellules hématopoïétiques. Après activation du récepteur à l'érythropoïétine et sa phosphorylation sur les résidus tyrosines par JAK2, le recrutement *via* les domaines SH2 des protéines STAT, de Src kinases, de phosphatases, de protéines adaptatrices ou encore de la PI3K peut avoir lieu. Par exemple, lorsque la protéine JAK2 est activée par phosphorylation, elle recrute STAT5 sur le récepteur et le phosphoryle. Une fois phosphorylée, STAT5 se dimérise, va dans le noyau et active la transcription de gènes impliqués dans la prolifération et dans l'anti-apoptose, par exemple celui codant pour la protéine anti-apoptotique Bcl-xl⁹⁰ (Figure 14).

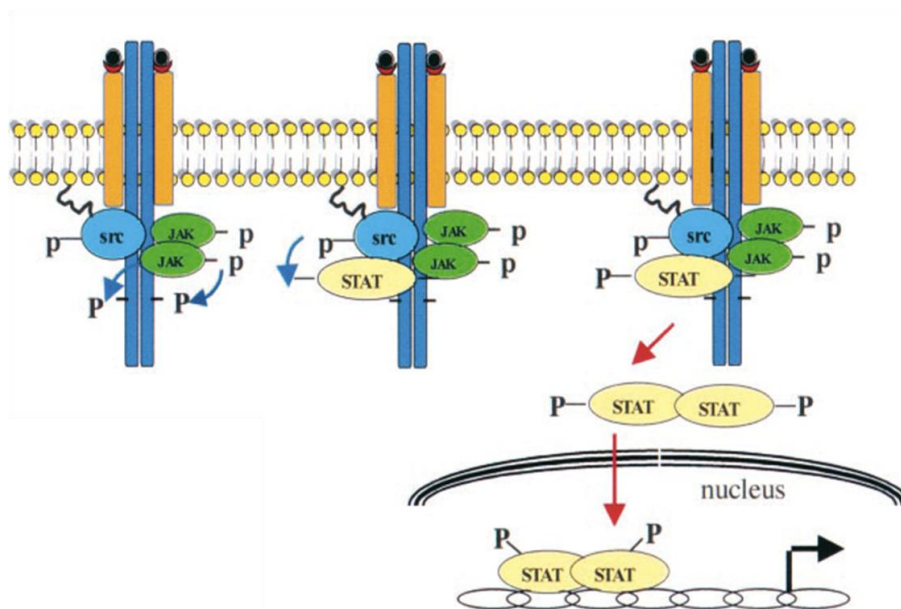


Figure 14 : Activation de la voie JAK/STAT⁹¹.

En 2001, l'équipe de Xie décrit l'importance de la phosphorylation du résidu tyrosine 107 de JAK2 dans l'effet transformant de Bcr-Abl par des approches *in vitro* et *in vivo* en utilisant des mutants de JAK2. Cet effet de JAK2 semble être indépendant de STAT5 sur l'induction de l'expression de c-Myc mais stimule l'activité de STAT3^{92 93}. Bien que JAK2 soit rarement mutée dans la LMC, elle n'en reste pas moins une cible thérapeutique intéressante au vue de son activation par Bcr-Abl.

Il existe actuellement deux types d'inhibiteurs de JAK2 : les inhibiteurs compétitifs de l'ATP et les substrats compétitifs. Dans les inhibiteurs ATP compétitifs, on retrouve par exemple la Ruxolitinib (INCB018424) inhibiteur des formes sauvage et mutée de JAK2 et de la voie JAK/STAT ou encore le XL019 capable de diminuer de 10-20% les blastes circulants. Les inhibiteurs de substrats compétitifs sont plus intéressants dans la LMC puisqu'on y retrouve le L5104, capable d'inhiber l'activité kinase de Bcr-Abl, et actuellement en phase II dans le traitement des LAL. On trouve également l'ON044580, un inhibiteur de JAK2 et de Bcr-Abl déjà testé *in vitro* et *ex vivo* sur les cellules de patients LMC. Cet inhibiteur permet d'éliminer par apoptose les cellules sensibles et résistantes à l'imatinib mais également les cellules de patients atteints de LMC en phase blastique de la maladie^{94 95}.

Il apparaît donc que les inhibiteurs de JAK2 pourraient être de bonnes stratégies thérapeutiques dans le cas où les patients sont résistants aux agents compétitifs de l'ATP comme les ITK.

I.B.1.c.4 Les protéines STAT

La famille des facteurs de transcription STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) est composée de sept protéines STAT différentes dont seules STAT 1, STAT 3 et STAT 5a et 5b sont retrouvées dans les cellules hématopoïétiques⁹⁶. Elles possèdent un domaine SH2 ainsi qu'un domaine de liaison à l'ADN. Ce sont des protéines sous forme phosphorylées inactives et localisées dans le cytoplasme. Après phosphorylation, elles se dimérisent *via* leur domaine SH2 et se localisent dans le noyau⁹⁷. Elles peuvent également être régulées par la phosphorylation d'une sérine se situant dans le domaine conservé « PSP » en C-terminal *via* les protéines ERK, p38, JNK et PKC- δ ^{98,99}.

Dans le noyau, les protéines STAT participent à l'oncogénèse en activant la transcription de différents gènes suite à leur fixation à l'ADN. Ces gènes cibles codent pour la surexpression de protéines anti-apoptotiques telles que Mcl-1, Bcl-xl ou Bcl-2 mais également pour des protéines régulatrices du cycle cellulaire : la cyclin D1 et c-Myc^{100 101 102} (Figure 15).

Dans les lignées cellulaires Bcr-Abl ou dans les cellules de patients atteints de LMC, STAT5 est constitutivement activée^{103,104,105 106}. Elle est phosphorylée directement par JAK2 mais également par Bcr-Abl et certaines Src kinases (Lyn, Hck)^{107 108} (Figure 15). Son rôle dans les leucémies a été mis en évidence par l'utilisation de dominants négatifs de STAT5 chez la souris entraînant une diminution de l'effet transformant des cellules myéloïdes Bcr-Abl. De plus, l'introduction d'une forme constitutivement active de STAT5 est capable de restaurer le pouvoir oncogénique de Bcr-Abl traduisant l'importance de la protéine STAT5 dans la leucémogénèse³⁸. STAT5a a même été impliquée dans la résistance à l'imatinib dans la LMC.

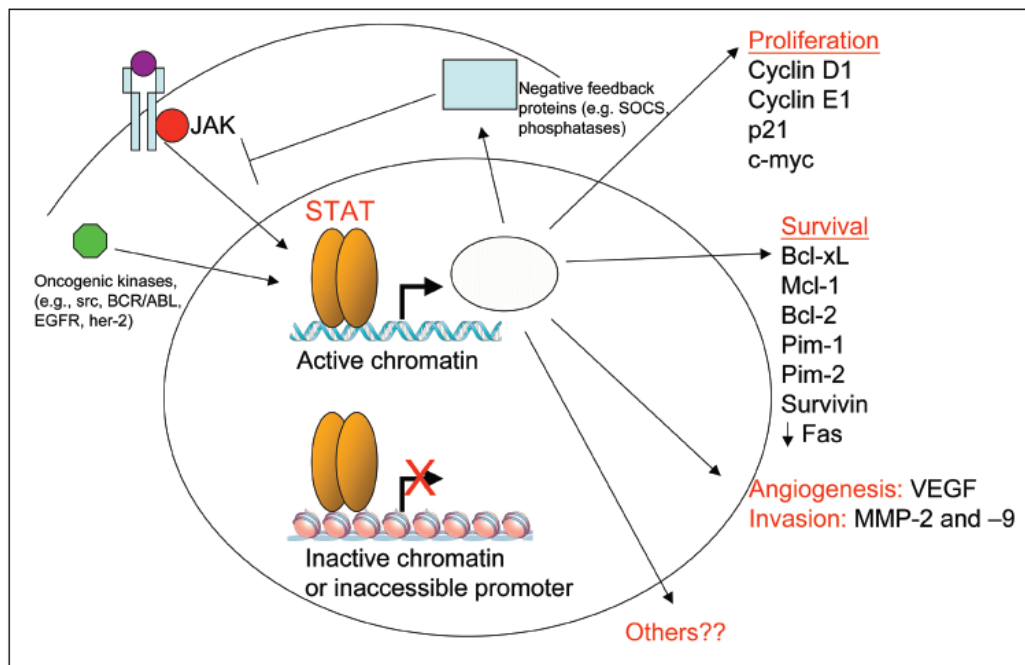


Figure 15 : Représentation de la régulation des gènes cibles de STAT¹⁰⁹.

I.B.1.d Conséquences de la signalisation de Bcr-Abl dans la cellule leucémique

I.B.1.d.1 Inhibition de l'apoptose

A travers les nombreuses voies de signalisation anti-apoptotiques activées par Bcr-Abl, les cellules détiennent la capacité de détourner la machinerie cellulaire pour proliférer et résister à la mort, notamment la mort apoptotique. Une diminution de Bcr-Abl dans des lignées cellulaires LMC est capable de restaurer l'apoptose¹¹⁰. Ce mécanisme important dans le cadre de l'oncogène Bcr-Abl conduit à une expansion des progéniteurs myéloïdes, non par augmentation de la prolifération de ces cellules mais par une inhibition de l'apoptose^{111,112}.

Bcr-Abl inhibe l'apoptose de deux façons distinctes, en stimulant les voies anti-apoptotiques, et en modulant l'expression des protéines mitochondriales majoritairement pro-apoptotiques. Dans ces deux cas, l'activation des voies Akt et Ras est indispensable.

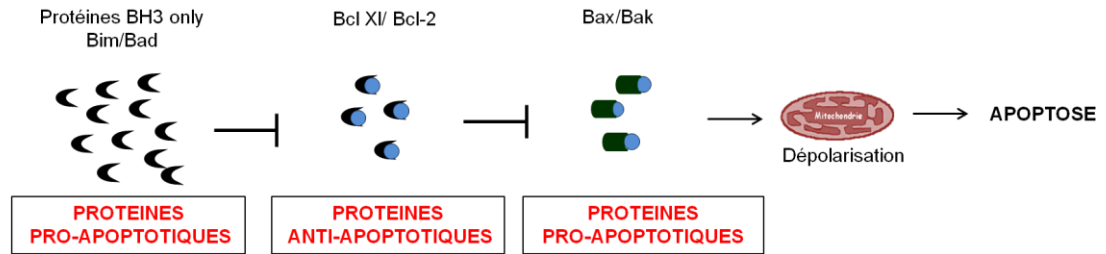
I.B.1.d.2 Modulation des protéines de la famille Bcl-2

Les voies Ras/Raf et PI3K/Akt régulent les protéines de la famille Bcl-2 (dont je parlerai plus loin dans le chapitre apoptose) qui sont elles-même importante dans la régulation de l'apoptose. Ces voies favorisent l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 reconnue pour son pouvoir leucémogène dans la LMC^{67,113,114,115}. Elles permettent également la séquestration de la protéine Bad dans le cytosol bloquant ainsi la dépolarisation mitochondriale et donc l'activation des caspases nécessaires à l'apoptose¹¹⁶.

D'autres voies de signalisation telles que STAT et NFκB bloquent les fonctions de la mitochondrie en activant la transcription de Bcl-xl^{100,117}. L'activation de la voie Erk par Bcr-Abl entraîne, *via* FOXO3, la dégradation de la protéine pro-apoptotique Bim par le protéasome.¹¹⁸⁻¹²¹

Ainsi dans les cellules Bcr-Abl⁺, la balance entre les protéines mitochondriales pro-apoptotiques et anti-apoptiques penche vers un effet anti-apoptotique (Figure 16).

Régulation de l'apoptose par les protéines de la famille Bcl-2



Balance entre les protéines de la famille Bcl-2 dans les cellules Bcr-Abl

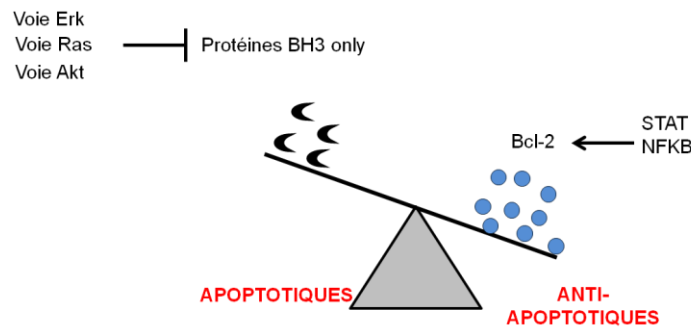


Figure 16 : Schéma de la balance entre les protéines de la famille Bcl-2 dans la régulation de l'apoptose.

I.B.1.d.3 Activation de la voie anti-apoptotique NFκB

NFκB (nuclear factor-kappa B) est une famille de facteurs de transcription. Il existe cinq membres : NFκB1 (p50), NFκB2 (p52), RelA (p65), RelB et c-Rel (seulement chez la drosophile). NFκB est un hétérodimère composé de Rel/ NFκB¹²². NFκB est spécifiquement lié aux inhibiteurs IκK (IκB kinases) qui permettent, *via* la dégradation d'IκBα, l'activation de NFκB. IκK est un complexe constitué de deux sous-unités catalytiques sérine/thréonine kinases (IκKα, IκKβ) et une sous-unité régulatrice (IκKγ ou NEMO) n'ayant pas d'homologie avec les sous-unités catalytiques.

Il peut être activé par de nombreux stimuli (par exemple le TNFα, l'IL-1, les lipopolysaccharides bactériens, les infections virales, les UV). Une fois activé, il phosphoryle IκBα sur ses résidus sérine 32 et 36 pour induire sa dégradation¹²³⁻¹²⁵ (Figure 17).

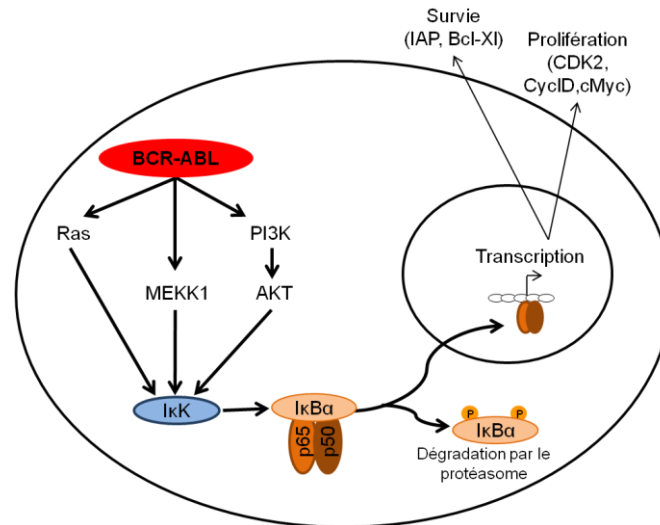


Figure 17 : Schéma de l'activation de NFκB induite par Bcr-Abl. ¹²⁶⁻¹²⁹

Lorsque NFκB est libéré de ses inhibiteurs IκBα, il devient alors actif sous une forme dimérique. Il va pouvoir se relocaliser dans le noyau grâce à son signal de localisation NLS et fixer des séquences consensus de l'ADN pour induire la transcription d'un grand nombre de gènes. Ces gènes codent pour des cytokines, des facteurs de croissance, ou encore des molécules d'adhésion. Ils sont donc impliqués dans l'inflammation (TNFα, IL-2, NOS), la prolifération (CDK2, cycD, cMyc), la survie (IAP, Bcl-xl), l'apoptose (p53) ou encore dans les mécanismes d'angiogenèse (VEGF, IL-8) ^{130-133 134-136}. NFκB peut également avoir une activité anti-apoptotique dans la voie apoptotique induite par le TNF α.

NFκB peut aussi être activé indépendamment de la voie Akt via deux mécanismes d'activation. La sérine thréonine kinase MEK 1 semble être un médiateur dans l'effet anti-apoptotique de Bcr-Abl via l'activation de la transcription de c-IAP par NFκB ^{137 138}. De plus, la protéine kinase D2, indépendamment de son activité kinase, est phosphorylée par Bcr-Abl. Cette phosphorylation lui permet de former un complexe avec NFκB conduisant ainsi à son activation ¹³⁹.

En 1996, l'équipe de Gilmore décrit une corrélation entre la dérégulation de l'activité Rel/NFκB et les cancers ¹²⁹. L'augmentation de l'activité transcriptionnelle de p65/NFκB est corrélée au processus de transformation leucémique dans les lignées cellulaires myéloïdes

murines Bcr-Abl^{140 141}. L'utilisation d'oligonucléotides anti-sens dirigés contre p65 a permis également de mettre en évidence un rôle anti-apoptotique de NFκB dans des cellules Bcr-Abl⁺.

Dans des lignées humaines Bcr-Abl, l'activation de NFκB, suite à une stimulation par le facteur de croissance TNFα, nécessite d'une part les protéines NIK (NFκB induced kinase) et d'autre part, que cette activation soit dépendante d'Akt qui va phosphoryler IκKα et IκKβ¹⁴². L'équipe de Kirtchner a montré une activation constitutive de p65/ NFκB dans les blastes de patients LMC¹⁴³.

I.B.1.d.4 L'effet anti-apoptotique de Hsp70

L'Hsp70 est une protéine de choc thermique inductible (heat shock protein) surexprimée dans de nombreux cancers (cancer du sein, de la vessie ou de l'utérus) et fait partie de la famille des protéines chaperonnes¹⁴⁴ (Figure 18). Dans les cellules Bcr-Abl⁺, cette surexpression est due à la transactivation du facteur de transcription GATA1 par Bcr-Abl lui-même¹⁴⁵ (Figure 18).

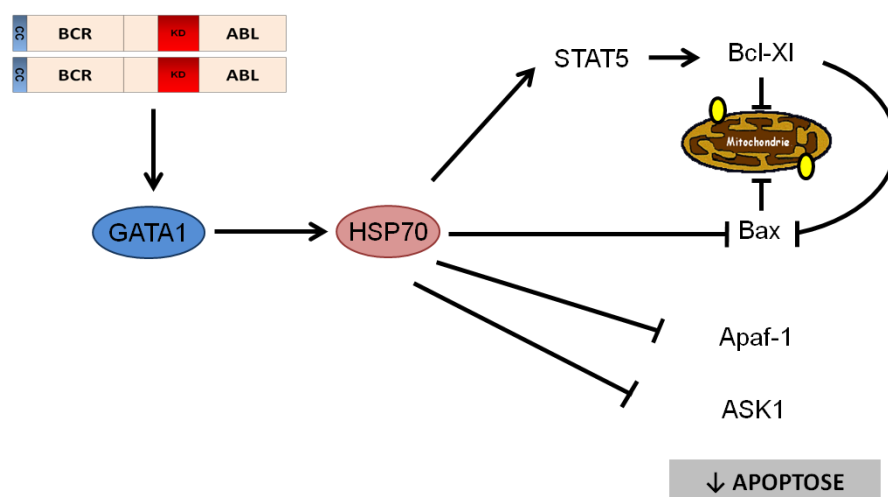


Figure 18 : Représentation de la voie anti-apoptotique Hsp70 induite par Bcr-Abl.

En dehors de son rôle de protéine chaperonne, elle est capable de protéger la cellule de la mort apoptotique dépendante de la mitochondrie en bloquant différentes étapes du mécanisme

apoptotique¹⁴⁶. Elle intervient à un niveau pré-mitochondrial conduisant à un blocage de la perméabilité mitochondriale ce qui prévient la libération du cytochrome c. A un niveau post-mitochondrial, elle inhibe la protéine Apaf-1 (Apoptotic peptidase activating factor 1), élément clef de l'apoptosome ainsi que la sérine thréonine kinase ASK1 (apoptosis signal inducing kinase 1)^{147 148}.

L'équipe de Yeh *et al* en 2009, a montré une corrélation étroite entre le taux d'Hsp70 plasmatique chez les patients et la progression de la LMC comme cela avait montré dans les blastes de patients atteint de LMC^{149 150}.

I.B.1.e Bcr-Abl et prolifération

L'oncogène Bcr-Abl entraîne une croissance cellulaire indépendante des facteurs exogènes (cytokines et facteurs de croissance). La prolifération est due à la capacité de Bcr-Abl à stimuler la transition G1/S du cycle cellulaire et à l'inhibition de l'apoptose, deux paramètres indispensables au rôle transformant de Bcr-Abl¹⁵¹. Cette prolifération indépendante des cytokines entraîne une expansion anormale des cellules myéloïdes^{152,153}.

La prolifération cellulaire consécutive à l'entrée en cycle des cellules est contrôlée par les CDK (Cyclin-Dependent Kinase) et leurs inhibiteurs CDKI (Cyclin-Dépendant Kinase Inhibitor) appartenant à la famille des protéines Cip/Kit. Dans les cellules Bcr-Abl, les cyclines D1 et D2 sont constitutivement actives^{154,155} (Figure 19).

Parmi les CDKI (Cyclin-Dependant Kinase Inhibitor) la protéine p27^{Kip} est une protéine nucléaire inhibitrice des complexes cyclinE/CDK2^{156,157}. La p27^{Kip} joue un rôle primordial dans la régulation de la phase G1, son expression est diminuée ou son activité inhibée dans de nombreux cancers (cancer du sein, prostate, leucémies, etc)¹⁵⁸. Dans les cellules Bcr-Abl, elle est directement phosphorylée par Akt et séquestrée dans le cytoplasme pour ensuite être dégradée par le protéasome^{159,160}. La dégradation de p27^{Kip} va conduire à une activation des CDK puis une induction d'E2F1 qui active, entre autre, la transcription de c-Myc ce qui conduit à une prolifération importante des cellules.

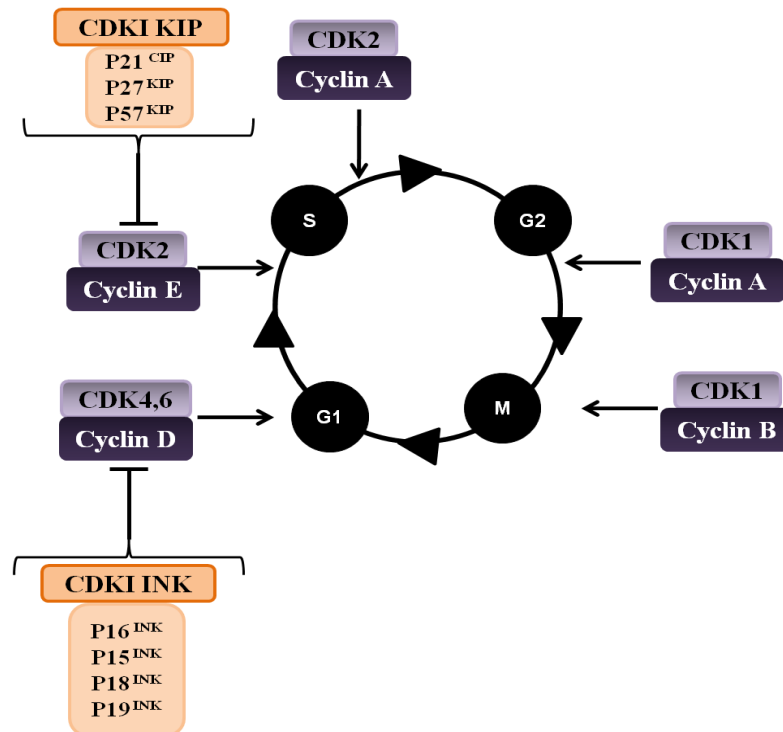


Figure 19 : Schéma de la régulation du cycle cellulaire par les CDK et CDKI.

Récemment, l'équipe de Borriello a identifié un autre CDKI impliqué dans la prolifération des cellules Bcr-Abl⁺, la protéine p57^{Kip2}. En effet, l'inhibition de l'activité kinase de Bcr-Abl par l'imatinib entraîne une surexpression de p57^{Kip2}. Cette surexpression bloque ainsi la prolifération des lignées Bcr-Abl⁺ et des cellules primaires de patients LMC¹⁶¹. p57^{Kip2} a également un rôle régulateur dans le maintien des cellules souches hématopoïétiques de souris en phase G0/G1¹⁶².

L'oncogène Bcr-Abl a donc un rôle important dans la progression du cycle cellulaire en activant des voies de signalisation mitogéniques.

I.B.1.f Adhésion

L'adhésion est primordiale dans l'hématopoïèse en permettant l'ancrage des cellules souches au stroma médullaire.

Les progéniteurs de LMC sont caractérisés par un défaut d'adhésion au stroma et à la matrice extracellulaire^{163,164}. Ce défaut d'adhésion est la conséquence d'un

dysfonctionnement des intégrines, notamment des intégrines $\beta 1$ liées à la matrice extra cellulaire à l'origine du défaut de signalisation. En effet, il est clairement établi que les intégrines sont nécessaires pour bloquer l'apoptose (via la voie PI3-K) et stimuler la prolifération cellulaire (via les voies Erk) ^{165 166}. Elles se fixent pour la plupart à des composants de la matrice extra cellulaire tels que la fibronectine, la laminine, la vitronectine ou encore le collagène. Par exemple, l'adhésion de cellules CD34⁺ de LMC à la fibronectine est réduite par rapport à celle de CD34⁺ normaux ¹⁶⁷. Le traitement de cellules de LMC, par un anticorps activateur de l'intégrine $\beta 1$, permet de restaurer l'adhésion de ces cellules et leur capacité de prolifération s'en retrouve réduite ¹⁶⁸ (Figure 20).

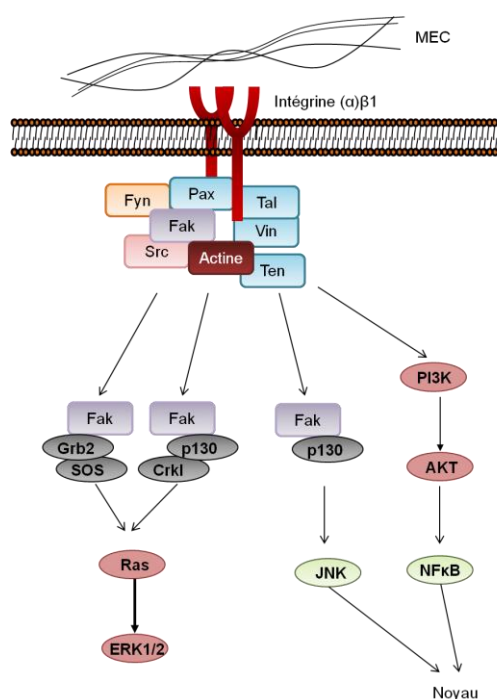


Figure 20 : Schéma des voies de signalisation activées par les intégrines.

Le domaine de liaison à l'actine, présent dans la structure de Bcr-Abl, est nécessaire à son pouvoir oncogénique car il régule la fonction des intégrines. Dans les cellules normales, les intégrines se lient directement ou indirectement aux protéines du cytosquelette (taline, tensine, vinculine...) pour former des complexes focaux d'adhésion. Ces complexes associés à d'autres protéines comme la paxilline, la p130^{CAS} et la p125^{FAK} sont essentiels à l'adhésion

de la cellule et activent à leur tour les voies de signalisation Akt et Erk (signalization outside-in)^{169,170}.

Dans les cellules Bcr-Abl⁺, la phosphorylation de Crkl permet à la partie intracytoplasmique de $\beta 1$ de fixer de façon constitutive la p130^{CAS} et entraîne un détachement de cette dernière de la tensine, d'où une déstabilisation du complexe focal d'adhésion¹⁷¹. Le défaut d'adhésion lié à la dérégulation des intégrines $\beta 1$ a des conséquences sur la prolifération des cellules de LMC. En effet, il a été montré que l'intégrine $\beta 1$ régule l'entrée en cycle des cellules progénitrices de patients atteints de LMC par une inhibition de l'expression de la CDKI p27¹⁷². Ce défaut d'adhésion des cellules Bcr-Abl⁺ pourrait expliquer l'hyperleucocytose et la circulation des cellules hématopoïétiques immatures.

I.B.1.g Instabilité génétique

L'instabilité génétique est une caractéristique des cellules cancéreuses. Elle correspond à une agression permanente de l'ADN *via* notamment la génération de ROS (Reactive Oxygen Species) et à un défaut de réparation conséquent à la fois à une altération des mécanismes de réparation mais aussi à une accumulation de ses erreurs. Cette instabilité se traduit par l'accumulation de défauts dans la cellule et conduit à une altération ou au contraire une potentialisation de certaines réponses cellulaires où les différents points de contrôle du cycle cellulaire sont défectueux³⁸.

En 2000, plusieurs études ont montré une corrélation étroite entre Bcr-Abl et la production de ROS dans les cellules de LMC entraînant des cassures double brin de l'ADN (CDBs) et une erreur lors de la réparation de l'ADN^{173 174,175}. Les ROS sont produits *via* l'activation des voies de signalisation Ras et STAT5. En effet, dans les cellules de LMC, deux voies de réparation de l'ADN sont majoritaires : la HR (Homologous Repair) et la NHEJ (Non Homologous End-Joining)¹⁷⁶. L'activation du système de réparation HR implique la protéine STAT5 pour l'activation du gène RAD51 (protéine essentielle à la réparation homologue)¹⁷⁷. Cette activation constitutive du HR entraîne des mutations et donc une instabilité génétique des cellules¹⁷⁶. Au contraire, le système NHEJ est diminué par Bcr-Abl *via* la dégradation par le protéasome de la DNA-PKcs¹⁷⁸. Cependant, l'existence d'un

mécanisme de réparation NHEJ alternatif indépendant de la DNA-PKcs a été rapporté ^{179,180}. Dans les cellules Bcr-Abl, la DNA-PKcs étant dégradée, ce système alternatif NHEJ, beaucoup plus lent, prend le relais et provoque de nombreuses erreurs dans l'ADN ¹⁸¹. Il a récemment été décrit que Bcr-Abl induisait l'expression d'une RECQ-like hélicase, la protéine WRN (Werner Syndrome) pour favoriser la réparation de type HR infidèle et la perte de nucléotides lors de la NHEJ dans les cellules Bcr-Abl ¹⁷⁷.

Il existe également des modifications épigénétiques qui interviennent dans les variations de l'expression des gènes dans une cellule. Ces modifications modulent l'accès à l'ADN par une acétylation, une méthylation ou une ubiquitination des histones. Une méthylation excessive de l'ADN dans les îlots CpG des promoteurs réprime l'expression du gène en aval comme c'est le cas par exemple pour la protéine Bim dans les cellules de patients atteints de LMC ¹⁸².

Dans les cellules de LMC, l'instabilité génétique conduit à une accumulation d'altérations qui va la renforcer et l'amplifier en conférant à ces cellules une résistance de plus en plus accrue aux thérapeutiques au fur et à mesure de la progression de la maladie.

II. Thérapeutiques dans le LMC

La thérapeutique de la LMC a connu une importante évolution au cours des dix dernières années avec l'arrivée des thérapeutiques ciblées utilisant les inhibiteurs de tyrosine kinases (ITK) anti-Abl. Auparavant, les patients étaient traités par chimiothérapies non ciblées (Hydroxyurée, Busulfan) ou par l'Interféron α .

II.A Thérapeutiques non ciblées

II.A.1 Chimiothérapies

Depuis 1950, la chimiothérapie était utilisée pour cibler les cellules en division rapide et induire une réponse hématologique par normalisation du taux de leucocytes dans le sang.

Malheureusement, la toxicité de ces agents avait souvent des répercussions non désirables sur les cellules normales.

L'utilisation du **busulfan** (un agent alkylant) et l'**hydroxyurée** (un inhibiteur de ribonucléotide réductase) n'a pas permis de bloquer l'évolution de la maladie. Cependant, elles permettent une survie de 5 ans chez 32% des patients avec le Busulfan et de 44% des patients avec l'Hydroxyurée ainsi qu'une meilleure tolérance au traitement^{183 184}.

Aucun de ces deux agents chimiothérapeutiques n'induit une réponse cytogénétique. Cependant, l'Hydroxyurée est encore utilisée pour normaliser le taux de leucocytes. Le Busulfan reste utilisé pour le conditionnement des patients avant une allogreffe¹⁸⁵.

II.A.2 Interféron α (INF α)

L'**INF α** a d'abord été utilisé comme thérapeutique dans d'autres cancers avant de l'être en 1980 pour la LMC. C'est une cytokine avec des propriétés anti-prolifératives, qui est rapidement devenue une thérapeutique de premier choix malgré des effets secondaires (fièvre, nausées, perte de poids, lésions hépatiques).

En effet, cet agent agit sur les progéniteurs de LMC mais également sur des cellules du stroma médullaire. Soixante pour cent des patients traités à l'IFN α développent rapidement une Réponse Hématologique Complète (RHC = normalisation du nombre de leucocytes et de plaquettes dans le sang accompagnée de la disparition de tous les symptômes de la LMC) puis 40% d'entre eux une Réponse Cytogénétique Complète (RCC = disparition des cellules Ph⁺).

Au final, 20% de ces patients en RCC obtiennent une réponse moléculaire complète (RMC= moins de 0.1% des cellules possèdent la modification génétique Bcr-Abl). La survie des patients est supérieure à celle obtenue avec des traitements au Busulfan et à l'Hydroxyurée (5 ans de survie dans 50 à 60% des cas)¹⁸⁶ (Tableau 3).

	Busulfan	Hydroxyurée	INF α
RHC	23-54%	39-53%	60-80%
RCC	1-2,5%	-	40-60 % (dont 10% durables)
RMC	-	-	20-40%
Survie	45 mois	56 mois	3 ans (79%)

Tableau 3 : Comparaison de la moyenne des réponses hématologique, cytogénétique et moléculaire ainsi que de la survie des patients après différents traitements.

Les abréviations: RHC (Réponse hématologique complète), RCC (Réponse Cytogénétique Complète), RMC (Réponse Moléculaire Complètes) et INF (Interféron).

Le grand problème de l'INF α est qu'il reste très peu efficace à des stades tardifs de la maladie. Afin d'optimiser son efficacité et en dépit d'une toxicité accrue, il a été utilisé en combinaison avec d'autres agents alkylants tels que la cytarabine (inhibiteur de la phase S du cycle cellulaire). Cette combinaison thérapeutique allonge la survie des patients (85% ont un taux de survie supérieur à 3 ans contre 79% traités à l'interféron seul) et améliore la réponse cytogénétique complète à 12 mois (41% contre 24% avec l'interféron seul)¹⁸⁷.

II.A.3 Allogreffe

L'allogreffe de CSH est actuellement la seule thérapeutique curative de la LMC. L'allogreffe, après l'élimination des cellules leucémiques, permet la reconstitution de l'hématopoïèse normale grâce au conditionnement et à l'effet greffon *versus* leucémie (GVL = l'élimination des cellules leucémiques du patient par les lymphocytes T du donneur). L'allogreffe est dite géno-identique si les cellules greffées proviennent d'un membre de la famille ou phéno-identique si au contraire elles proviennent d'un donneur non apparenté. Elle consiste en une chimiothérapie myélo-ablative chez le malade pour conduire à une aplasie puis en une réinjection de cellules de moelle osseuse d'un donneur compatible.

A cause des complications possibles lors d'une allogreffe, les risques restent élevés. Actuellement, seulement 20% des patients pourraient bénéficier de la greffe du fait de la difficulté à trouver des donneurs compatibles.

II.B. Thérapeutiques ciblées

II.B.1 Inhibiteur de tyrosine kinase (ITK) de 1er génération : imatinib

II.B.1.a L'imatinib: une thérapeutique de premier choix

L'imatinib ou Glivec (CGP 57148 puis STI571) a été une révolution dans la thérapeutique de la LMC. Il est donné en première intention aux patients adultes en phase chronique de la maladie.

L'imatinib est un dérivé du 2-phenylamine-pyrimidine et inhibe l'activité kinase de Bcr-Abl en entrant en compétition avec l'ATP sur le site de liaison de l'ATP du domaine catalytique de l'oncogène^{188,189} (Figure 21).

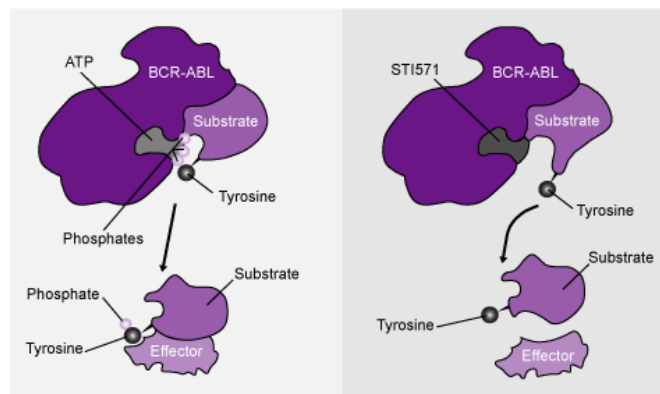


Figure 21 : Interaction entre l'imatinib et le domaine kinase de Bcr-Abl.

Bien que l'imatinib inhibe Abl avec une très bonne efficacité ($IC_{50} = 2.5nM$), il peut également cibler les récepteurs PDGFR (Platelet-Derived Growth Factor Receptors) et c-Kit avec la même efficacité^{190 191}. La forme constitutivement active de ces récepteurs retrouvée dans les lignées cellulaires GIST (Gastro-Intestinal Stromal Tumor) très résistantes aux

chimiothérapies et qui sont caractérisées par une mutation de c-Kit, est également sensible à cet ITK. En effet, 54% des patients répondent partiellement à l'imatinib, la maladie est stabilisée dans 28 % des cas et 14% résistent à la thérapeutique^{199,200}.

Jusqu'à présent l'oxydoréductase NQO2 est la seule cible non tyrosine kinase décrite de l'imatinib¹⁹². L'imatinib n'est donc pas spécifique de la protéine Abl, d'autres cibles pourraient intervenir dans son effet sur la cellule leucémique.

L'interaction entre l'imatinib et Bcr-Abl n'est possible que dans une conformation inactive et déphosphorylée de l'oncogène¹⁹³. Ceci permet de stabiliser l'oncogène sous sa forme inactive et donc de bloquer l'autophosphorylation de l'enzyme puis la transmission du signal¹⁹⁴. Ainsi l'imatinib est capable de réduire de 90% la formation de colonies myélocytaires et érythrocytaires de cellules LMC mais pas des cellules normales^{188,194}. Ce blocage de la prolifération *in vitro* des cellules de souris et humaines est corrélé à une augmentation de l'expression de la protéine p27 et de Chk2 (Check point protéine) au niveau du cycle cellulaire (phase G1 et G2 respectivement)¹⁹⁵.

Bien que l'efficacité de l'imatinib soit fortement réduite lors de la phase blastique, 96 % des patients en phase chronique ont une RHC à 12 mois et 69 % une RCC avec une très bonne tolérance à la thérapeutique (Tableau 4). L'essai IRIS (International randomized study of interferon versus STI571), a permis de confirmer la supériorité du traitement ciblé sur l'activité de la kinase Bcr-Abl (imatinib) par rapport à l'interféron α .

	12 mois	60 mois
RHC	96%	98%
RCC	69%	87%
RMC	40%	70%

Tableau 4 : Réponse des patients sous imatinib après 12 mois ou 60 mois de traitement d'après l'essai IRIS.

Les abréviations : Réponse Hématologique Complète (RHC), Réponse Cytogénétique Complète (RCC) et Réponse Moléculaire Complète (RMC).

En 2003, une étude comparative entre l'efficacité de la thérapeutique à l'imatinib et de la combinaison entre l'INF α + Cytarabine met en évidence la supériorité de l'imatinib au niveau des réponses RHC, RCC et RMC (97% vs 56% pour la RHC, 74% vs 8% pour la RCC et 85% vs 22% pour la RMC) ¹⁹⁶.

Les patients atteints de LAL Ph⁺ (Leucémie Aiguë Lymphoblastique) bénéficient également d'une thérapeutique utilisant l'imatinib. Les LAL ont longtemps été des maladies avec un très mauvais pronostic mais l'imatinib en monothérapie a permis à 60% des patients de répondre positivement et à 20% d'entre eux de rentrer en RHC ¹⁹⁷. En combinaison avec d'autres agents, l'imatinib a permis une rémission chez 95% des patients LAL avec une survie de 1 an dans 76% des cas ¹⁹⁸. De façon intéressante, l'essai SPIRIT (STI571 Prospective Randomized Trial) a comparé l'imatinib avec une thérapeutique combinée imatinib + interféron. Bien que la RCC soit similaire dans les deux groupes de patients, 38% des patients sont en RMC après la thérapeutique combinée contre 21% avec la monothérapie.

II.B.2 ITK de seconde génération

La meilleure compréhension des mécanismes de résistance a permis le développement d'autres ITK dits de seconde génération pour pallier aux résistances à l'imatinib.

Depuis 2007, le dasatinib et le nilotinib ont fait leur apparition et permettent 40 à 50% de rémission cytogénétique. Jusqu'à présent, ils étaient préconisés en seconde intention en cas de résistance à l'imatinib ou dans la phase blastique de la maladie. Cependant des essais de phase III très récents montrent que les ITK de seconde génération sont plus efficaces que l'imatinib lorsqu'ils sont donnés en première intention aux patients atteints de LMC. En effet, il a été observé que 100% des patients traités au nilotinib obtenaient une RCC à 6 mois et 55% une RMM (Réponse Moléculaire Majeure) avec une survie sans événement bien supérieure à celle obtenue après le traitement à l'imatinib. Même si cela reste à confirmer, le même type d'observation a été fait sur des patients traités au dasatinib en première intention.

II.B.2.a Le nilotinib

Le nilotinib peut être considéré comme «un super imatinib» dérivé du phénylaminopyrimidine. Tout comme l'imatinib, c'est un inhibiteur compétitif de l'ATP, avec une meilleure affinité que l'imatinib pour Bcr-Abl (affinité de l'ITK avec ces substrats : nilotinib, Abl > PDGFR > c-Kit vs imatinib, PDGFR > c-Kit > Abl) et une efficacité 30 fois plus élevée sur les cellules Bcr-Abl⁺ ²⁰¹. Il est capable de se lier à la conformation inactive de l'oncogène. *In vitro* et *in vivo*, cet ITK rallonge la survie des souris à qui on a injecté des cellules Bcr-Abl résistantes à l'imatinib. Les essais cliniques de phase II ont permis d'observer qu'en phase chronique, 48% des patients résistants à l'imatinib obtenaient une RMC et 32% en phase accélérée. En phase chronique, après 6 mois de traitement, 71% des patients ont une réponse hématologique complète et 42% une réponse cytogénétique ²⁰².

Les patients résistants sans aucune réponse présentaient une mutation T315I dans le domaine kinase de Bcr-Abl. En effet, le nilotinib inhibe l'activité des formes mutées de Bcr-Abl responsable de la résistance à l'imatinib à l'exception des mutations T315I et E255V ²⁰³(Figure 22).

II.B.2.b Le dasatinib

Le dasatinib est également un analogue de l'ATP dérivé du pyrido (2,3-d) pyrimidine. Contrairement à l'imatinib ou au nilotinib, c'est un inhibiteur à large spectre puisqu'il cible en plus de Bcr-Abl (sous sa conformation active et inactive), plusieurs protéines de la famille des Src kinases (tel que Src, Lck, Yes, Fyn) ^{204 205}. Ce large spectre lui permet d'être 300 fois plus efficace que l'imatinib ²⁰⁶. Le dasatinib permet de diminuer la prolifération des cellules de patients atteints de LMC sensibles et résistantes. Tout comme le nilotinib, le dasatinib est efficace pour toutes les mutations à l'exception de la T315I ^{207,208}. Il reste également très peu efficace contre certaines mutations comme par exemple les mutations dans la région de liaison à l'ATP (V299L, F317L) ou dans le domaine kinase (E255K, L248V, G250E) (Figure 22). L'étude clinique de phase II sur des patients résistants (dans toutes les phases de la maladie) permet d'observer une RCC dans 72% des cas et une réponse moléculaire. Vingt huit pour cent des patients rechutent après 15 mois ²⁰⁹.

		IC50 fold increase (WT = 1)				
		Imatinib	Dasatinib	Nilotinib		
	Parental	10.78	> 50	38.43	Sensitive	≤ 2
	WT	1	1	1	Moderately resistant	2.01-4
P-LOOP	L248V	3.54	5.11	2.80	Resistant	4.01-10
	G250E	6.86	4.45	4.56	Highly resistant	> 10
	Q252H	1.39	3.05	2.64		
	Y253F	3.58	1.58	3.23		
	E255K	6.02	5.61	6.69		
	E255V	16.99	3.44	10.31		
C-Helix	D276G	2.18	1.44	2.00		
	E279K	3.55	1.64	2.05		
ATP binding region (drug contact sites)	V299L	1.54	8.65	1.34		
	T315I	17.50	75.03	39.41		
	F317L	2.60	4.46	2.22		
SH2-contact	M351T	1.76	0.88	0.44		
Substrate binding region (drug contact sites)	F359V	2.86	1.49	5.16		
A-LOOP	L384M	1.28	2.21	2.33		
	H396P	2.43	1.07	2.41		
	H396R	3.91	1.63	3.10		
	G398R	0.35	0.69	0.49		
C terminal lobe	F486S	8.10	3.04	1.85		

Figure 22: Valeurs des IC₅₀ du, imatinib, dasatinib et nilotinib en fonction des différentes mutations de Bcr-Abl dans les cellules Ba/F3 transfectées.

Les abréviations: concentration relative pour une inhibition de 50 % (IC₅₀), Wild Type (WT).

II.B.3 Troisième génération pour vaincre la mutation T315I

Les mutations dans le domaine kinase entraîne une forte résistance des cellules à la thérapeutique, en particulier la mutation T315I^{210,211}. La mutation T315I se situe dans la poche catalytique de l'oncogène ce qui rend les ITK de première et seconde générations inadaptés.

Il a donc été développé récemment de nouveaux inhibiteurs ciblant une région extérieure au domaine catalytique²¹². Le **ponatinib (AP24534)** a été synthétisé pour bloquer Bcr-Abl avec une efficacité telle qu'il bloque toutes les formes de Bcr-Abl y compris les formes mutées comme la T315I. Il inhibe également les Src kinases et le PDGFR. *In vitro*, sur des cellules Bcr-Abl⁺, il permet de bloquer la prolifération et d'induire l'apoptose des cellules.

Son efficacité a également été démontrée dans le modèle animal et sur des cellules primaires de patients possédant ou pas la mutation T315I ²¹¹. En phase I, le ponatinib donne une RCC chez 50% des patients en phase chronique et chez 100% des patients ayant une mutation T315I ²¹³. Cependant, les patients en phases plus avancées semblent moins bien répondre ce qui suggère de possibles nouvelles mutations. Actuellement, le ponatinib est en phase II clinique et aucune mutation conférant une résistance n'a été observée ²¹⁴.

Un autre inhibiteur de tyrosine kinase efficace face à la mutation T315I a vu le jour, **le DCC-2036**. ²¹⁵. Il inhibe la région régulatrice d'Abl mais également les protéines Flt3, TRKA et TIE2 kinases impliquées dans certaines LAM. Actuellement, il est testé en phase I clinique sur des patients LMC résistants ou intolérants aux autres ITK ce qui a permis d'observer de bonnes réponses cytogénétiques et moléculaires.

Il existe d'autres inhibiteurs actuellement en phase de test comme par exemple les inhibiteurs d'aurora kinases, le **MK-0457** ciblant la tyrosine kinase Bcr-Abl, Flt3, Jak2 ou encore le **PH739358** ayant des propriétés anti-proliférative et pro-apoptotique sur les cellules Bcr-Abl sauvage et mutée en T315I ^{216,217}.

II.B.4 Les ITK allostériques

Ce groupe d'ITK agit par un mécanisme allostérique non ATP-compétitif impliquant une liaison avec la poche myristate dans la région C-term du domaine kinase de Bcr-Abl. Le **GNF-2** a été décrit comme ayant des propriétés anti-prolifératives sur les cellules Bcr-Abl sauvages et mutées (par exemple E255V, Y253F) ²¹⁸. Cependant, les mutations (C464Y, P465S et E505K) à proximité du site de liaison du myristate et la mutation T315I entraînent une résistance au GNF-2. Il a donc été développé un analogue du GNF-2, **le GNF-5** (N-hydroxyethylcarboxamide) qui en se fixant altère la conformation du site de liaison à l'ATP. Depuis les thérapies par l'interféron, il est clairement établi que la thérapie combinée est souvent plus efficace que la monothérapie avec les ITK. En effet, une combinaison GNF-5 avec le nilotinib permet de dépasser la résistance des mutations T315I et E505K ²¹⁹.

II.C. Les résistances aux ITK

L'imatinib bien que révolutionnaire fait face à des résistances chez certains patients. Ces résistances sont dites primaires lorsque le patient est réfractaire dès le départ à la thérapeutique (pas de réponse hématologique à 3 mois, ni de réponse cytogénétique au bout d'un an) et secondaires s'il s'agit de mécanismes d'échappement de la cellule après une réponse transitoire.

II.C.1 Résistances primaires

Les résistances primaires sont souvent associées à des résistances non liées à la cellule. Une étude récente les associe notamment à une mauvaise observance des patients ²²⁰. Les patients qui ont une prise rigoureuse ($\geq 85\%$) des médicaments ont une réponse cytogénétique à 2 ans de 64,5% contre 26,8% dans le cas contraire. En 1997, l'équipe d'Apperley met également en cause un défaut de fonction d'OCT1 (qui sera abordé plus loin) nécessaire pour l'entrée de l'imatinib dans la cellule ²²¹.

II.C.2 Résistances secondaires

(Figure 23)

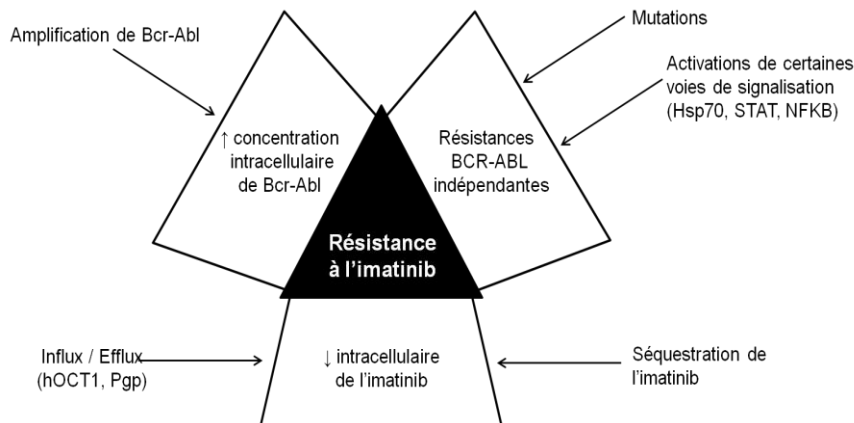


Figure 23 : Bilan des différentes causes de résistances secondaires à l'imatinib. ²²¹

II.C.2.a Les résistances dépendantes de Bcr-Abl

Des **mutations** peuvent survenir dans le domaine kinase ou dans les domaines SH2 ou SH3 de l'oncogène. La première mutation mise en évidence a été la T315I (substitution d'une thréonine par une isoleucine) par l'équipe de Gorre, mais rapidement d'autres mutations ponctuelles ont été détectées par différentes équipes chez des patients résistants^{222,223 224}. De plus, les mutations en dehors du domaine kinase de l'oncogène comme les domaines SH2 et SH3 entraînent une levée du rôle auto-inhibiteur de ces domaines et donc une persistance de l'activité enzymatique de Bcr-Abl²²⁵.

Actuellement, une centaine de mutations ont été identifiées *in vivo* à des fréquences différentes selon le type de résistance ou les types de TKI utilisés en thérapeutiques²²⁶. Les résistances à l'imatinib dépendantes des mutations impliquent fréquemment des mutations dans le domaine de liaison à l'ATP (P) et le domaine de liaison de l'imatinib (B) (Figure 24). Afin d'abolir ces résistances, les ITK de seconde génération (nilotinib et dasatinib) ont été développés. Malgré tout, la mutation T315I ou « mutation du diable » reste la seule mutation résistante aux ITK de seconde génération.

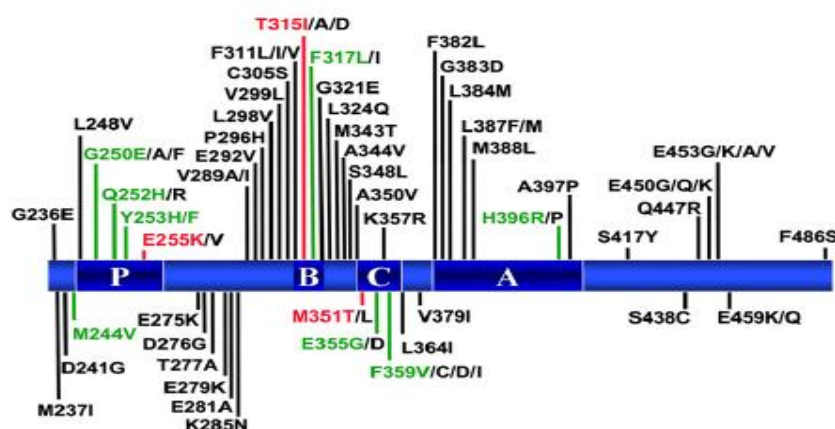


Figure 24 : Localisation des différentes mutations sur Bcr-Abl associées à une résistance à l'imatinib. La hauteur indique la fréquence des mutations.

Les abréviations: Boucle P pour le domaine de fixation à l'ATP (P), site de fixation à l'imatinib (B), domaine catalytique (C), domaine d'activation (A)²²⁷.

On peut noter une augmentation de la fréquence des mutations en fonction de l'évolution de la maladie : en phase chronique nous retrouvons en moyenne 26% de mutations, 67% en phase accélérée et 80% en phase blastique²²⁶. Il est donc important de traiter rapidement les patients.

In vitro, la génération de lignées cellulaires résistantes à l'imatinib a montré une **amplification de Bcr-Abl** en présence de concentrations croissantes d'imatinib^{228,229}. *In vivo*, la résistance due à une surexpression de Bcr-Abl détectée par FISH (Fluorescence In Situ Hybridation) ne concerne que 15% des patients, et elle est principalement retrouvée chez les patients en phase blastique^{230,231 232}.

II.C.2.b Résistance indépendante de Bcr-ABI²³³

II.C.2.b.1 Efflux et influx de l'imatinib par les transporteurs P-glycoprotéine (Pgp) ou hOCT1

La protéine, Pgp, responsable de l'expulsion de l'imatinib dans la cellule est codée par le gène MDR-1 (Multi-Drug Resistance 1). La pompe Pgp est un transporteur actif sur la membrane cytoplasmique de la cellule permettant la sortie de substrats hydrophobes ou amphiphiles endogènes comme par exemple les hormones ou exogènes tels que les agents thérapeutiques. Sa surexpression a été décrite dans des lignées LMC résistantes aux ITK telles que la lignée Lama-84 R mais également chez des patients. Ce transporteur est donc à l'origine de certains échecs thérapeutiques^{234,235}.

L'équipe d'Apperley a également mis en évidence le rôle de hOCT1 (human Organic Cation Transporter 1) dans l'influx de l'imatinib dans la cellule^{221,236}. La surexpression de OCT1 chez les patients favorise l'efficacité de l'imatinib (85% des patients sont en rémission moléculaire après 24 mois contrairement aux patients qui sous expriment ce transporteur)^{237,238}.

II.C.2.b.2 Acide α -glucophorine (AGP)

L'AGP est une protéine plasmatique qui peut également être à l'origine de la résistance à l'imatinib^{239,240}. En effet, l'AGP est capable de séquestrer l'imatinib et de modifier ainsi sa biodisponibilité. *In vivo*, la corrélation entre la résistance et le taux d'AGP intracellulaire n'a été confirmée que chez les patients en phase blastique²⁴¹. Cependant, une étude a permis de montrer qu'en présence d'érythromycine, un inhibiteur compétitif de l'AGP, les propriétés anti-tumorales de l'imatinib sont restaurées²⁴².

II.C.2.b.3 Surexpression de Src kinases

Les Src kinases (Yes, Fyn, Hck, Fgr, Lyn, Lck, Blk, Yrc) sont des tyrosine kinases dont plusieurs sont impliquées dans la signalisation de Bcr-Abl. Elles sont capables de coopérer avec Bcr-Abl en le phosphorylant, participant ainsi à sa signalisation.

In vitro, dans des lignées K562 résistantes à l'imatinib, la voie des Src kinases a été identifiée comme hyperactive par rapport à des K562 sensibles avec une surexpression des protéines Lyn, Hck ou Fyn^{243 244 245,246}. Chez les patients en phase accélérée, l'augmentation de l'expression de Lyn et Fyn est corrélée à la progression de la maladie. En effet, une inhibition de la protéine Lyn par siRNA permet de diminuer la prolifération cellulaire et de restaurer l'apoptose²⁴⁷. *In vitro*, une inhibition de Lyn par l'inhibiteur PP2 ou une activation constitutive de la protéine (LynY508F) permet de mettre en évidence une régulation positive entre Lyn et la protéine anti-apoptotique Bcl-2²⁴⁴. En plus de la surexpression de Lyn dans la résistance au nilotinib, notre équipe a pu identifier *in vitro* mais aussi *in vivo* d'autres tyrosine kinases telles que Syk et Axl impliquées dans cette résistance. Ces dernières participent à un complexe impliquant Lyn et induisent la résistance. Des protéines intermédiaires interagissant avec ce complexe, comme la protéine adaptatrice CDCP-1, jouent un rôle critique dans la résistance au nilotinib. Nous avons retrouvé une surexpression d'Axl chez plusieurs patients atteints de LMC résistants au nilotinib et cette surexpression n'est pas forcément associée à celle de Lyn²⁴⁸.

II.C.2.b.4 D'autres voies de signalisation modulées

L'Hsp70, comme nous l'avons vu précédemment, est une heat shock protéine ayant une activité chaperonne. Elle est exprimée sous forme constitutive (Hsc70) et inductible (Hsp70). La forme inductible est induite par Bcr-Abl. En 2008, sa surexpression a été montrée comme étant une des causes de la résistance à l'imatinib²⁴⁹. Malgré son implication dans la résistance aux thérapeutiques dans de nombreux cancers, il n'existait pas, jusqu'en 2010, des inhibiteurs directs de l'Hsp70 mais seulement des agents inhibant l'activité transcriptionnelle de HSF1, un facteur régulant positivement l'expression de l'Hsp70²⁵⁰. En 2010, des inhibiteurs directs ont vu le jour : la pifithrine-μ qui bloque l'Hsp70 en empêchant son interaction avec ses substrats et ses co-chaperonnes ou le VER155008 qui, dans les cellules cancéreuses du sein, potentialise l'action apoptotique du 17-AAG (un inhibiteur de l'Hsp90) comme cela avait été décrit sous l'action du resveratrol^{251,252 253-255}.

Récemment, l'implication de la protéine STAT5 dans la résistance aux thérapeutiques a été mise en évidence chez les patients en phase blastique. En effet, un complexe Bcr-Abl, JAK2 et STAT serait présent dans les cellules résistantes. L'activation de STAT5 par phosphorylation permettrait l'activation de la transcription du gène MDR1 impliqué directement dans la résistance comme abordée précédemment²³³.

Comme nous venons de le voir, la LMC est une pathologie bénéficiant d'une thérapeutique ciblée très efficace depuis les années 2000. Cependant, des progrès restent à faire pour vaincre définitivement la LMC puisque des résistances persistent et sont à l'origine de 20% des rechutes chez les patients. Ces résistances se situent à deux niveaux : le premier dont je me suis intéressée dans le cadre de ma thèse est celui des résistances causées par des mécanismes impliqués dans la transformation de la cellule. Ces mécanismes peuvent être dépendants ou indépendants de Bcr-Abl comme nous venons de le voir. Le second niveau de résistance concerne la maladie résiduelle due à la cellule souche. L'essai STIM (Stopper le traitement à l'imatinib), débuté en 2007, a permis de montrer que 39% des patients ayant arrêté le traitement restent en RMC mais 61% font une rechute moléculaire. Ces résultats

suggèrents que les cellules souches sont, soit résistantes, soit insensibles aux ITK, d'où une nouvelle notion de récurrence dans la LMC ²⁵⁶.

Dans le cadre de mon projet de thèse, je me suis focalisée sur le problème des résistances de premier niveau, c'est-à-dire celles dues à des anomalies additionnelles de la cellule. Depuis longtemps, mon intérêt envers la santé humaine et notamment envers les cancers m'a poussé à me demander comment est-ce-qu'on pouvait éliminer une cellule cancéreuse résistante aux traitements pour améliorer les stratégies thérapeutiques. Quand on souhaite éliminer une cellule, cela sous entend que l'on veut la faire mourir. A ma venue dans le laboratoire pour commencer ma thèse, j'ai pu bénéficier de modèle de cellules résistantes à l'imatinib, au nilotinib et au dasatinib. J'ai donc utilisé ces cellules de LMC comme modèle pour essayer de mieux comprendre les mécanismes de morts cellulaires pouvant être induits dans les cellules cancéreuses sensibles aux thérapeutiques. Les morts cellulaires sont un monde très complexe qui reste encore à être découvert et maîtrisé. La compréhension des mécanismes de morts cellulaires est très importante pour réussir à éliminer une cellule LMC résistante et donc pour améliorer les thérapies cancéreuses.

III. Les morts cellulaires

Comme nous venons de le voir, la LMC est une pathologie bénéficiant d'une thérapeutique ciblée efficace depuis les années 2000. Cependant, des progrès restent à faire pour vaincre définitivement la LMC puisque des résistances persistent et sont à l'origine de 20% de rechutes chez les patients. Au cours de ma thèse, j'ai utilisé la LMC comme modèle pour essayer de mieux comprendre les mécanismes de morts cellulaires et les régulations qui existent entre eux. L'idée derrière cela est d'utiliser ces morts pour contourner les résistances et ainsi éradiquer la LMC.

La mort cellulaire fait partie de l'homéostasie nécessaire au développement des organismes. Toutes les cellules vivantes possèdent dès le départ plusieurs mécanismes pouvant conduire à l'arrêt de leur prolifération et/ou à la mort de la cellule.

III.A. Classification des morts cellulaires

Pendant de nombreuses années, la mort cellulaire se limitait à la nécrose, une mort chaotique considérée comme accidentelle et à l'apoptose, une mort programmée. Depuis 50 ans, des études ont montré qu'il existe d'autres mécanismes programmés pour faire mourir les cellules et participer ainsi à l'équilibre de l'organisme.

En 1973, Schweichel et Merker ont proposé la première classification des morts en fonction de la morphologie des cellules. Jusqu'à très récemment les morts cellulaires chez les mammifères se divisaient donc en trois groupes selon des critères principalement morphologiques :

- Les **morts de type I** sont les morts cellulaires programmées dépendantes (PCD) des caspases comme par exemple l'apoptose.
- Les **morts de type II** correspondent à des mécanismes programmés non apoptotiques comme l'autophagie.
- Les **morts de type III** sont des mécanismes non programmés et passifs comme la nécrose.

Plus récemment, des classifications selon des paramètres morphologiques et surtout biochimiques et moléculaires ont été proposées^{257,258}. A travers ces classifications, on constate l'existence d'un large éventail de morts cellulaires qui sont pour certaines, spécifiques d'un tissu (cornification pour la mort des cellules épithéliales) ou des conditions environnementales (anoikis pour une mort suite à une perte d'adhésion de la cellule ou la pyroptose associée à une réponse anti-microbienne pendant l'inflammation) (Figure 25).

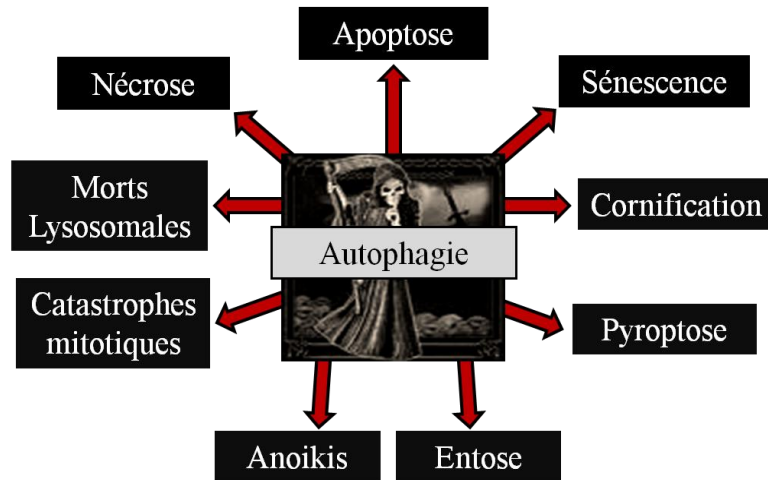


Figure 25: Bilan des différentes morts cellulaires d'après la classification de l'ECDO d'après Kroemer et al.

La classification selon les paramètres biochimiques et morphologiques confirme que certaines caractéristiques (ou marqueurs) peuvent être retrouvées dans plusieurs morts cellulaires (Tableau 5).

MORT	Nécrose	Apoptose	Anoïkis	Autophagie	Cornification
Programmée	-	+	+	+	+
Membrane	perméable	Intact PS	Intact PS	Intact PS	Intact
Condensation Chromatine	-	+	+	-	-
Tissu spécifique	-	-	Cellule adhérente	-	Kératinocyte

Tableau 5 : Exemples de morts cellulaires en fonction des paramètres morphologiques et biochimiques. Abréviations: Phosphatidylsérine (PS).

Il est certain aujourd'hui qu'une seule analyse morphologique ou un seul paramètre biochimique ne suffit pas à reconnaître et identifier spécifiquement une mort cellulaire.

III.B. L'apoptose ou la mort programmée

Le terme d'apoptose est apparu avec les études de Kerr et Wyllie en 1972. Depuis, de nombreuses études ont caractérisé les mécanismes impliqués, ce qui fait d'elle la mort la plus étudiée et la mieux décrite actuellement. L'apoptose a un rôle indispensable dans le contrôle du nombre de cellules et dans l'élimination des cellules anormales ou dysfonctionnelles. Cette mort programmée de type I est donc nécessaire à l'homéostasie de l'organisme.

Il existe trois voies d'activation de l'apoptose : les voies intrinsèques et extrinsèques, les caspases dépendantes et une voie bien moins connue, la caspase indépendante, passant par les facteurs AIF (Apoptosis Inducing Factor) et l'EndoG (Endonuclease G) qui migrent dans le noyau et participent à la condensation de la chromatine et à la fragmentation de l'ADN (Figure 26).

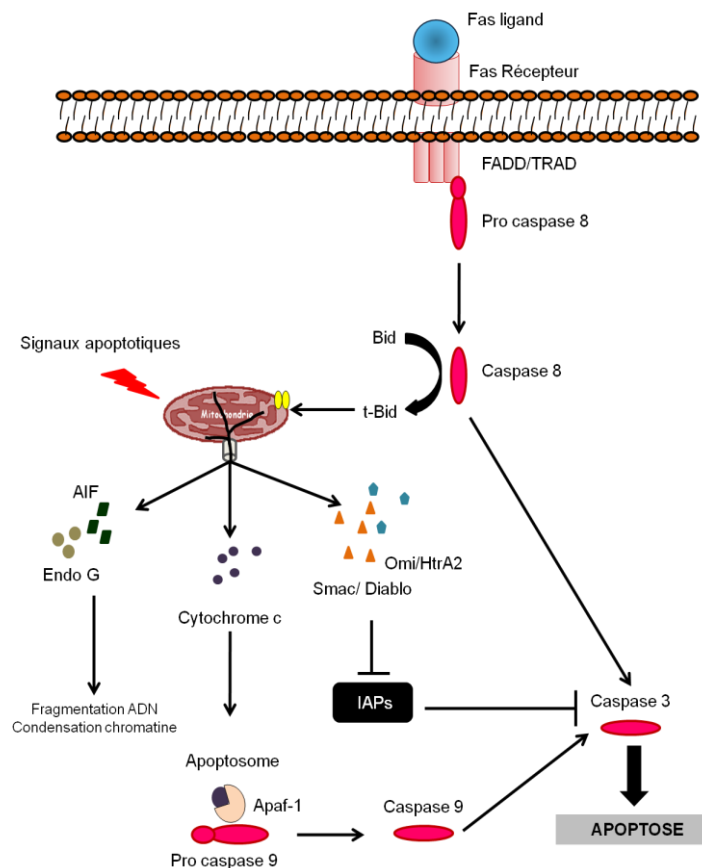


Figure 26 : Schématisation des trois voies conduisant à l'apoptose.

III.B.1 La voie extrinsèque

La voie extrinsèque dépend exclusivement des récepteurs de mort^{259 260}. Ces récepteurs de type I font partie de la super famille des récepteurs TNF (Tumor necrosis factor, TNFR1, Fas et TRAIL). Ils sont constitués de deux parties : un domaine extracellulaire permettant la fixation de leur ligand et un domaine conservé intracellulaire possédant un domaine DD (Death Domain) qui s'associe avec les complexe FADD (Fas Associated Death Domain) ou TRADD (TNFR Associated Death Domain). Ils sont activés suite à la fixation de leur ligand comme par exemple le TNF α (TNFR1), FasL (Fas), DR4 et DR5 (TRAIL) entraînant la formation d'un complexe DISC (Death Induced Signaling Complexe) suite au recrutement des caspases initiateurs 8 ou 10.

Des études chez la souris ont montré que des KO (Knock Out) Fas^{-/-}, TNFR1^{-/-} entraînaient un syndrome lymphe-prolifératif et l'inhibition du développement de certains organes lymphoïdes suggérant que cette voie coordonne la lymphopoïèse. Quant au KO TRAIL^{-/-}, bien que les souris soient viables, une diminution des défenses anti-tumorales a été observée confirmant que cette voie est principalement impliquée dans la formation et la fonction des cellules immunes²⁶¹.

III.B.2 La voie intrinsèque

III.B.2.a La famille Bcl-2 : des régulateurs de l'apoptose

Il existe 20 protéines différentes de la famille Bcl-2 chez les mammifères. Elles possèdent toutes des domaines homologues à la protéine Bcl-2 : les domaines BH (Bcl-2 Homology Domain). Elles peuvent être classées en trois grands groupes :

III.B.2.a.1 Les protéines anti-apoptotiques cytoplasmiques

Ces protéines anti-apoptotiques, Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, ont toutes une région C-terminale hydrophobe qui leur permet de s'ancrer à la membrane des organites et ont une homologie de séquence pour 4 domaines BH (Bcl-2 Homology Domain) à l'exception de la protéine Mcl-1

qui n'en possède que 2²⁶²⁻²⁶³⁻²⁶⁵. Les domaines BH1, BH2, BH3 permettent l'interaction avec d'autres protéines BH3 et le domaine BH4, moins conservé, semble interagir avec des protéines régulatrices de l'apoptose comme l'Apaf.

III.B.2.a.2 Les protéines pro-apoptotiques à domaine BH3 seulement

Ces protéines pro-apoptotiques à domaine BH3 seul (BH3 only proteins : BH30P) comme la protéine Bim, Bad, Noxa, Puma, sont décrites comme étant les sensibilisateurs à l'apoptose. Elles sont capables de lier toutes les protéines anti-apoptotiques. Dans la LMC, Bim est une protéine indispensable à l'apoptose induite par l'imatinib^{268,269} (Figure 27).

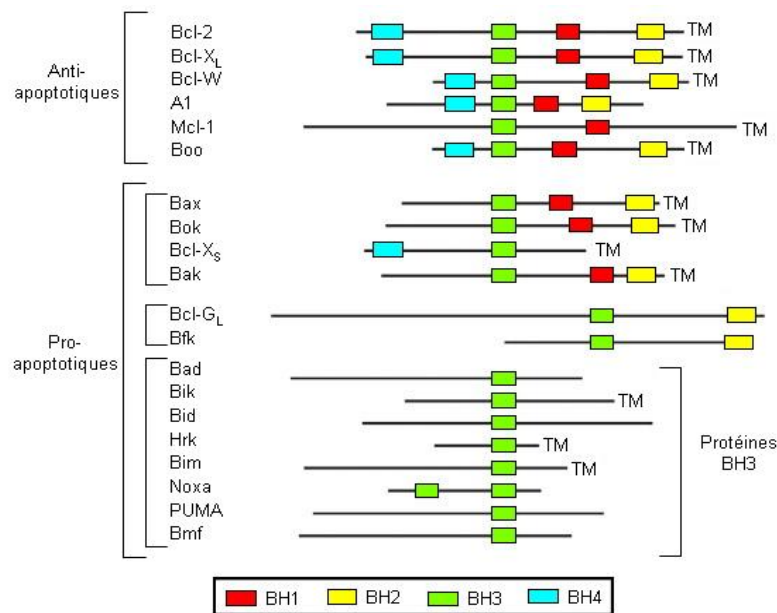


Figure 27 : Schéma de la structure des protéines de la famille Bcl-2.

Toutes les protéines de la famille Bcl-2 possèdent le domaine BH3, qui permet les interactions entre les protéines pro-apoptotiques. A l'état normal, les effecteurs de l'apoptose : Bak et Bax sont inhibés dans le cytoplasme par les protéines anti-apoptotiques. Les protéines pro-apoptotiques à domaine BH3 seul sont également inactivées, soit par interaction avec les protéines anti-apoptotiques, soit par des mécanismes de phosphorylation qui conduisent à leur séquestration ou à leur dégradation. La balance entre les protéines pro- et anti-apoptotiques penche ainsi en faveur de la survie. En cas de surexpression des protéines

pro-apoptotiques, la balance s'inverse. Dans ce cas, la majorité des protéines anti-apoptotiques sont inhibées. Cela permet la libération des effecteurs BAX et BAK, qui sont alors relocalisés au niveau de la membrane externe mitochondriale où ils s'hétérodimérisent pour former des pores permettant ainsi la libération des facteurs pro-apoptotiques inter-membranaires ²⁶³⁻²⁶⁵

La balance entre ces différentes protéines pro et anti-apoptotiques est primordiale dans la voie intrinsèque pour contrôler la perméabilité membranaire de la mitochondrie ²⁷⁰.

Dans les cellules Bcr-Abl, il a été montré que la surexpression de la protéine Bcl-2 participe au pouvoir transformant de Bcr-Abl. Cette surexpression de Bcl-2 est régulée par la voie Ras ^{115,271}. Récemment, il a également été décrit *in vitro* et *ex vivo*, une corrélation étroite entre la diminution du ratio Bax/Bcl-Xl et la progression de la LMC ²⁷².

III.B.2.b Rôle de la mitochondrie

Dans la voie intrinsèque de l'apoptose, la mitochondrie occupe une place centrale au niveau de laquelle converge de nombreux signaux tels que le stress cellulaire, les agents chimio thérapeutiques, les dommages à l'ADN, le stress du RE (Réticulum Endoplasmique), une privation en facteurs de croissance ^{273,274}.

L'apoptose intrinsèque débute par la modification de la perméabilité membranaire et donc l'ouverture de pores permettant la libération de facteurs apoptogènes. Ces pores peuvent se former suite à une hétéro-dimérisation des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak au niveau de la membrane externe de la mitochondrie. La libération des facteurs mitochondriaux peut également passer par des canaux de transition (PTP = Pore Transition Permeability) permettant ainsi la perméabilisation. Ces canaux sont régulés par les protéines Bax et Bad ²⁷⁵.

Des protéines comme le cytochrome c, Smac / Diablo, Omi / Htra2 localisées dans le compartiment inter-membranaire de la mitochondrie vont être libérées dans le cytoplasme.

Après relocalisation cytoplasmique, le cytochrome c s'associe à Apaf-1 et à la pro-caspase 9 pour former l'apoptosome. En présence d'ATP, ce complexe va entraîner une activation par clivage de la caspase 9^{276,277}. Smac / Diablo contribuent à l'activation de la caspase 3 en séquestrant les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAPs : XIAP, c-IAP)^{278,279}. De façon similaire, la sérine protéase Omi/HtrA2 a la capacité de lier et d'inhiber les IAPs (Inhibitors of Apoptotic Protein) dans le cytoplasme^{280,281}.

III.B.2.c Lien entre l'apoptose intrinsèque et extrinsèque

Il existe un « relais » entre les deux voies d'apoptose. La caspase 8, après activation par la voie des récepteurs de mort, est capable de cliver la protéine pro-apoptotique Bid. La forme tronquée de Bid est ensuite capable d'activer la protéine pro-apoptotique Bad, qui pourra s'associer aux protéines anti-apoptotiques Bcl-2 ou Bcl-xl, permettant la libération des effecteurs Bak, Bax et leur relocalisation à la membrane mitochondriale.

III.B.3 Les caspases comme exécuteurs de l'apoptose

III.B.3.a Structure et activation des caspases

Les caspases ont un rôle central à la fois dans le mécanisme de l'apoptose intrinsèque mais aussi dans la voie extrinsèque.

Ce sont des zymogènes (enzymes synthétisées sous forme inactive) dotés d'une activité cystéine-protéase qui clivent leurs substrats de façon stricte après un résidu aspartate²⁸². Jusqu'à présent 14 caspases, que l'on peut classer en trois groupes, ont été identifiées chez l'Homme. Les caspases du groupe I ont un rôle dans l'inflammation et la différenciation, celles du groupe 2 sont des caspases initiatrices de l'apoptose et le groupe 3 correspond aux caspases effectrices impliquées dans l'apoptose²⁸³ (Figure 28).

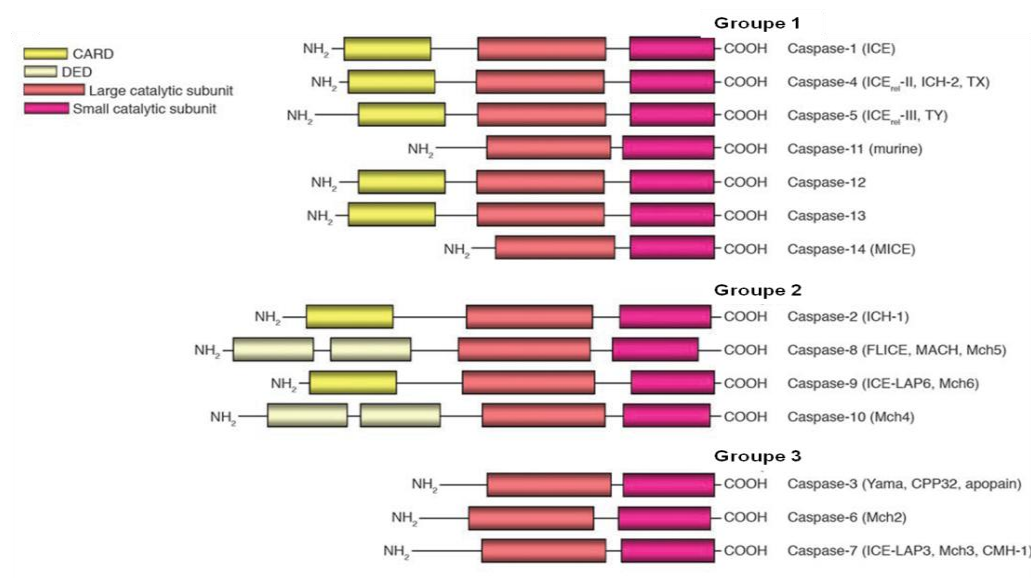


Figure 28 : Structure des caspases des groupes I, II et III.

Les abréviations : Caspase Recruitment Domain (CARD), Death Effector Domain (DED)

283

Les caspases impliquées dans l'apoptose peuvent être initiatrices ou effectrices selon leur structure. Elles possèdent toutes un prodomaine de taille variable en N-terminal suivi de 2 sous domaines catalytiques p20 et p10 en C-terminal.

Les caspases initiatrices 8 et 10 possèdent un prodomaine contenant deux régions DED (Death Domain) alors que les caspases 2 et 9 ont un domaine CARD (Caspase recruitment domain) ²⁸³. Ces deux domaines sont nécessaires au recrutement des caspases effectrices au niveau des récepteurs de morts permettant ainsi une auto activation protéolytique.

Les caspases effectrices 3, 6, 7 possèdent un prodomaine de petite taille. Elles sont activées par les caspases initiatrices ²⁸⁴⁻²⁸⁶.

III.B.3.b Les substrats des caspases

Les caspases ont de nombreux substrats impliqués dans la structure et le métabolisme de la cellule. Le clivage de leurs substrats est à l'origine des modifications morphologiques et biochimiques de la cellule apoptotique. Elles clivent aussi bien des protéines cytoplasmiques que nucléaires, des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, dans l'inhibition de l'apoptose ou dans la prolifération. Par exemple, le clivage de la protéine p21^{Waf1} (CDKI) par

la caspase 3 et 7 entraîne une perte de sa région en C-terminal possédant la séquence de localisation nucléaire et le site de liaison PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) ce qui empêche son rôle inhibiteur du cycle cellulaire²⁸⁷⁻²⁸⁹. Les caspases peuvent également cliver la Poly-ADP ribose polymérase (PARP) entraînant une inhibition de la réparation de l'ADN²⁸⁵ (Tableau 5).

Classe de protéines	Exemples
Protéine Adhésion	β -caténine, E-cadhérine
ADN	PARP, ATM
Cycle Cellulaire	p21Wif1, p27Cip1, Rb
Transduction du signal	PKC, AKT, NFkappa B
Protéines régulatrices de l'apoptose	Bcl2, Bcl-Xl, Bid, c-IAP, Procaspase

Tableau 6 : Liste non exhaustive des substrats des caspases effectrices.^{290,291}

III.B.4 Les autres molécules impliquées dans l'apoptose

La mitochondrie est également capable de libérer des protéines apoptogènes indépendantes des caspases, à travers des mécanismes mal connus. Le facteur AIF (Apoptosis inducing factor) et l'endonucléase G (Endo G) vont se localiser dans le noyau et induire une condensation de la chromatine et une dégradation de l'ADN²⁹²⁻²⁹⁴

Les caspases peuvent être inhibées par les IAPs (inhibitor of apoptosis proteins) comme XIAP ou c-IAP1/2. Ces protéines se fixent à la forme clivée active des caspases, empêchant la cascade protéolytique. Les protéines de la famille des IAPs ont des affinités différentes pour les caspases, en fonction de leur composition

Les protéines Smac / Diablo et HtrA2/Omi sont des protéines mitochondriales relocalisées au niveau du cytoplasme durant l'apoptose mitochondriale. Elles contribuent à l'activation des caspases en séquestrant les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAPs : XIAP, c-IAP) ^{278,279} Suzuki Y, 2001 #15,281.

III.B.5 La protéine p53

La protéine p53 est le premier suppresseur de tumeur identifié, connu comme le gardien du génome. Son rôle dans la protection de l'organisme a été mis en évidence chez des souris déficientes pour p53 pour qui une augmentation de tumeurs spontanées a été observée ²⁹⁵. De plus, c'est une protéine que l'on retrouve mutée ou inactive dans 50% des cancers. La p53 appartient à une famille de facteurs de transcription comprenant également la p63 et la p73 beaucoup moins bien étudiées. Son activation peut se faire suite à divers stimuli notamment l'hypoxie, les dommages à l'ADN ou encore l'activation par les oncogènes. Son rôle dans la cellule est multiple, par exemple, elle peut activer la transcription de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire (p21), dans la prolifération mais également dans l'apoptose (Bax, Fas, TRAIL) et la sénescence. Elle possède de nombreuses cibles comme des gènes codant pour les protéines de la famille Bcl-2 (Bax, Noxa, Puma), les récepteurs de morts (Fas, TRAIL), des protéines impliquées dans la machinerie apoptotique comme par exemple Apaf1 ou encore la caspase 6. On sait que les voies apoptotiques passant par les facteurs AIF et l'endoG restent caspases et p53 indépendantes.

D'autres voies sont également possibles, en effet p73 est capable d'induire l'apoptose en surexprimant l'expression de Bax et PUMA dans les cellules ²⁹⁶. Dans les cellules qui expriment c-Abl, l'irradiation induit une phosphorylation d'ATM (Ataxia-telangiectasia-mutated) corrélée à une augmentation de l'expression de p73 ce qui conduit à un arrêt du cycle cellulaire ou à l'apoptose ⁵².

III.B.6 Les modifications morphologiques d'une cellule apoptotique

Une cellule qui meurt par apoptose n'est pas nuisible à son environnement puisqu'elle se détache de ses cellules voisines. Elle dégrade son contenu cellulaire (ADN, protéines) et va

former des corps apoptotiques. C'est une mort cellulaire rapide qui n'entraîne aucune réaction inflammatoire. La cellule apoptotique commence par condenser sa chromatine et fragmenter son noyau. Elle va ensuite modifier sa membrane par un processus de « flip-flop » qui permet l'exposition des phosphatidylsérines à la surface de la cellule mais elle va cependant rester intacte. Le volume cellulaire va diminuer suite à une condensation du corps cellulaire et ce dernier va se fragmenter pour former des vésicules ou corps apoptotiques. Ces corps apoptotiques vont être totalement éliminés par les macrophages (Figure 29).

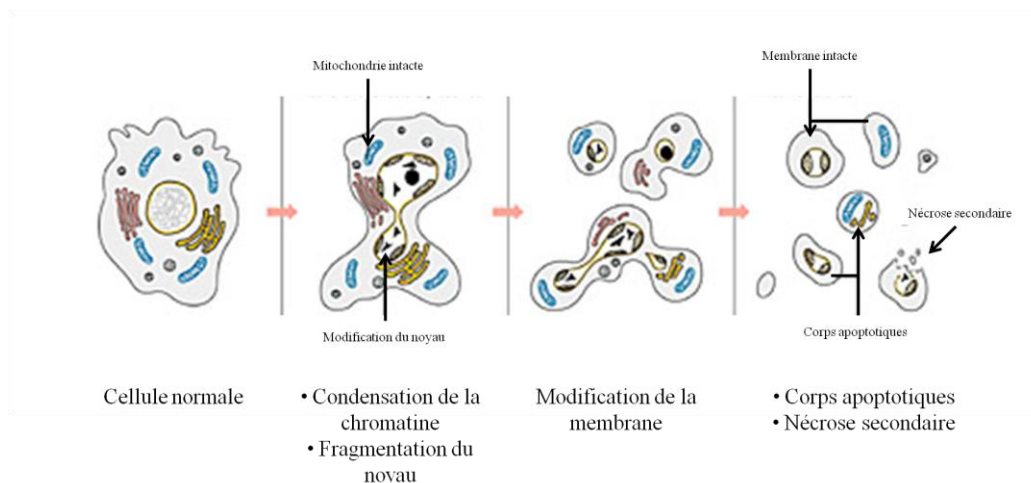


Figure 29: Les grandes étapes du changement morphologique d'une cellule apoptotique.

III.B.7 Les pathologies associées à un défaut ou à un excès d'apoptose

L'apoptose est donc un mécanisme à part entière nécessaire pour le développement et le bon fonctionnement de l'organisme. Un excès ou un défaut d'apoptose a des effets désastreux sur l'organisme²⁹⁷ (Tableau 6).

De nombreux exemples illustrent le rôle essentiel de l'apoptose dans l'homéostasie que ce soit au cours de l'embryogenèse, du développement ou des différentes fonctions cycliques (lactogenèse, sélection clononale immunologique...). A l'opposé, un défaut d'apoptose peut être catastrophique et l'exemple le plus adapté est celui du cancer. Un cancer est un ensemble de cellules qui malgré leurs anomalies vont résister à leur élimination (par apoptose) et continuer à proliférer dans l'organisme. Cependant, un excès d'apoptose n'est pas moins

préjudiciable pour l'organisme. Par exemple, la maladie d'Alzheimer est due à une accumulation du peptide β -amyloïde, une protéine qui inhibe Bcl-2 et active la protéine pro-apoptotique Bax ce qui génère un excès d'apoptose des neurones^{298,299}.

	Maladies	Apoptose
Cancers	Lymphomes, Leucémies, Mélanomes etc	Déficit
Maladies Neuro- dégénératives	Parkinson, Alzheimer, Huntington	Excès
Désordres Immunitaires	SIDA, Diabète, thyroïdite Maladies auto-immunes (herpes)	Excès Déficit
Autres	Vieillissement Ischémie (infarctus du myocarde)	Excès

Tableau 7 : Pathologies liées à un défaut ou à un excès d'apoptose.³⁰⁰

III.C. La nécrose

La nécrose ou mort de type III a longtemps été considérée comme une mort accidentelle suite à des conditions environnementales ou à des anomalies génétiques extrêmes telles que les brûlures ou l'irradiation³⁰¹. On a longtemps pensé que la nécrose était un mécanisme de mort passif ne nécessitant aucune synthèse de protéine et donc utilisant un minimum d'énergie. On a également cru qu'une cellule nécrotique ne possédait aucune similarité biochimique avec une cellule apoptotique ou autophagique.

Malgré ces idées, de multiples études amènent aujourd'hui à un tout autre point de vue. Nous discuterons un peu plus loin, du point de vue récent soutenant l'existence d'une nécrose régulée importante dans l'homéostasie cellulaire.

III.C.1 Les modifications morphologiques d'une cellule nécrotique

Une cellule nécrotique subit un véritable « chaos ». Au début du processus nécrotique, la membrane cellulaire devient perméable, les organelles gonflent et sont lysés. La perméabilité membranaire est suivie d'une libération du contenu cytoplasmique qui entraîne une inflammation massive ayant des répercussions sur les cellules alentours. Une cellule nécrotique est identifiable par une augmentation de son volume cellulaire et une densité cellulaire qui diminue (Figure 30).

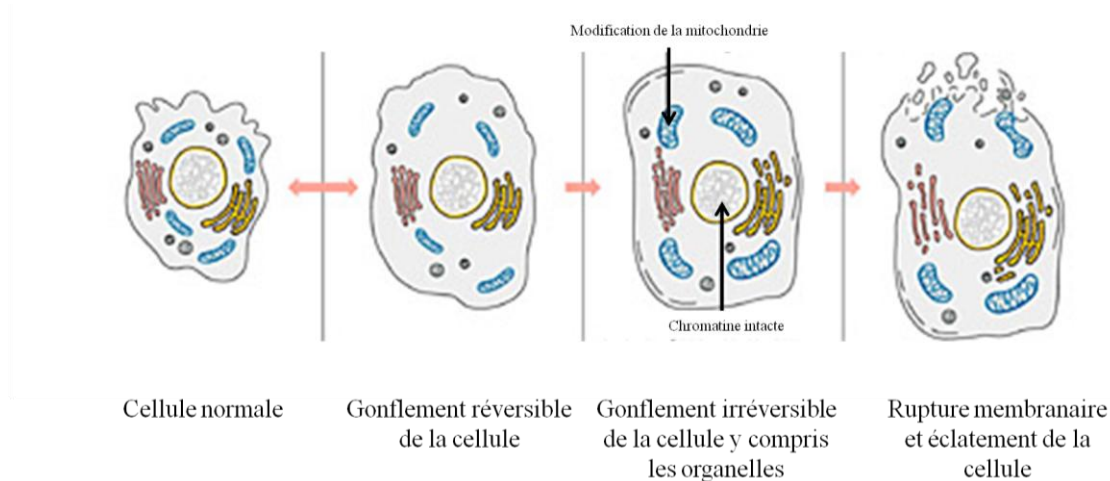


Figure 30 : Les grandes étapes du changement morphologique d'une cellule nécrotique.

III.C.2 La nécrose n'est pas qu'une mort accidentelle

Actuellement on distingue trois types de nécroses : la nécrose non programmée, la nécrose secondaire et la nécroptose³⁰².

Des études sur des organismes simples tels que la levure ou la drosophile ont été les premières à suggérer une voie de signalisation commune aux réponses nécrotiques. La nécrose cellulaire programmée serait donc une conséquence d'une signalisation aboutissant à une forme de suicide cellulaire en réponse aux perturbations intracellulaires ou extracellulaires. De façon générale, les nécroses impliquent une hyperpolarisation mitochondriale et une rupture des membranes lysosomales et cellulaires.

III.C.3 La nécrose non programmée

On l'appelle également la nécrose accidentelle, qui survient quand les conditions environnementales de la cellule sont trop extrêmes (lésions physiques, radiations). Par exemple, l' H_2O_2 est capable d'induire de la nécrose suite à la permabilisation lysosomale³⁰².

III.C.3.a La nécrose « secondaire »

La nécrose secondaire est un phénomène post-apoptotique. On sait aujourd'hui qu'une apoptose massive des cellules avec une phagocytose insuffisante entraîne une réponse inflammatoire appelée «nécrose secondaire». Par exemple, une apoptose caspase dépendante induite par les récepteurs Fas, à long terme, va entraîner une perméabilité membranaire des cellules et une libération des caspases 3 et 7³⁰³.

III.C.3.b La nécroptose ou nécrose-like

La nécroptose est un terme utilisé depuis 1998 pour définir une mort cellulaire nécrotique qui survient suite à une stimulation apoptotique, seulement dans le cas où les caspases sont inactives. En effet, on assiste à un « shift » des voies apoptotiques vers des voies nécrotiques aboutissant à une morphologie cellulaire entièrement ou partiellement nécrotique. Par exemple, la stimulation du récepteur Fas en absence d'apoptose conduit à la nécrose cellulaire³⁰⁴. Elle est caractérisée par sa dépendance à la sérine thréonine kinase RIP1^{258,305}.

Le rôle de RIP1 dans la nécrose est encore débattu car il semble dépendre du contexte cellulaire. Une stimulation du récepteur TNF ou Fas entraîne une réponse nécroptotique de la cellule dépendante de RIP1 en absence d'apoptose. Cette protéine est donc activée directement lors de la stimulation d'un récepteur de mort mais immédiatement inactivée par la caspase 8. Si la caspase 8 est non activée ou si elle est non fonctionnelle alors la kinase RIP1 va activer la voie NF κ B et induire la nécrose³⁰⁶. RIP1 peut également être activée suite à un dommage à l'ADN, et cible dans ces conditions, la protéine Jun qui va agir sur la

perméabilité membranaire de la mitochondrie. Cette kinase semble donc être incontournable dans la régulation des étapes précoces de la nécroptose (Figure 31).

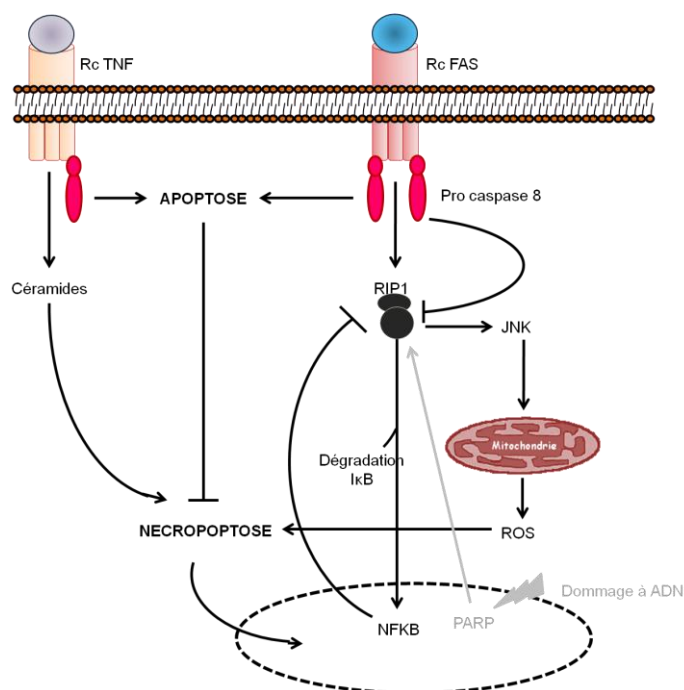


Figure 31 : Schéma et bilan des mécanismes moléculaires connus lors de la nécroptose.

Il semblerait qu'un programme nécrotique existe dans les cellules selon les conditions environnementales. Nous savons actuellement que la cyclophiline D dans les fibroblastes ou les hépatocytes entraîne une résistance à la mort nécrotique induite par les ROS^{307 308 309}. Le rôle du calcium semble également très important notamment pour la production des ROS au niveau de la mitochondrie et l'activation des phospholipases essentielles dans la lyse des organelles et de la membrane cytoplasmique. On sait également que les protéases comme les calpaïnes ou les cathepsines s'activent en présence de calcium et ont un rôle dans la perte de l'intégrité membranaire³¹⁰ (Figure 32).

Dans les cellules de LMC, les ITK induisent de l'apoptose. En 2004, une étude rapporte que l'inhibition des caspases (par un inhibiteur pan caspase : Zvad) n'était pas suffisante pour bloquer la mort cellulaire induite par l'imatinib suggérant l'existence de morts caspases indépendantes. Dans ces conditions, les cellules présentaient une morphologie nécrotique.

Cette nécrose-like était indépendante des caspases et impliquait la sérine protéase Omi / HtrA1³¹¹.

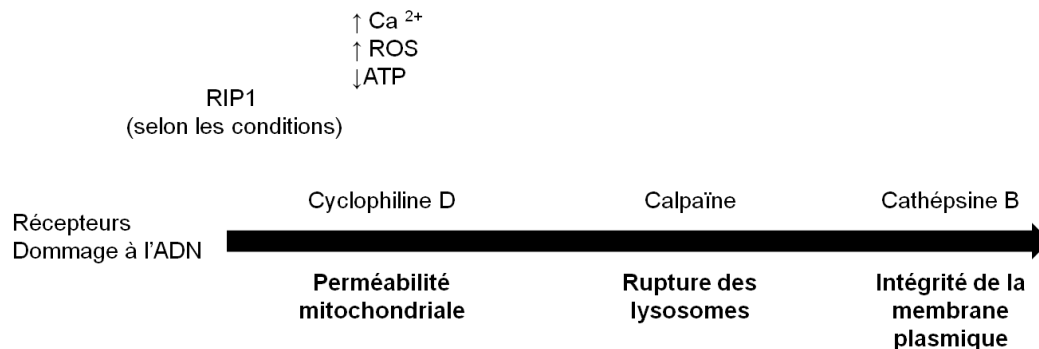


Figure 32 : *Hypothèse de la cascade d'évènements impliqués dans la modification morphologique de la cellule au cours de la nécroptose d'après Golstein, et al.*

III.D. La sénescence

La sénescence est un état irréversible d'arrêt du cycle cellulaire induit par différents stimuli exogènes ou endogènes. Il existe deux types de sénescences : la sénescence répllicative et la sénescence accélérée.

III.D.1 Sénescence répllicative

La sénescence a été pour la première fois décrite par l'équipe de Hayflick en 1965 sur des fibroblastes *in vitro* qui présentaient une augmentation du temps de division au fur et à mesure du temps de culture³¹². Cette diminution de la capacité de la cellule à se diviser a été expliquée par un raccourcissement des télomères à chaque division ce qui entraîne un blocage irréversible du cycle cellulaire en phase G1³¹³. De façon générale, les télomères préviennent la dégradation ou toutes fusions des extrémités des chromosomes. Ce mécanisme a été associé *in vivo* à un vieillissement de la cellule par une érosion télomérique qui aboutit à la mort cellulaire.

III.D.2 Sénescence accélérée

La sénescence accélérée se traduit également par un arrêt irréversible du cycle cellulaire mais suite à un stress de la cellule : un stress oxydatif, un dommage à l'ADN, un stress par des agents thérapeutiques ou encore un stress oncogénique. Bien qu'elle ne puisse pas être distinguée de la sénescence répliquative son induction n'est pas associée au vieillissement et à un raccourcissement télomérique.

La sénescence accélérée induite par les oncogènes : l'OIS (Oncogene-Induced Senescence) a une place importante dans la protection de l'organisme contre les cancers. En effet, l'OIS empêche la prolifération de cellules anormales dans la phase précancéreuse comme cela a été montré dans des modèles de sénescence induite par l'oncogène Ras³¹⁴. L'oncogène Ras, quand il est activé constitutivement, entraîne un arrêt irréversible du cycle cellulaire et une entrée en sénescence *in vitro* des cellules³¹⁴. La présence de cellules tumorales sénescents a ensuite été confirmée *in vivo* chez la souris et dans des tumeurs humaines³¹⁵⁻³¹⁹.

III.D.3 Les voies de signalisation

Les voies de signalisation impliquées dans la sénescence sont encore mal comprises. Cependant, des études ont permis de mettre en évidence le rôle de plusieurs protéines.

III.D.3.a Les protéines CDKI (Cyclin Dependant Kinase Inhibitor)

La sénescence s'accompagne d'une inhibition de la prolifération par un arrêt irréversible du cycle cellulaire. Le cycle cellulaire se déroule en plusieurs phases : La phase G₀ correspondant à un état quiescent de la cellule, la phase de croissance G₁, la phase S de synthèse de l'ADN et la phase G₂/M durant laquelle la cellule condense son ADN et se duplique pour former deux cellules filles. Il existe des points de contrôles à la fin des phases G₁ et G₂ permettant à la cellule de vérifier l'état de son ADN. Comme vu précédemment, le passage d'une phase à une autre nécessite l'activation de serine/thréonine kinase, les cyclines dépendantes kinases (CDKs) *via* les cyclines. Par exemple, lors de la phase G₁, CDK2 vient se fixer sur la cycline E pour phosphoryler la protéine Rb. On a alors une libération du facteur

E2F indispensable à la transcription de gènes impliqués dans la phase G₁/S du cycle cellulaire (cycline E, cycline 1, thymidine kinase)¹⁵⁸. Cependant, les CDK sont régulées par des protéines inhibitrices que l'on appelle les CDK Inhibiteurs. On trouve deux familles de CDKI : les CDKI INK4 (Inhibitor of CDK4) comme la p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C} et p19^{INK4D} et les CDKI p21^{WAF-1/Cip} (Cdk2 interacting protein), p27^{Kip1} et p57^{Kip2}.

Lorsqu'une cellule sort de la phase G₁, elle vérifie son état avant de passer dans la phase S. Si son état ne lui permet pas de poursuivre, les CDKI de la famille INK4 vont bloquer le cycle de manière irréversible et induire une sénescence. De manière similaire, le point de contrôle en début de phase S, peut conduire à un arrêt irréversible du cycle cellulaire par les CDKI KIP. Lorsque les CDKI sont surexprimées, elles vont se lier aux complexes CDK/Cycline entraînant ainsi un arrêt du cycle cellulaire.

III.D.3.b Les protéines Rb et p53

En 1991, des études sur des fibroblastes humains immortalisés mettent en évidence le rôle de la protéine Rb et p53 dans l'entrée en sénescence des cellules (Figure 32).

Dans le cas d'une cellule sénescence, les CDKs vont être inhibées par les protéines CDKI (p16^{INK4a} et p21^{cip}). Les CDKs inactives vont favoriser la forme hypophosphorylée de Rb. Ainsi, Rb va se lier au facteur E2F bloquant son rôle dans la régulation de l'expression des gènes nécessaires à l'entrée en phase S. Ceci entraîne, selon les conditions et les cellules, des foci d'hétérochromatine associés à la sénescence (SAHF)³²⁰⁻³²².

L'activation de la p53 peut se faire par sa phosphorylation *via* ATM actif lors d'un dommage à l'ADN pour induire la mort cellulaire³²³. Elle peut également être la cible de modifications post-traductionnelles par acétylation. Elle active ensuite la transcription de la protéine p21 qui va permettre la transcription de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et dans la sénescence^{314,324,325} (Figure 33).

Ces duos entre les protéines p16-Rb et p53-p21 sont souvent inactifs dans les cancers suggérant un rôle suppresseur de tumeur. Une inactivation de ces deux protéines (Rb et p53) chez l'Homme est retrouvée dans 50% des cancers. *In vitro*, une inactivation de p53 et Rb

entraîne une diminution et non un blocage de la sénescence ce qui suggère qu'elles ne sont pas les seules à être impliquées dans le mécanisme de sénescence³²⁶.

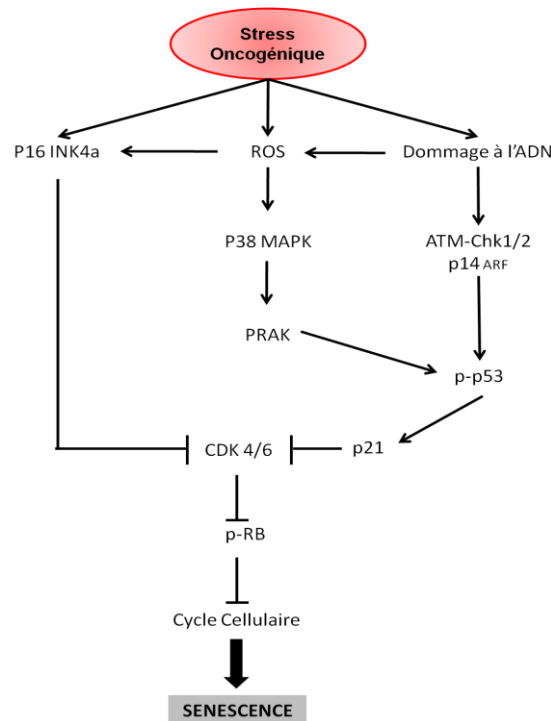


Figure 33: Schéma des voies de signalisation connues dans la sénescence induite par les oncogènes.^{321, 327,328}

Jusqu'à présent la sénescence était décrite comme dépendant de la protéine p53 ou p16. Cependant la sénescence peut être induite *via* une activation de la p21 indépendamment de p53³²⁹. La protéine p21 peut être activée par des facteurs de transcription comme par exemple E2F ou STAT. D'autres études tendent à mettre en évidence le rôle de p38MAPK dans la sénescence p53 indépendante induite par des dommages à l'ADN. Nous verrons dans la partie résultat que l'OIS peut être induite dans des cellules leucémiques déficientes pour la protéine p53 et délétées pour le locus p16.

III.D.3.c Rôle des ROS intracellulaires

Des études sur des fibroblastes de souris ont montré que la sénescence induite par les oncogènes était liée aux dommages à l'ADN causés par une augmentation des ROS^{327,330,331}.

L'augmentation des ROS stimule la voie p38MAPK et l'activation de p53 *via* la protéine kinase PRAK, un substrat des p38 MAPK^{328,332}.

Cependant, comme c'est le cas pour les SAHF, tous les oncogènes n'induisent pas de ROS comme par exemple l'oncogène Myc qui induit majoritairement de l'apoptose³³³.

Récemment, l'implication des protéines chaperonnes dans l'inhibition de la sénescence a été mise en avant notamment avec la protéine Hsp72 qui lorsqu'elle est inhibée permet de bloquer l'OIS p53-dépendante (voie PI3K impliquée) et p53-indépendante (notamment *via* l'oncogène Ras activant la voie ERK)^{334,335}.

La sénescence semble donc avoir un rôle anti-tumoral du moins dans les tumeurs pré-malignes.

III.D.4 Les modifications morphologiques et biochimiques de la cellule sénescence

La cellule subit des changements structuraux et biochimiques lors de son entrée en sénescence.

Une cellule qui entre en sénescence va être identifiable morphologiquement par sa forme aplatie et son importante vacuolisation. Le nombre de lysosomes augmente massivement et des vésicules se forment. Ceci est visible au microscope électronique mais également en cytométrie en flux par une augmentation de la granularité et de la taille cellulaire. On retrouve dans le noyau de ces cellules des foci d'hétérochromatine, les SAHF. Les SAHF sont le résultat d'une condensation de chromosome dépendante de la protéine ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3 related) qui va conduire à renforcer la sénescence des cellules. Ce complexe est constitué de protéines de l'hétérochromatine (HP1, H2A, HMGA), et il est régulé par HIRA (Histone Repression A) et la protéine ASF1a (AntiSilencing function 1a)³³⁶

³³⁷.

Lors de la sénescence, on peut observer une augmentation des protéines impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire comme p21, p53 ou encore p16 et une résistance à l'apoptose se met en place. Une des modifications des plus remarquables est l'augmentation de l'activité β -

galactosidase (SA- β -gal)³³⁸. La β -galactosidase est une enzyme lysosomale capable d'hydrolyser les β -D-galactoses en β -galactoside dans toutes les cellules. Son activité est optimale à un pH acide de 4 dans les cellules de mammifères. La β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β -gal) a un pH optimal de 6. En effet, *in vitro* elle est capable de cliver un de ses substrats, le X-gal, donnant ainsi une coloration bleue aux cellules sénescents. La sénescence peut alors être quantifiable en microscopie optique³³⁸. Bien que jusqu'à présent cette activité ne soit reliée à aucune voie de signalisation connue de la sénescence, elle reste l'un des marqueurs les plus utilisés.

Les cellules sénescents sécrètent également des cytokines, par exemple la PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor 1) ou les IL-6 et IL-8³³⁹. L'IL-1 α peut également être sécrétée, elle régule en amont l'IL-6 et IL-8³⁴⁰. La sécrétion de ces cytokines lors d'une sénescence induite par des dommages à l'ADN peut être indépendante de p53 et Rb³⁴¹. Cette sécrétion de cytokines peut avoir des conséquences sur les cellules avoisinantes. En effet, les cellules normales ou précancéreuses répondent à la sécrétion de ces cytokines par une entrée en sénescence alors que les cellules cancéreuses continuent leur progression dans la prolifération³⁴².

III.D.5 Les pathologies associées à la sénescence

La sénescence répllicative et accélérée peuvent toutes deux être à l'origine de pathologies. La sénescence peut être à l'origine de syndrome de vieillissement accéléré.

La maladie de Hutchinson-Gilford est une pathologie génétique très rare caractérisée par un vieillissement prématuré³⁴³. L'individu malade vieillit de façon accélérée : sclérose, apparition de cheveux blanc, les os se déforment, athérosclérose. Une autre maladie très connue est la maladie de Werner qui se caractérise par un vieillissement prématuré dû à une sclérodermie atrophique, c'est-à-dire par un épaissement atrophique des téguments. Des tumeurs cutanées et une cataracte se développent assez fréquemment³⁴⁴.

D'autres maladies causées par une sénescence accélérée existent. Par exemple, l'anémie aplasique est due à une production insuffisante de cellules sanguines au niveau de la moelle osseuse consécutive d'une mutation dans le gène HTR (Human Telomerase RNA). L'ataxie

télangiectasie est une pathologie causée par une absence ou une mutation dans le gène ATM ce qui provoque des incoordinations des mouvements avec une dégénération du cerveau, une dilatation des vaisseaux sanguins et un développement de cancers du sang (leucémies, lymphomes).

La sénescence est donc un mécanisme très important dans le vieillissement cellulaire mais également pour son rôle anti-tumoral dans l'organisme.

III.D.6 Un paradoxe entre anti et pro-tumoral

La sénescence par ses propriétés inhibitrices sur la prolifération joue un rôle anti-tumoral important. Cependant, son rôle *in vivo* reste très discuté. Des études sur la sécrétion de facteurs tels que des cytokines pro-inflammatoires et les métalloprotéinases agissant sur le micro-environnement montrent que la sénescence peut parfois avoir des effets pro-tumoraux sur les cellules avoisinantes^{345 346,347}. Par exemple, des cellules épithéliales pré-malignes en présence de fibroblastes sénescents *in vivo* et *in vitro* se transforment en épithéliums mésenchymateux traduisant un état métastatique et donc cancéreux. Cet effet négatif sur les cellules avoisinantes est dû à la sécrétion de facteurs, notamment la MMP-3, une métalloprotéase sécrétée par les cellules stromales, capables de dégrader les protéines de la MEC^{348,349}. D'autres facteurs comme l'IL-6 sécrétée par les cellules sénescents semblent avoir un double rôle : anti-tumoral puisqu'elle est nécessaire à l'initiation de la sénescence et pro-tumorale par son rôle dans l'invasion cellulaire³⁵⁰. L'IL-8, également reconnue pour être un facteur sécrété par les cellules sénescents, est également associée à de nombreux cancers (cancer du sein, cancer du colon, cancer gastrique, cancer du foie, les LAM et certains lymphomes). Chez la souris, une surexpression d'IL-8 provoque une prolifération des cellules tumorales et favorise la migration cellulaire³⁵¹.

La synthèse de ces différentes études montre bien que la sénescence, bien qu'elle soit une possible stratégie thérapeutique attractive, ne doit pas être vue comme une stratégie acquise. Il est actuellement nécessaire de prendre en compte son rôle potentiellement pro-tumoral. La sénescence serait donc une solution anti-tumorale à envisager notamment dans les étapes

précancéreuses. En effet, l'accumulation de certains facteurs sécrétés, nécessaires en premier lieu à l'entrée en sénescence des cellules, peut à long terme affecter les cellules avoisinantes et donc être néfastes.

III.E. L'Autophagie

L'autophagie signifie en grec « se manger soi-même », voilà un bien intrigant phénomène. C'est une voie majeure de catabolisme lysosomal qui permet de dégrader les macromolécules et certains organites cellulaires contribuant ainsi à l'homéostasie cellulaire. L'autophagie cellulaire assure, par la digestion des constituants cellulaires (cytoplasme, protéines ou organites), l'approvisionnement de la cellule dans des conditions où les apports venant de l'extérieur ne sont pas suffisants. Ce mécanisme participe à la survie de la cellule mais peut aussi conduire à la mort par son emballement si une fois l'homéostasie rompue les morts cellulaires n'interviennent pas. On parle alors de mort autophagique.

Chez les eucaryotes, la dégradation des protéines peut se faire de deux façons distinctes : le protéasome permet la dégradation de protéines à une demi-vie courte par ubiquitination ou par des mécanismes dépendants des lysosomes comme l'autophagie pour recycler tout ou partie de la cellule notamment les protéines à longue durée de vie³⁵².

III.E.1 La dégradation par les lysosomes

Les lysosomes contiennent des hydrolases provenant du réticulum endoplasmique, des enzymes dont l'activité optimale est obtenue à des pH compris entre 3 et 5. Ces hydrolases (lipases, protéases, nucléases, glycosidases) dégradent des substances endogènes (déchets cellulaires dégradés par des lysosomes à l'intérieur de la cellule comme pour l'autophagie) mais également exogènes (des éléments extérieurs tels que les microbes sont dégradés par phagocytose). Les produits de cette dégradation dans le cas de l'autophagie vont servir à une nouvelle synthèse de protéines mais aussi pour fournir de l'énergie à la cellule.

III.E.2 Les différents types d'autophagies

Il existe trois grands types d'autophagie (Figure 34).

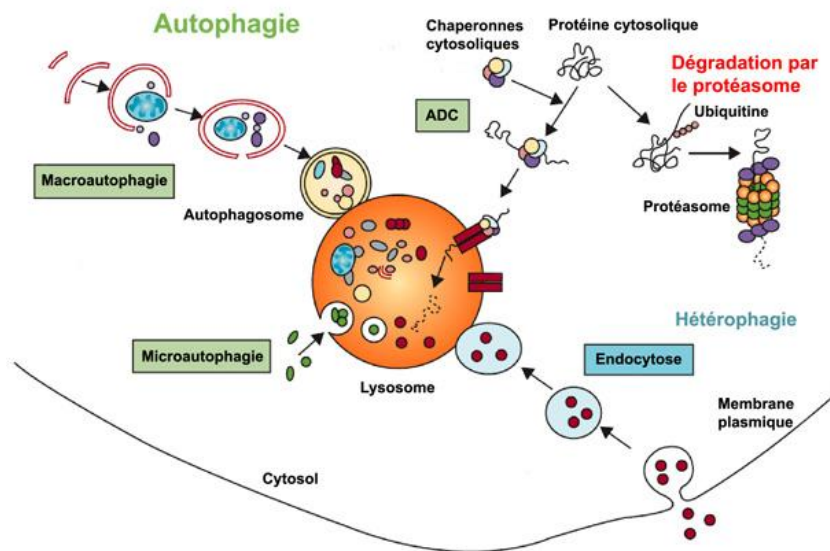


Figure 34 : Schéma des différents types d'autophagies d'après G.Rebboah sur le site Onco-Endocrinologie Nucléaire.

- **La micro autophagie** se fait directement au niveau du lysosome par une invagination de sa membrane pour séquestrer et dégrader une partie du cytosol de la cellule. Elle reste très mal connue mais semble ne pas répondre aux mêmes stimuli que les deux autres types d'autophagie. C'est un processus conservé depuis la levure jusqu'à l'Homme.

- **L'autophagie dépendante des chaperonnes** (CMA =Chaperone-Mediated Autophagy) est une forme sélective de dégradation retrouvée uniquement chez les mammifères. La CMA a un rôle important dans la survie de la cellule, notamment lors de la privation en nutriments, elle est source d'acides aminés. Elle peut également servir de contrôle qualité de la cellule lorsqu'elle est activée dans des conditions de stress oxydatif ou d'exposition à des toxines³⁵³.

L'entrée de la protéine dans le lysosome se fait par la reconnaissance d'un motif peptidique spécifique KFERQ par les protéines chaperonnes pour la transporter jusqu'au lysosome³⁵⁴. La protéine chaperonne Hsc70 a un rôle majeur dans la CMA, elle est la seule

protéine à pouvoir reconnaître le motif KFERQ ou KFERQ-like³⁵⁵. La protéine va se fixer à LAMP2A (Lysosome-Associated Membrane Protein type 2A) sur le lysosome. LAMP2A agit tel un récepteur des protéines sur la membrane du lysosome, c'est un facteur limitant de la CMA et son expression est augmentée suite à une activation de la CMA³⁵⁶. Une fois la protéine fixée, les LAMP2A vont former un complexe multimérique stabilisé par la protéine chaperonne Hsp90 qui va permettre la localisation puis la dégradation dans le lysosome de la protéine prise en charge *via* la protéine chaperonne Hsc70³⁵⁷.

- **La macro autophagie** est une des formes majeures de l'autophagie. Elle fait l'objet de nombreuses études pour ses rôles antagonistes dans le contrôle de la survie et de la mort cellulaire.

On la retrouve à un niveau basal dans la plupart des cellules contribuant ainsi à l'homéostasie cellulaire. Dans des conditions de stress (hypoxie, privation en nutriments, agents thérapeutiques...), l'autophagie est stimulée afin de dégrader certains constituants cellulaires (macromolécules, organites ou constituant altérés) pour les recycler, ce qui fait de l'autophagie un système efficace de survie et d'adaptation aux conditions environnementales de la cellule.

Dans les cellules de mammifères, ce mécanisme débute par la formation d'un phagophore (membrane intracellulaire) provenant du réticulum endoplasmique qui va se refermer avec le contenu cytoplasmique pour former une vacuole possédant une double membrane lipidique, l'autophagosome. Après maturation de cet autophagosome, sa fusion avec le lysosome forme l'autophagolysosome entraînant la dégradation de son contenu par les hydrolases. Ce mécanisme a longtemps été considéré comme un système de dégradation non sélectif. Cependant, il est capable de cibler des organites particuliers. Par exemple, la dégradation de la mitochondrie se classe sous le terme de mitophagie, celle du réticulum endoplasmique sous le terme de RE-phagie.

III.E.3 L'autophagie ou macroautophagie

III.E.3.a Formation de l'autophagosome

L'autophagie est initiée par la formation de membranes qui entourent le contenu cytoplasmique à dégrader puis fusionnent au niveau des extrémités pour former une vésicule à double membrane, l'autophagosome. L'origine du phagophore reste discutée mais des travaux impliquent le réticulum endoplasmique et la mitochondrie^{358,359,360}.

La formation de l'autophagosome nécessite l'implication de 18 protéines ATG (AuTophagy-related Gene) différentes. Les ATG ont été découvertes en 1990 chez la levure, ce qui a permis de comprendre l'importance de l'autophagie dans la physiologie et la physiopathologie. Actuellement, il existe une trentaine de protéines ATG identifiées chez la levure chacune ayant un rôle dans les différentes étapes de l'autophagie. La plupart de ces gènes ont une homologie chez le mammifère. Les protéines ATG lors de l'autophagie vont être recrutées dans le cytoplasme et vont s'associer de manière transitoire au phagophore puis à l'autophagosome avant d'être recyclées (Figure 35).

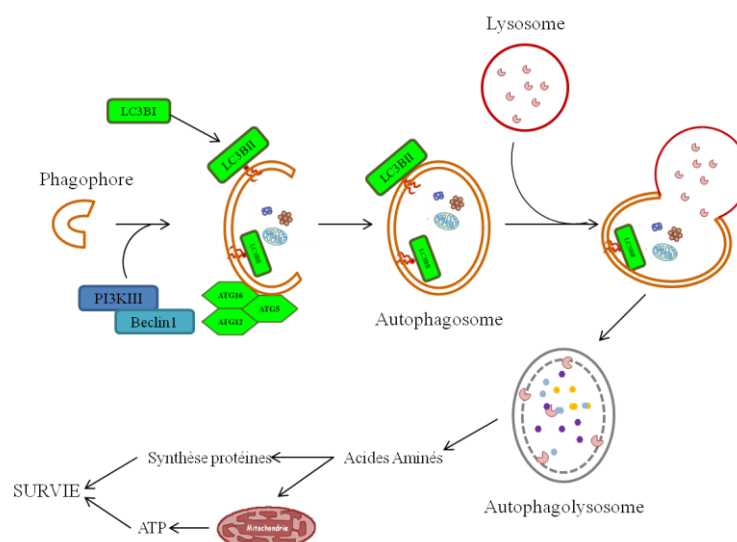


Figure 35 : Schéma du mécanisme d'autophagie.

III.E.3.b Initiation de l'autophagie par ULK1

La protéine ATG1, l'homologue de ULK1 chez le mammifère, est une sérine thréonine kinase indispensable à l'initiation de l'autophagie dans la dégradation d'organelles comme la mitochondrie^{361,362}. Chez la souris, la perte d'ULK1 n'a que peu d'effet car la kinase ULK2 compense la perte d'ULK1. ULK1 actif va phosphoryler les mAtg13 et FIP200 (Focal adhesion kinase family interacting protein qui est l'homologue de l'Atg17 chez la

levure) pour former un complexe de recrutement d'autres protéines ATG durant l'autophagie^{363,364}. De plus, une nouvelle protéine ATG, non conservée chez la levure a été identifiée récemment, l'ATG101 qui lie l'ATG13 permettant sa stabilisation^{364,365}.

Chaque membre du complexe ULK1/mATG13, FIP200 et ATG101 est nécessaire pour l'association du complexe à la membrane du phagophore. ULK1 peut également interagir avec des protéines moins essentielles au mécanisme d'autophagie comme par exemple p62/SQSTM1³⁶⁶.

L'autophagie est régulée négativement par mTOR, notamment par mTORC1 sensible à la privation en nutriments, qui empêche la phosphorylation de la protéine mATG13 et de ULK1^{365,367,368}. Comme mTOR inhibe l'autophagie, son inhibition par la rapamycine ou une déprivation en nutriments déclenche une réponse autophagique. En condition de privation en nutriments mTOR est inactif et les sites d'inhibition d'ULK1 et mATG13 sont déphosphorylés. ULK1 va alors pouvoir s'autophosphoryler et phosphoryler les protéines du complexe initiant la réponse autophagique. Dans certains cas pathologiques où l'apoptose est déficiente, la voie mTOR est activée ce qui diminue ou inhibe l'autophagie³⁶⁹ (Figure 36).

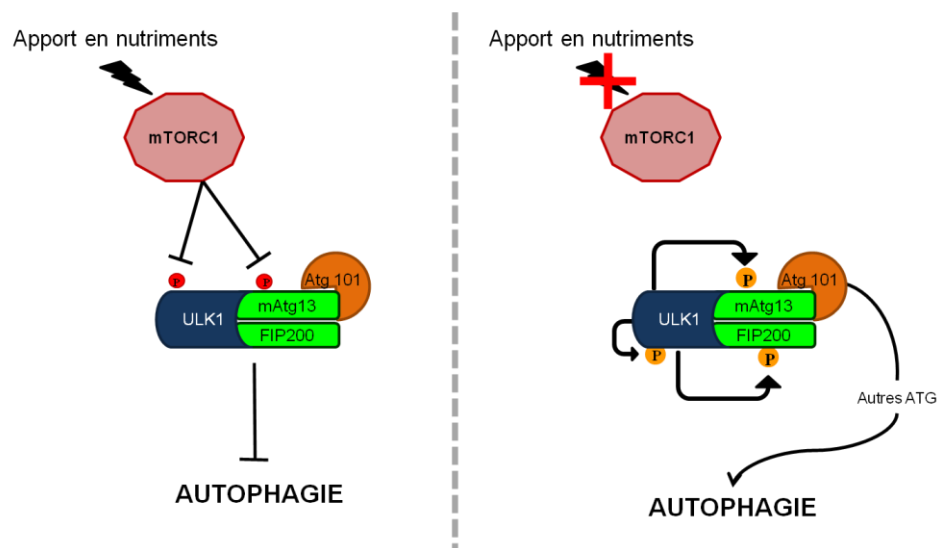


Figure 36: Régulation de l'initiation de l'autophagie par le complexe ULK1 dépendant de mTORC1.³⁶⁸

Cette étape d'initiation va favoriser le recrutement d'un second complexe dépendant de Béclin-1 (homologue de l'ATG6 chez la levure) dans la phase de nucléation.

III.E.3.c La nucléation régulée par le complexe Bécline-1/ATG7

La phase de nucléation c'est-à-dire la formation d'une membrane adaptée pour l'autophagosome, est régulée par Bécline-1 (homologue d'ATG6) et une PI3K de classe III (Vps34).

Bécline-1 est la première protéine décrite pour être indispensable à l'autophagie^{370,371}. Chez la souris, des études ont montré qu'une délétion de la protéine Béclin1 entraînait un arrêt du développement de l'embryon et une délétion d'un seul allèle augmentait la fréquence d'apparition des tumeurs, ce qui confirme le rôle suppresseur de tumeur de la protéine. Bécline-1 forme un complexe avec trois protéines (PI3K class III/VSP34 et VPS15) qui se lie à des protéines coactivatrices (UVRAG, Ambra1) capables de stimuler l'activité de la PI3K de classe III^{372,373}. Ce complexe est régulé par l'interaction de Bécline-1 avec des protéines de la famille de Bcl-2 telles que Bcl-2 elle-même et Bcl-xl³⁷⁴. La dissociation de Bécline-1 et de Bcl-2 est nécessaire à l'induction de l'autophagie.

III.E.3.d L'élongation du phagophore régulée par deux systèmes

L'élongation du phagophore implique deux systèmes d'ubiquitination dépendant des ATG³⁵² (Figure 37).

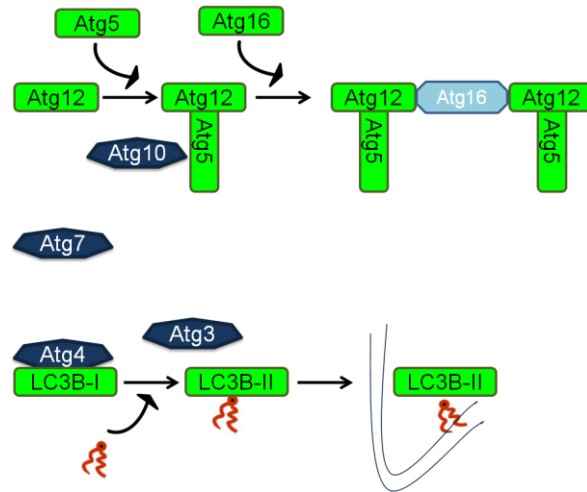


Figure 37 : Régulation de la nucléation du phagophore par les deux systèmes conjugués aux ubiquitine like Atg5/Atg12 et LC3B.

III.E.3.d.1 Le système ATG12-ATG5

L'ATG12 est conjugué à l'ATG5 de façon ATG7 dépendante pour former un complexe stabilisé par l'ATG16 qui va s'associer à la membrane du phagophore ³⁷⁵. Des études sur des souris KO ATG5^{-/-} ou ATG7^{-/-} ont confirmé leur rôle déterminant dans la formation de l'autophagosome. Ce complexe va favoriser la conjugaison du LC3B (Microtubule associated protein Light Chain 3) à la phosphatidyléthanolamine (PE).

III.E.3.d.2 Le système LC3B

La protéine LC3B-I initialement cytosolique est le seul marqueur spécifique de l'autophagosome. Elle est clivée par l'ATG4 pour exposer sa glycine en C-terminal de façon ATG7 (E1 enzyme) dépendante. L'ATG3 (ligase E2 spécifique du LC3B) va permettre la liaison covalente entre la glycine en C-terminal du LC3B-I et le groupe amino de la PE pour former le LC3B-II (L3CB-PE) localisé au niveau de l'autophagosome ³⁵².

III.E.3.e La fusion entre l'autophagosome et le lysosome

Lorsque l'autophagosome est formé, il va fusionner avec le lysosome et ainsi conduire à l'autophagolysosome. Dans cette étape, le cytosquelette (actine et microtubule) contribue à la maturation de l'autophagosome. La fusion est essentiellement régulée par deux protéines de l'endocytose, Rab7 et le LAMP1^{376,377}. L'autophagolysosome va dégrader le LC3B-II et son contenu cytoplasmique par les hydrolases acides³⁷⁸.

III.E.4 L'Autophagie est-elle un mécanisme de mort ?

L'autophagie est un mécanisme paradoxal entre survie et mort de la cellule. Le rôle premier de l'autophagie est, comme décrit précédemment, sans aucun doute la protection de la cellule contre un environnement inapproprié. Par exemple chez la souris, une invalidation du gène ATG5 conduit à la mort néonatale de la souris due à un défaut dans le métabolisme lors de la transition entre l'alimentation *via* le placenta et l'alimentation par le lait maternel³⁷⁵. Cependant, de nombreuses études tendent à montrer un mécanisme de mort cellulaire appelé « mort cellulaire programmée de type II » distincte de l'apoptose par son indépendance aux caspases. La mort autophagique serait due à un emballement de la machinerie autophagique qui conduirait la cellule à s'auto dégrader ou « s'auto-manger »³⁷⁸. Néanmoins cet aspect reste très discuté car la présence de marqueurs de l'autophagie lors d'une mort cellulaire ne prouve en rien que cette mort soit autophagique.

Le rôle de l'autophagie a commencé à être étudié par des approches pharmacologiques avec des inhibiteurs, le 3-MA, un inhibiteur de la PI3K ou par des approches d'invalidation de gènes essentiels comme ATG5, ATG7 ou Bécline-1. En 2004, une étude sur des fibroblastes de souris Bax^{-/-} et Bak^{-/-} déficientes pour l'apoptose traités à la staurosporine, mourraient par autophagie en réponse à différents stimuli (privation en nutriments, agents chimiothérapeutiques). La même expérience sur des fibroblastes sauvages ne montre aucune mort autophagique³⁷⁹. Des études en 2007, montrent que sur des cellules du cancer du sein résistantes à l'apoptose, une invalidation de Bcl-2 induisait une mort autophagique reversée par l'invalidation de Bécline-1 ou d'ATG5³⁸⁰.

On peut tout de même se poser la question de savoir si la mort autophagique existe dans des cellules dans lesquelles la machinerie apoptotique est fonctionnelle. N'est-ce pas une voie alternative dans les conditions où l'apoptose fait défaut ?

Depuis 2010, des études montrent, pour la première fois, que la mort autophagique est possible indépendamment de l'apoptose. Par exemple, *in vitro* dans les cellules de LMC ou *ex vivo* sur des cellules de patients atteints de LMC, un traitement au Resveratrol est capable d'induire une mort autophagique. En effet, bien que la composante apoptotique soit présente mais sans conséquence sur l'autophagie induite, l'inhibition de l'autophagie par des siRNA contre la protéine LC3 et p62 favorise la survie des cellules en présence de Resvératrol ³⁸¹. Une autre étude sur des cellules de cancer du sein ou de l'utérus confirme l'existence d'une mort autophagique induit par l'oncogène Ras. Dans leurs conditions expérimentales, Ras n'induit pas d'apoptose caspase dépendante mais un mécanisme d'autophagie corrélé à une augmentation de l'expression de la protéine BH3-only Noxa et de la protéine Bcl2-1. En bloquant, par siRNA, l'expression de ces deux protéines, l'autophagie est réduite et la survie des cellules est augmentée ce qui suggère que l'autophagie ici, a un rôle de mort cellulaire ³⁸². Actuellement, il n'existe pas de preuve directe de la mort autophagique *in vivo* dans les conditions physiologiques ou pathologiques chez les mammifères. Malgré tout, l'autophagie semble avoir une fonction de régulateur sur certaines morts cellulaires.

III.E.5 Les pathologies associées à un défaut d'autophagie

L'autophagie est un mécanisme omniprésent dans les cellules et elle est nécessaire, comme nous l'avons vu, à l'homéostasie cellulaire. Il est compréhensible qu'un dysfonctionnement du mécanisme soit lié à l'apparition de certaines pathologies.

Il est aujourd'hui bien décrit que l'autophagie a un rôle dans les maladies neuro-dégénératives comme la maladie d'Alzheimer, de Parkinson ou encore d'Hundginton. Elles sont toutes les trois caractérisées par une augmentation massive d'autophagosomes dans la cellule. Ce défaut de maturation de l'autophagosome empêche sa fusion avec le lysosome ce qui prévient la dégradation des protéines devenant toxiques pour les neurones ³⁸³.

Une maladie pulmonaire, la Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO), est associée à une augmentation de l'autophagie dans les cellules épithéliales suite à l'inhalation

de fumée de cigarette. L'augmentation de l'expression de certaines protéines de l'autophagie (LC3B, ATG4, ATG5 et ATG7) lors d'une BPCO est à l'origine d'une perte des cils de l'épithélium ³⁸⁴. L'asthme, faisant également partie des syndromes de détresse respiratoire aiguë, est associé à une augmentation de l'expression des protéines ATG.

De nombreuses autres maladies comme la maladie de Niemann-Pick, la fibrose pulmonaire, la néphrite tubulaire sont liées à un défaut d'autophagie. Les cancers sont aussi des exemples de dysfonctionnement de l'autophagie, on trouve fréquemment une surexpression de gènes liés à l'autophagie comme Beclin-1, ATG5, ATG12 dans les glioblastomes, le cancer du sein, le cancer de la prostate, les cancers gastriques ou colorectaux ³⁸⁵.

Une étude récente a également suggéré un rôle de l'autophagie dans les syndromes myélodysplasiques et dans la leucémie myéloïde chronique ³⁸⁶. Chez les souris ATG7^{-/-}, on observe une altération du maintien des cellules souches hématopoïétiques (CSH) qui aboutit à une anémie, une lymphopénie et une myéloprolifération caractéristiques des syndromes myélodysplasiques pouvant progresser vers une LAM. De plus, chez la souris la population CSH était caractrisée par une augmentation importante de la quantité de mitochondries et une augmentation du niveau de ROS et des dommages à l'ADN entraînant ainsi une prolifération et une apoptose accrues. Après 12 semaines, l'analyse des souris décédées a mis en évidence une infiltration de blastes myéloïdes dans certains organes ce qui peut être corrélé à des MDS et LAM. De plus, une inhibition de la voie mTOR, constitutivement active dans les LAM, diminue les propriétés clonogéniques des cellules LAM ³⁸⁶.

III.E.6 Autophagie et les morts cellulaires

III.E.6.a Les liens entre l'apoptose et l'autophagie

L'apoptose et l'autophagie sont deux mécanismes qui se régulent de façon réciproque négativement. En effet, plusieurs études mettent en évidence une signalisation présentant des acteurs communs entre ces deux mécanismes (Figure 38).

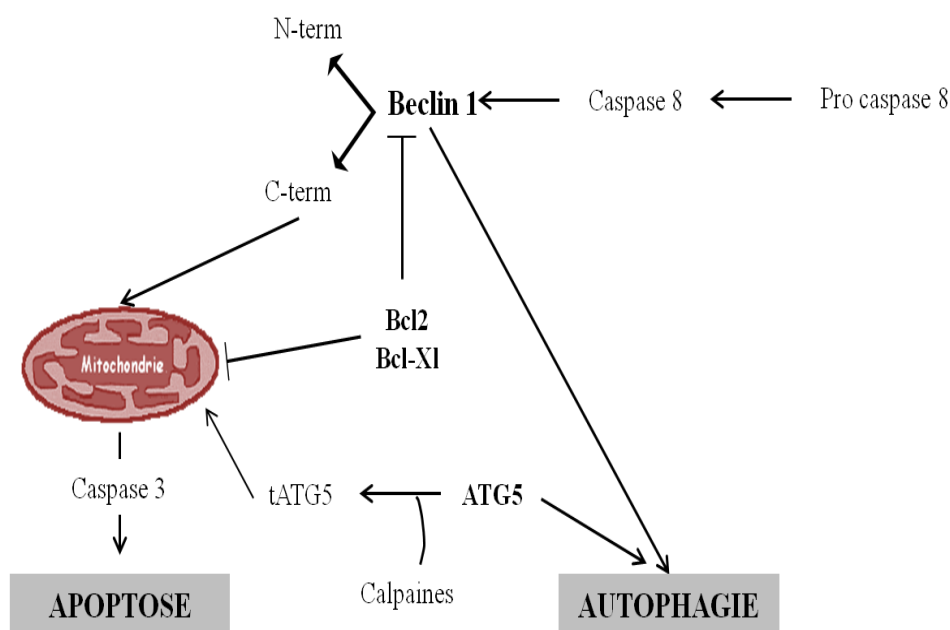


Figure 38: Exemple de voies de signalisations impliquées à la fois dans l'apoptose et l'autophagie d'après Kang, et al ; Davahen, et al.

L'exemple idéal du lien moléculaire entre l'apoptose et l'autophagie est l'interaction entre le domaine BH3 de Bécline-1 et la protéine Bcl-2. Comme décrit plus haut, Bcl-2 est une protéine anti-apoptotique alors que Bécline-1 même surexprimée est incapable d'induire l'apoptose^{387,388}. Bcl-2 et Bcl-xl sont deux protéines fréquemment surexprimées dans les cancers et elles ont un rôle à la fois anti-apoptotique et anti-autophagique. La phosphorylation par JNK de Bcl-2 permet, en favorisant la dissociation du complexe Bécline-1/Bcl-2, d'activer l'autophagie³⁸⁹.

Bécline-1 et la protéine ATG5 sont toutes deux des substrats des caspases 3, 7 et 8. Le clivage de Bécline-1 va former deux fragments (C-term et N-Term). Le fragment C-terminal va donner une nouvelle fonction pro-apoptotique à Bécline-1 qui va acquérir un rôle au niveau

de la mitochondrie³⁹⁰. L'ATG5 est comme décrit précédemment, une protéine indispensable au bon fonctionnement de l'autophagie dans la cellule mais peut également tenir un rôle dans l'apoptose. En effet, les calpaines sont capables de cliver ATG5³⁹¹. Cette forme tronquée d'ATG5 va perdre son pouvoir pro-autophagique et va alors interagir au niveau de la mitochondrie avec la protéine anti-apoptotique Bax, favorisant ainsi la libération du cytochrome c pour induire l'apoptose^{392 393 390,394}. Ceci a été confirmé par l'équipe de Codogno, en surexprimant ATG5, montrant ainsi qu'ils étaient capables de sensibiliser à nouveau la cellule cancéreuse à l'apoptose³⁹⁵.

En 2009, l'équipe de Lee montre par une approche siRNA ciblant FLIP (protéine inhibant l'activation de la caspase 8) en présence de rapamycine (inducteur d'autophagie) son rôle anti-apoptotique et anti-autophagique.

III.E.6.b Les liens entre l'autophagie et la sénescence

Le vieillissement est souvent associé à une diminution de l'autophagie. L'autophagie est impliquée dans de nombreuses pathologies liées à l'âge comme les maladies neuro-dégénératives. Cependant, les liens moléculaires entre les deux mécanismes restent encore mal compris.

In vivo, les souris KO ATG5, ATG7 ou Bécline-1 meurent précocement³⁹⁶. De façon très intéressante, une étude sur la maladie d'Huntington a montré qu'une extinction de la polyglutamine induisait de l'autophagie et rallongait la vie des souris³⁹⁷.

De plus, une surexpression de ULK3 (l'isoforme de ULK1) permet à la fois d'augmenter l'autophagie et la sénescence³⁹⁸. Cette sénescence est dépendante des voies p53 et ROS³⁹⁹. La voie mTOR, elle aussi, est impliquée à la fois dans la sénescence et l'autophagie. En effet, les souris traitées à la Rapamycine (inhibiteur de mTOR) ont une longévité augmentée⁴⁰⁰.

La sénescence ou le vieillissement cellulaire est caractérisée par une accumulation intracellulaire de matériels endommagés (organites, protéines). Elle nécessite donc une autophagie fonctionnelle pour dégrader ce matériel et permettre à la cellule de vivre. Il semblerait donc que l'autophagie ait un rôle important lors la sénescence.

Les morts cellulaires font partie d'un réseau très complexe de mécanismes qui s'entrecroisent et qui semblent donc permettre leur régulation selon les conditions environnementales. Plusieurs études récentes ont commencé à mettre en lumière des régulations entre l'apoptose et l'autophagie mais aussi entre l'autophagie et la sénescence.

III.F. Morts cellulaires et réponse aux ITK

Comme nous l'avons vu précédemment, Bcr-Abl possède des propriétés anti-apoptotiques via l'activation de plusieurs voies de signalisation. Il est maintenant établi qu'en bloquant l'activité enzymatique de l'oncogène avec l'imatinib (ou d'autres ITK), les cellules Bcr-Abl⁺ vont mourir par apoptose²⁸. Cette apoptose caspase-dépendante implique la mitochondrie via la protéine Bim^{121,269,401}. Cependant, lorsqu'on bloque l'apoptose induite par l'imatinib (ou un ITK de seconde génération) avec un inhibiteur de caspases (Zvad), l'apoptose est fortement inhibée et il subsiste une portion de cellules dont la mort est caspase-indépendante^{402 403}.

En plus de la réponse apoptotique, une réponse autophagique est induite par les ITK. En effet, les ITK tels que l'imatinib ou l'INNO-406 (un ITK de seconde génération) induit l'activation du mécanisme d'autophagie dans les cellules Bcr-Abl⁺⁴⁰³. L'étude rapportée par Bellodi montre qu'en présence d'imatinib des mécanismes non apoptotiques se mettent en place dans les cellules de LMC. En effet, à la fois *in vitro* sur des lignées cellulaires et *ex vivo* sur des progéniteurs de patients atteints de LMC, l'imatinib induit une réponse autophagique. Cette autophagie est d'autant plus importante que l'apoptose est inhibée par le Zvad suggérant qu'une régulation négative existe entre ces deux mécanismes. Par exemple, cette étude décrit le rôle protecteur de l'autophagie sur la cellule de LMC en présence d'imatinib en utilisant des approches pharmacologiques (Chloroquine, Bafilomycine A1) ou en inhibant l'expression de protéines indispensables telles que ATG5 ou ATG7 par siRNA⁴⁰⁴. Cette régulation est confirmée dans d'autres modèles puisque l'autophagie est également induite dans des cellules de glioblastomes traitées par le dasatinib⁴⁰⁵.

Bien que l'autophagie ait un rôle controversé (protection de la cellule et/ou mort cellulaire) comme nous le verrons plus tard, elle est activée par de nombreux ITK dans les cellules de LMC ce qui la rend tout aussi importante que l'apoptose induite.

D'autres types de mort ont été décrits en réponse aux ITK, et notamment en réponse à l'imatinib, tels que des mécanismes impliquant les lysosomes. En effet, la libération d'hydrolases dans le cytoplasme par les lysosomes est étroitement liée à la mort cellulaire ⁴⁰⁶. L'imatinib induit une perméabilisation des lysosomes dans des lignées cellulaire LMC et des progéniteurs de LMC conduisant à la libération de la cathepsine B ⁴⁰⁷.

Au cours de ma thèse, la LMC a servi de modèle pour étudier différents mécanismes de morts cellulaires et les régulations qui existent entre eux. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'apoptose, à la sénescence ainsi qu'à leur régulation *via* l'autophagie en tant que mécanisme de survie cellulaire.

OBJECTIFS

OBJECTIFS DE LA THÈSE

Parmi les dérégulations acquises par la cellule cancéreuse, une incapacité à mourir et une prolifération incontrôlée sont deux propriétés essentielles que l'on cherche à inhiber en thérapeutique anticancéreuse. De plus, le dérèglement de l'activité tyrosine kinase (TK) est parfois rencontré dans le cancer et l'utilisation d'inhibiteurs de tyrosine kinases (ITK) est une thérapeutique de choix lorsque l'on a identifié la TK en cause. Nous venons de voir que c'est le cas dans la leucémie myéloïde chronique (LMC), une hémopathie maligne qui bénéficie depuis 2002 d'une thérapeutique ciblée faisant appel à un ITK, l'imatinib.

Malgré l'efficacité de cette thérapeutique, des résistances sont apparues et plusieurs mécanismes ont été identifiés à ce jour. Cependant, la probabilité de rechute et l'apparition de nouvelles résistances ne peuvent pas être ignorées. Il faut garder en tête que la LMC reste, encore aujourd'hui, une maladie que l'on sait contenir mais pas guérir. Nous sommes partis du constat que l'imatinib induit la mort apoptotique des cellules de LMC mais active également un mécanisme de survie cellulaire, l'autophagie. De plus, de nombreuses études montrent à ce jour qu'en plus d'une réponse apoptotique, des morts caspases-indépendantes se mettent en place.

A ma venue dans le laboratoire il y a trois ans, il m'a été confié un projet concernant l'utilisation potentielle des morts cellulaires non-apoptotiques pour contourner les résistances aux ITK dans la LMC. Le sujet démarrant, il m'a fallu déterminer et m'organiser une véritable « caisse à outils », la plus complète possible pour atteindre mon premier objectif qui était de déterminer comment meurt une cellule leucémique en réponse aux ITK.

Pour se faire, j'ai utilisé des marqueurs de mort apoptotique disponibles (Annexine-V, DiOC6, clivage des caspases et de la PARP) mais j'ai dû aussi valider différents marqueurs nécrotiques, sénescents et autophagiques adaptés à nos modèles cellulaires. Par exemple, j'ai voulu savoir comment la nécrose pouvait être identifiée en dehors du paramètre classique de la perte de l'intégrité membranaire. J'ai pour ces raisons détecté le niveau d'expression de la protéine RIP1, une sérine/thréonine kinase impliquée dans le mécanisme de nécroptose, le

clivage de la protéine PARP à 55kDa ou la libération dans le milieu extracellulaire de protéines normalement confinées à l'intérieur de la cellule. Concernant l'autophagie, le marqueur le plus adapté pour mettre en évidence son déclenchement s'est avéré être l'augmentation de la forme lipidée de la protéine LC3B. Une autre protéine, la p62SQSTM1, peut aussi être détectée. Cependant, entre nos mains et dans nos modèles expérimentaux l'expression de cette protéine augmente et aucune dégradation par l'autophagosome n'a pu être détectée.

Concernant la détection de la sénescence j'ai dû faire face à plusieurs difficultés. En effet, deux marqueurs classiquement utilisés pour mettre en évidence la sénescence (p53 et p16), impliqués notamment dans la régulation du cycle cellulaire, sont absentes d'un de nos modèles cellulaires. J'ai, par contre, utilisé la microscopie photonique et la cytométrie en flux pour mettre en évidence l'augmentation de taille et de la granularité consécutive à la réponse sénescence. J'ai aussi utilisé la technique de détection de l'activité SA- β -galactosidase sur les cellules en suspension, la détection de l'inhibiteur de cycline kinase la p21 et testé plusieurs autres marqueurs comme la sécrétion d'interleukines (IL-6 et IL-8) et de la protéine Wnt16B ou la méthylation d'une histone, l'H3K9. Cette recherche de marqueurs pour identifier spécifiquement une mort a été primordiale pour la suite du projet.

En parallèle, il me fallait déterminer s'il existait des inducteurs ou des inhibiteurs pour chaque mort cellulaire. Par exemple, sur les cellules K562, l'autophagie est activée par la rapamycine, la nécrose par l'H₂O₂. Nous sommes également capables d'induire de la sénescence par un traitement à l'hydroxyurée.

Au contraire, l'inhibition de ces morts est plus complexe, l'inhibition de l'autophagie peut se faire par des agents bloquant des étapes précoces (3-Méthyladénine) ou tardifs (Chloroquine). Actuellement, il n'existe pas d'agents permettant de bloquer le vieillissement cellulaire lorsqu'il est associé à une sénescence oncogénique.

Nos résultats préliminaires montraient qu'en réponse à l'imatinib en plus d'une réponse apoptotique, une partie de la population cellulaire arrêta de proliférer mais ne mourrait pas par apoptose dans le sens où ces cellules n'étaient ni positives en bleu Trypan ni positives par marquage avec l'Annexine-V. Nous nous sommes rapidement rendu compte que les ITK induisaient une réponse hétérogène dans les modèles cellulaires de LMC. Nous avons choisi

de nous focaliser sur l'apoptose, la sénescence et l'autophagie car nos résultats ne nous ont pas permis de montrer une participation de la nécrose.

J'ai donc mesuré le cycle cellulaire puis l'activité SA- β -Gal pour déterminer si ces cellules rentraient en sénescence en réponse à l'imatinib. L'apoptose et la sénescence se sont avérées régulées de manière opposée par l'autophagie. Il était donc pertinent de déterminer s'il existait une hiérarchie et/ou une coopération entre les différentes morts cellulaires induites par les ITK et notamment l'imatinib. Pour cela, j'ai généré des modèles de lignées cellulaires déficientes pour l'apoptose ou l'autophagie afin d'en étudier leur rôle respectif.

Une meilleure compréhension des mécanismes de morts cellulaires, de leurs voies de signalisation (communes ou non), de leurs coopérations éventuelles, permet d'envisager, dans le cas des résistances aux ITK, soit de restaurer l'apoptose soit d'induire une mort non apoptotique. Le second objectif fut donc de déterminer si on était capable de contourner la résistance aux ITK soit en sensibilisant à nouveau les cellules à l'apoptose soit en induisant des morts non apoptotiques. L'expertise du laboratoire sur les résistances a permis de disposer de plusieurs modèles cellulaires résistants à l'imatinib (surexpression d'Hsp), au nilotinib (surexpression de TK) et au dasatinib (surexpression de Bcr-Abl). Nos résultats en utilisant l'acide mycophénolique ou les ténovines montrent qu'une même molécule ou un agent thérapeutique peuvent contourner la résistance par l'induction d'une mort non apoptotique et/ou sensibiliser à la mort apoptotique selon le type de cellule de LMC. Enfin, la lignée générée résistante au dasatinib nous a servi à étudier la sénescence induite par les oncogènes et les liens avec l'apoptose.

RÉSULTATS

PARTIE 1

I. RÉSULTATS : PARTIE 1

Comment meurt une cellule de LMC en réponse aux ITK ?

**La sénescence induite par l'imatinib dans les K562 est
potentialisée par l'inhibition des caspases de façon
dépendante de l'autophagie.**

I.A. Introduction

Les cellules de LMC sont caractérisées par leur hyperprolifération et leur capacité d'activer les voies de signalisation anti-apoptotiques. Il est communément admis aujourd'hui qu'un ITK anti-Abl (imatinib, nilotinib ou dasatinib) est capable d'éliminer les cellules leucémiques Bcr-Abl⁺ principalement par apoptose. Depuis quelques années, le mécanisme d'autophagie induit par l'imatinib et son lien avec l'apoptose a été étudié dans certains modèles cellulaires (gliomes, neurones) y compris dans les cellules de LMC ³⁸⁸. On sait aujourd'hui que l'apoptose et l'autophagie sont liées par des mécanismes de régulations négatives réciproques dans la LMC ⁴⁰⁸.

Des études récentes rapportent l'existence de morts caspases indépendantes (CICD) en absence d'apoptose (inhibition pharmacologique par le Z-vad). En effet, les CICD comme la nécrose, la nécroptose ou encore les morts lysosomales sont présentes dans les cellules de LMC^{402,407}. Dans les lignées de cellules anaplasiques thyroïdiennes irradiées (surexprimant c-Abl), l'imatinib induit l'entrée en sénescence⁴⁰⁹. Des données récentes tendent également à montrer un lien moléculaire entre l'autophagie et la sénescence notamment par le gène ULK3 chez les mammifères³⁹⁸. ULK3 est un des homologues de l'ATG1. Son rôle dans l'autophagie a été mis en évidence par sa colocalisation avec l'ATG12 dans les étapes précoces de l'autophagie. De plus, sa surexpression permet d'induire à la fois de l'autophagie et de la sénescence.

Dans les lignées cellulaires de LMC (cellules K562) sensibles à l'imatinib, nous avons détecté l'apoptose en réponse aux ITK par marquage avec l'Annexine-V en cytométrie en flux et par microscopie électronique. Cependant, même après 72h une population Annexine-V négative persiste mais ne prolifère plus. Nous avons alors recherché quelles réponses autres que l'apoptose étaient déclenchées par les ITK. Nous avons pu mettre en évidence un arrêt de la prolifération lié à un arrêt du cycle cellulaire en phase G₁ et une augmentation de l'activité β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β -gal) dans les cellules K562 traitées à l'imatinib. Bien que ce modèle leucémique mimant la phase blastique ne possède plus certains gènes ou leur expression (déletion de p53 et mutation de p16), nous avons pu confirmer une réponse sénescence dans le modèle K562. Cette sénescence a également été observée en réponse au nilotinib ou au dasatinib.

Etant donné le lien déjà établi dans d'autres modèles entre l'apoptose et l'autophagie, nous avons déterminé s'il existait une hiérarchie et/ou une coopération entre l'apoptose, l'autophagie et la sénescence induite par l'imatinib. Nous avons, en bloquant l'apoptose avec un inhibiteur pan caspases (Z-vad) ou par des techniques moléculaires (shRNA Bim, surexpression de Bcl-2), observé une augmentation de la réponse sénescence détectée par l'activité SA- β -Gal associée à une augmentation de l'expression de la CDKI p21. Ces résultats ont suggéré une régulation négative de l'apoptose sur la sénescence induite par l'imatinib.

L'autophagie, en tant que mécanisme de survie, semble tenir un rôle central de régulation dans de nombreuses morts cellulaires. Afin d'étudier son rôle, nous avons utilisé le modèle K562, et nous avons pour cela généré des cellules déficientes pour la réponse autophagique en inhibant l'expression de protéines indispensables à cette réponse par des shRNA dirigés contre la protéine ATG7. Dans ces cellules autophagie-déficientes shRNA ATG7 traitées par l'imatinib, la potentialisation de la sénescence quand on bloque l'apoptose est inhibée. Nous montrons donc que l'autophagie tient un rôle central dans la régulation de l'apoptose et de la sénescence en réponse aux ITK.

I.B. Article 1

Imatinib-induced K562 leukemia cells senescence is potentialized by caspase inhibition and autophagy

Claire Drullion¹, Valérie Lagarde¹, Sisareuth Tan², Romain Gioia¹, Muriel Priault³, Alain Brisson², François-Xavier Mahon¹, Jean-Max Pasquet¹

1- Hématopoïèse leucémique et cibles thérapeutiques, INSERM U1035, Université Bordeaux Ségalen, 146 rue Léo Saignat Bat TP 4^e étage, 33076 Bordeaux cedex, France.

2- UMR-5248-CBMN, Université de Bordeaux, Bâtiment B8 – Avenue des Facultés, 33405, Talence.

3- UMR CNRS 5095, I.B.G.C, 1 rue Camille Saint Saens, Université de Bordeaux 33077 Bordeaux.

Soumis dans *Cell Death and Differentiation*

Abstract

Imatinib, the anti-Abl tyrosine kinase inhibitor used as first line therapy in chronic myeloid leukemia (CML), eliminates CML cells mainly by apoptosis as shown the detection of annexin V positive cells. In addition to apoptosis, analysis of annexin V negative K562 cells reveals cell cycle arrest and senescence-associated beta galactosidase (SA- β -Gal) in response to imatinib. Preventing apoptosis by caspase inhibition using the peptide inhibitor Z-vad decreases annexin-V positive cells and caspase 3 cleavages. This is associated to an increase of the SA- β -Gal positive cell population and p21 expression emphasizing a senescent phenotype. Accordingly, inhibition of imatinib-induced apoptosis by targeting Bim expression or over expression of Bcl2 potentiates the senescent phenotype. Inhibition of autophagy by silencing the expression of the protein ATG7 prevents the increase of the senescent response. This emphasizes that imatinib is triggering apoptosis, autophagy and senescence in K562 CML cells but also that apoptosis is limiting the senescent response through an autophagy dependent way.

Introduction

Chronic myeloid leukemia (CML) is a clonal proliferation malignancy characterized by a t(9;22)(q34;q11) reciprocal translocation leading to the Philadelphia chromosome (Ph⁺) with a fusion gene BCR-ABL, the molecular hallmark of CML and Ph⁺ acute lymphoblastic leukaemia (LAL) [1, 2]. Targeting the tyrosine kinase (TK) activity of Bcr-Abl has been an attractive therapeutic strategy in CML with the development of new drugs such as tyrosine kinase inhibitors (TKI). Imatinib mesylate (previously known as Gleevec or STI571) is a Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitor that competes with ATP binding site of Bcr-Abl and stabilizes the protein in its inactive conformation, thereby inhibiting its TK activity [3]. Bcr-Abl is the main target of the tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate (Gleevec^R or Glivec^R, previously STI571) which also inhibits c-Kit (the receptor for SCF), the PDGF receptor, Abl and the Abl related gene [4]. The resulting inhibition of the kinase activity leads to apoptosis of leukemic cells sparing normal hematopoiesis [3, 5]. Recent studies suggest that TKI induce caspase-independent cell death (CICD) among which necrosis or lysosomal permeabilization but also surviving mechanisms like autophagy. A revisited classification of cell death has been proposed, taken into account the recommendations of the nomenclature committee on cell death 2009 which clarified the different cell deaths and how to identify them [6]. Some of these different deaths or survival pathways are known playing a role in the response to imatinib such as apoptosis, necrosis and autophagy [7-9]. However, other cell deaths have been yet to be studied. Although the efficient therapeutic use of tyrosine kinase inhibitor directed against Abl in CML disease has been associated to the apoptosis of the Philadelphia positive cells, CICD have been reported at least in vitro [10, 11]. Indeed, caspase inhibition has been involved in promoting alternative cell death [12].

Apoptosis is by far the best characterized type of cell death as a programmed cell death I. It is defined by morphological features (rounding up of the cell, reduction of cellular and nuclear volume, nuclear fragmentation, plasma membrane blebbing and phosphatidylserine exposure, loss of mitochondrial membrane potential) and caspase activation. For a long time, apoptosis was the only death reported in response to imatinib associated to a controlled mechanism in contrast for example to necrosis. However, recent studies suggest that necrosis,

considered as an accidental kind of death, would be able in particular conditions to result from accurate mechanisms [13]. Classically, necrosis is characterized by a plasma membrane rupture and swelling cytoplasmic organelles such as mitochondria. Interestingly, there are other ways to die like when autophagy is overbooked [14]. Macroautophagy (referred as autophagy) has first been demonstrated to be a self proteolysis system involved in the rescue of the cell to maintain homeostasis [15]. It is a well organized catabolic mechanism allowing recycling of macromolecules triggered by stress conditions [16]. Autophagy is characterized by double membrane vesicle formation called autophagosome, a massive vacuolization and can become a death pathways in not well define conditions [14, 17]. There is now mounting evidence that autophagy and apoptosis or senescence share several common regulatory elements [18-20]. Even CML cells can be eliminated through a resveratrol-mediated autophagic cell death [9].

In contrast, senescence has been associated to age and telomere shortening or stress conditions [21, 22]. Senescence is called replicative when telomere are shortened and accelerated when it is associated to oncogene- or stress-mediated DNA damages. Senescence is characterized by molecular and morphological cell changes such as an irreversible cell cycle arrest, an increase of cell granulation and size and an increase of lysosome [23, 24]. Senescent cells have also biochemical modifications such as an increase of senescence-associated β -galactosidase activity (SA- β -gal), overexpression of cell cycle inhibitors (p21, p53, p16), specific wnt protein expression and a strong resistance to apoptosis [25, 26]. They have still an active metabolism and lots of attentions are now on the secreted proteins during senescence. Indeed, senescence could participate to the quality of cell response to therapeutic treatment but also to eliminate oncogenic transformed cells [22, 27].

Imatinib has recently been described involved in a senescent response of thyroid cancer cells or a quiescent phase of gastrointestinal stromal tumor cells [28, 29]. However, these responses have yet to be determined in imatinib-treated CML cells. To answer if imatinib triggers senescence in CML cells, we studied how K562 CML cells died in response to imatinib and the interplay between apoptosis, autophagy and senescence.

Results

Imatinib induced apoptosis, autophagy and a senescence-like phenotype in K562 cells

As well documented, it is known that imatinib induced apoptosis in K562 CML cells *in vitro*. In an attempt to characterize if imatinib is inducing other cell death, we investigate autophagy, senescence and necrosis in K562 cells incubated with 1 μ M of imatinib for 48h. Apoptosis was first detected in response to imatinib by electronic microscopy using gold beads-coupled annexin V (Figure 1 and supplementary data). In contrast to untreated K562 cells with a large and diffuse nucleus, imatinib induced cell shrinkage, vacuole formation and chromatin condensation (Figure 1B). However, other cells undergo different aspect with an increase of nucleus size, internal membrane and vacuole formation (Figure 1C). The different behaviour of K562 cells treated by imatinib was confirmed by flow cytometry using annexin V as a bait and caspase 3 autolysis by western-blot (Figure 2A). A mean of 35% of annexin V-labelled K562 cells were detected in response to imatinib on 8 independent experiments. Detection of PI labelled cells shows no significant increase in response to imatinib leading us to explore other cell death.

To detect autophagy, K562 cells were separated in two parts 6h before the end of the 48h incubation and treated with or without 20 nM of Bafilomycin A1 to block the autophagic flux. This treatment leads to the accumulation of the two form of the microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) allowing easier detection of the autophagic marker by western-blot. Clearly, imatinib induced autophagy in K562 cells (Figure 2B). Senescence was revealed by the detection of senescence-associated β -galactosidase (SA- β -Gal) positive cells. Imatinib induced an increase of SA- β -Gal positive cells (Figure 1C) and 38% of SA- β -Gal positive cells were detected in response to imatinib versus 14% in untreated cells. A decrease of the cell cycle inhibitor p21 was detected in imatinib –treated cells upon 48h in comparison to control (Figure 2D).

Inhibition of caspase activity potentiates p21 expression and SA- β -Gal positive cell population in response to imatinib

In an attempt to know if regulations exist between these deaths in response to imatinib, we inhibit the apoptotic response by blocking caspase activity. Caspase inhibition was

performed using the broad caspase inhibitor Z-Vad-fmk (Z-Vad). When apoptosis was inhibited by Z-Vad, the annexin V positive cell population is lesser than 8%. In contrast, imatinib in the presence of Z-Vad induced 70 % of SA- β -Gal positive cells and an increase (2,4 fold) of p21 suggesting that apoptosis is limiting the senescent response (Figure 2C and 2D).

To test this hypothesis, we generate apoptosis deficient K562 cells by inhibition of the expression of the proapoptotic protein Bim (shRNA) or by overexpressing the anti-apoptotic protein Bcl2 (Figure 3A). The detection of annexin V positive cells in response to imatinib in the K562 shBim (KS shBim) and K562 Bcl2 (KS Bcl2) show no significant increase in comparison to untreated cells (Figure 3B) confirming that both Bim inhibition or Bcl2 overexpression inhibit imatinib-induced apoptosis. In contrast, the percent of SA- β -Gal positive cells was increased in KS shBim or KS Bcl2 cells and still increase in response to imatinib (Figure 3C).

Imatinib-induced senescence in K562 cells is independent of autophagy

Because autophagy is limiting the apoptotic response to imatinib, we investigate if it regulates imatinib-induced senescence. ATG7 deficient K562 cells were generated by expressing a shRNA anti-ATG7 using lentiviral infection in K562 cells (Figure 4A). This cells show a moderate increase of the autophagic marker LC3 in response to imatinib confirming the inhibition of autophagy (compare Figure 4A with 2A). ATG7 deficient K562 cells treated with imatinib 1 μ M for 48h have an increase of annexin V labelling (Figure 4B). Albeit the number of SA- β -Gal positive cells was up to 20% in ATG7 deficient K562 cells, imatinib induced a similar level of senescence in comparison to imatinib-treated K562 cells suggesting that ATG7 inhibition did not abrogated imatinib induced SA- β -Gal. In contrast, inhibition of caspase activity by Z-vad was not anymore followed by an increase of SA- β -Gal positive cell number and increase of p21 expression (Figure 4C).

Silencing autophagy prevents imatinib-induced potentiation of senescence in apoptotic deficient K562 cells

To confirm that the limiting role of apoptosis on imatinib-induced senescence was dependent on autophagy, we used the Bim deficient and Bcl2 overexpressing K562 cells to

generate double knock down Bim/ATG7 deficient cells and Bcl2 overexpressing/ATG7 deficient cells (Figure 5A). Incubation with imatinib for 48h did not increase the number of annexin V labelled cells confirming the inhibition of the apoptotic response previously observed (Figure 5B). Basal and imatinib-induced SA- β -Gal positive cells were lower than in shRNA Bim K562 cells suggesting the participation of autophagy in the senescent response (compare Figure 3C and 5C). In contrast, SA- β -Gal positive cells were similar in response to imatinib in the KS Bcl2 cells and the KS Bcl2/shATG7 cells (Figure 3C and 5C).

Discussion

In this study we identified a senescence-like phenotype as a response of K562 CML cells to imatinib in addition to apoptosis and autophagy. In addition, the senescent response was potentialized by apoptosis inhibition in an autophagy dependent way although senescence induction was not. Despite a lot of molecular players, the apoptotic response of CML cells to imatinib has been extensively studied and the critical roles of several proteins were characterized like for the BH3-only domain containing protein Bim [30, 31]. A similar number of K562 cells undergo apoptosis or senescence in response to imatinib (Figure 2A and 2C) and the senescent cell population increase when apoptosis was inhibited. Both caspase inhibition, inhibition of the proapoptotic Bim protein expression and the overexpression of the anti-apoptotic Bcl2 protein block apoptosis and increase senescence. This results confirmed that caspase-independent cell death (CID) occurred in imatinib-treated CML cells when caspases or apoptosis are inhibited [10, 11]. Albeit the CID reported by Lavallard et al has not been clearly associated to a senescent response, the senescent response to imatinib was confirmed by the inhibition of colony formation in clonogenic assay and even when apoptosis is inhibited. Another death has been reported in response to imatinib when apoptosis was prevented by caspases inhibition [10]. In regard to the necrosis-like cell death reported by Okada et al, we have investigated the role of the serine protease Omi/HtrA2 by inhibiting its activity using the inhibitor ucf-101. At least in our hand, both the increase of p21 and the SA- β -Gal positive cell population was not prevented or decreased by blocking Omi/HtrA2 suggesting that the release of this protease is not involved in the senescent response (results not shown). In addition, no significant propidium iodide (PI)-labeled cells were detected upon 48h imatinib incubation and did not increase when caspase or apoptosis was inhibited. Only dual PI/annexin V labelled cells were detected in our experiments and increased only at longer time incubation. This may reflect that K562 cells are more competent to die through senescence than necrosis in response to imatinib and this is more convincing when apoptosis is blocked. Interestingly, it should be noted that another CML line, the BV173 CML cells undergo more PI labeling than K562 cells upon 48h imatinib incubation. Moreover only cells undergoing mitochondrial depolarization were PI-labeled suggesting that PI labeling may reflect the late stage of the apoptotic population.

One major result of this study is that imatinib induced, in addition to apoptosis and autophagy a senescence-like change in K562 cells. It was already reported that imatinib also triggers senescence (detected by an increase of p21 expression) in radiation-treated thyroid cancer cells or quiescence in GIST cells [28, 29]. However, in K562 cells, imatinib alone is able to induce to a similar degree apoptosis and senescence. Furthermore, the senescent response was amplified by caspase or apoptosis inhibition in K562 cells. A similar result was reported in neuroblastoma cells treated by increasing concentration of doxorubicin when caspases are inhibited [32]. This is in accordance with a limiting role of apoptosis on senescence in a caspase dependent way. This is emphasized by the increase of p21 expression and SA- β -Gal positive cells detected at concentration of doxorubicin which did not activate caspase 3 whereas higher concentration led to caspase 3 activation and caspase-dependent p21 degradation. Conversely, p21 increase cannot be observed until caspases are inhibited confirming the result in K562 CML cells. However, the cell cycle arrest and the senescent response detected in imatinib-treated K562 cells could be link to some other caspase substrates like the retinoblastoma protein (Rb) involved in E2F binding and proliferation or TAF6, a transcription factor involved in p21 expression [33]. We also cannot rule out that the inhibitor of caspases used, Z-Vad, may have additional targets even to lower degree. For example, the cysteine-protease calpains have been involved in the proteolysis of specific substrates and are inhibited to some extent by caspase inhibitors. However, calpain activation has been associated to senescence in response to DNA damage [34].

A general consensus is now emerging that apoptosis deficiency is not enough to impair response to anti-cancer drugs meaning that resistance to therapeutics correlates better to specific multimechanisms than only an apoptosis defect [35]. In fact a lot of reports displayed now several lines of evidence that anti-cancer treatment induced not only apoptosis but also other cell deaths raised when apoptosis is inhibited like we did. Such overexpression of Bcl2 promotes senescence in a p38-dependent manner in adriamycin-treated fibroblast while it did not in response to nocodazole illustrating it is not an obligatory rule [36].

Beside the induction of senescence by imatinib, we identified two levels of senescence. The first one occurred in addition to apoptosis in response to imatinib whereas the other one was unmasked by apoptosis inhibition. This latter level seems to be dependent on autophagy

as it was inhibited in autophagic deficient K562 cells. This may be why Bcl2 overexpressed K562 cells undergo senescence at the same level than double Bcl2 overexpressing and ATG7 deficient K562 cells. Indeed, autophagy has been connected to senescence in physiopathology [20, 37-39]. In contrast, mTor inhibition by resveratrol or rapamycin was reported to increase autophagy and suppress cellular senescence [40]. In our condition, senescence in response to imatinib was neither increased nor modified by rapamycin, an inhibitor of mTor (results not shown).

Because apoptosis is limiting autophagy at least through the proteolysis of autophagy-regulating proteins, the potentiation of senescence upon inhibition of apoptosis may take place in an autophagy-dependent way. This may be why Bim deficient K562 cells (ShBim) undergo high basal SA- β -Gal positive cell population still increasing upon imatinib incubation. When apoptosis was blocked by overexpression of Bcl2, the SA- β -Gal positive cell population was decreased and this could be link to the inhibitory role of Bcl2 on autophagy [41, 42]. A recent report describes that Bcr-Abl inhibits autophagy through an ATF5-mediated regulation of *mTOR* transcription [43]. This may contribute to the absence of senescence in Bcr-Abl expressing cells while such oncogene expression should be inducing a senescent response. Indeed, the inhibition of Bcr-Abl activity by imatinib may blocked the BCR-ABL/PI3K/AKT/FOXO4/ATF5/mTOR pathway identified and consequently induced senescence.

This study reports for the first time that imatinib is able to induce senescence in K562 CML cells and confirms interplay between the different death pathways and survival. Many questions have still to be answered concerning the potential use of non-apoptotic death in cancer targeting. However, the possibility to restore senescence in cancer cells is very existing as it is the first barrier against tumorigenesis.

Acknowledgements

We thank Dr. Elisabeth Buchdunger and Paul Manley (Novartis Pharma, Basel, Switzerland) for providing us imatinib. This work was supported by la Ligue Nationale Contre le Cancer Comité de la Dordogne, l'Université Victor Ségalen Bordeaux 2, la région Aquitaine and l'INSERM. CD is a fellowship from la Ligue Nationale Contre le Cancer.

Materials and Methods

Reagents

RPMI 1640 medium, fetal calf serum (FCS), phosphate buffered saline (PBS), were from Invitrogen. Trypan blue and the antibody against LC3 were from Sigma (St Quentin Fallavier, France). Tyrosine kinase inhibitors Imatinib and Nilotinib were kindly provided by Novartis Pharma (Basle, Switzerland). The broad caspase inhibitors Z-VAD-fmk were purchased from Peptanova (Sandhausen, Germany). The following antibodies : caspase 3, p21 were from Cell Signalling (Danvers, USA), and Hsp60 was from Santa Cruz (Bergheimer, Germany). Annexin-V-FITC and APC were from Beckman coulter (Villepinte, France).

Cell lines

The human erythroleukemia Bcr-Abl positive human cell line used in this study : K562 (KS) was from ATCC. Cells were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin and 0.1 mg/mL streptomycin at 37°C in a humidified atmosphere containing 5 % CO₂. Aliquots were taken at 24h intervals for assessment of cell viability by Trypan blue exclusion.

Electronic microscopy

K562 cells (10⁶ cells) were treated as indicated and then incubated in the presence of annexin V-coupled gold beads in Hepes Buffer (20mM) in the presence of 2 mM Ca²⁺. After one wash in hepes/Ca²⁺, cells were fixed in 4% formaldehyde and 1% glutaraldehyde in 0.1 M PB (pH 7.4) by mixing equal volume of fixative and cell suspension. After centrifugation, fresh fixative was added for at least 2 hours. After one wash, 8% (0.2M) sucrose in 0.1 M PB was added (3x15 min). Post-fix step was performed with 1% OsO₄ in 0.1 M PB for 1 hour. After one wash, samples were dehydrated and embedded in beam capsules. Ultrathin section were performed and stained with uranyl acetate for 15 min, rinse with distilled water and then stained with lead citrate for 3-5 min, rinse with distilled water and then observed.

Western Blot

Protein lysates were prepared according to Mahon et al [44] . Protein concentration was measured by the BCATM Protein Assay (Pierce, Rockford IL, USA) and the lysates were stored at -80°C. Equal amounts of protein were separated by electrophoresis on an SDS-PAGE 12.5 or 15% and transferred to a pvdf membrane as described [44] (Biorad, Marnes-La-Coquette, France). After blocking, the membrane is incubated with primary antibodies and secondary antibodies. Protein-antibody complexes were detected by an enhanced chemiluminescence immunoblotting ECL (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France).

Flow cytometry

Cells (10^5 cells) were incubated for 15 min in 500µl of PBS with 2 mM Ca^{2+} , 2µl of Annexin V-FITC (or APC) and 0.25 µg of propidium iodine (PI) before flow cytometry analysis on Facsclibur. Ten thousand events are acquired for statistical analysis.

Cell cycle

Cells (10^6 cells) were harvested and washed once with PBS-SVF 5% then permeabilized with PBS 1% PFA 0,1% saponin for 30 min. Cell incubated with PBS-PI (0,5 µg/ml containing RNase) for 15 min before analysis by flow cytometry.

SA-β-Galactosidase labeling

Cells (10^6 cells) are washed with PBS once, before fixed 4 min with 3% PFA then washed once with PBS. Cells were then incubated in a 96 wells plate with a mix (1vol/20vol) of solution I containing X-Gal (20mg/ml X-Gal in dimethylformaldehyde) and solution II (5 mM ferricyanure, 5 mM ferrocyanure, 2 mM MgCl_2 150 mM NaCl, 30 mM Citric acid/phosphate pH=6) for 24 hours at 37°C. Cells were then washed with PBS and SA-β-gal activity was observed by detection of a bleu staining with an inverted Nikon Microscope (Eclipse Ti) and analyzed with the Nikon software NIS. For SA-β-gal positive staining cell quantification, 100 cells were counted on three separate fields and the mean of blue stained cells were calculated as followed (number of blue cells / (number of total cells)). Results are expressed as the percent of SA-β-gal positive cells.

Autophagy inhibition by RNA silencing.

To inhibit autophagy, HIV-1 lentivirus-based vectors were used to introduce shRNAs against ATG7 into cells as previously described [42]. Briefly, shRNAs were cloned in FG12 lentivector, HEK293FT cells were used as packaging cells for virus production. The human ATG7 siRNA sequence was 5'- AGG ATA CAG CTG GAG TCA G -3'. To confirm autophagy inhibition by silencing of ATG7, transduced cells were grown in nutrient deprived medium (HBSS) in the absence or in the presence of Bafilomycin A and both LC3B I and II form were detected by western-blot.

Statistical analysis

A Wilcoxon test was used to calculate differences between means; differences were considered significant only when $p \leq 0.05$.

References

1. Rowley JD, Testa JR. Chromosome abnormalities in malignant hematologic diseases. *Adv Cancer Res.* 1982;36:103-148.
2. Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukaemia. *Leukemia.* 1996 May;10(5):751-756.
3. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med.* 1996 May;2(5):561-566.
4. Buchdunger E, Cioffi CL, Law N, Stover D, Ohno-Jones S, Druker BJ, et al. Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000 Oct;295(1):139-145.
5. Deininger MW, Goldman JM, Lydon N, Melo JV. The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cells. *Blood.* 1997 Nov 1;90(9):3691-3698.
6. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ.* 2009 2008;16(1):3-11.
7. Okada H, Mak TW. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer.* 2004 Aug;4(8):592-603.
8. Ertmer A, Huber V, Gilch S, Yoshimori T, Erfle V, Duyster J, et al. The anticancer drug imatinib induces cellular autophagy. *Leukemia.* 2007 May;21(5):936-942.
9. Puissant A, Colosetti P, Robert G, Cassuto JP, Raynaud S, Auberger P. Cathepsin B release after imatinib-mediated lysosomal membrane permeabilization triggers BCR-ABL cleavage and elimination of chronic myelogenous leukemia cells. *Leukemia.* 2010 Jan;24(1):115-124.
10. Okada M, Adachi S, Imai T, Watanabe K, Toyokuni SY, Ueno M, et al. A novel mechanism for imatinib mesylate-induced cell death of BCR-ABL-positive human leukemic cells: caspase-independent, necrosis-like programmed cell death mediated by serine protease activity. *Blood.* 2004 Mar 15;103(6):2299-2307.
11. Lavallard VJ, Pradelli LA, Paul A, Beneteau M, Jacquelin A, Auberger P, et al. Modulation of Caspase-Independent Cell Death Leads to Resensitization of Imatinib Mesylate-Resistant Cells 10.1158/0008-5472.CAN-08-2731. *Cancer Res.* 2009 April 1, 2009;69(7):3013-3020.
12. Vandenabeele P, Vanden Berghe T, Festjens N. Caspase Inhibitors Promote Alternative Cell Death Pathways. 2006. p. pe44-.
13. Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci.* 2007 Jan;32(1):37-43.
14. Scarlatti F, Granata R, Meijer AJ, Codogno P. Does autophagy have a license to kill mammalian cells? *Cell Death Differ.* 2009 Jan;16(1):12-20.
15. Codogno P, Meijer AJ. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ.* 2005 Nov;12 Suppl 2:1509-1518.
16. Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, Agrawal DK, Aliev G, Askew DS, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy.* 2008 Feb 16;4(2):151-175.
17. Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest.* 2005 Oct;115(10):2679-2688.
18. Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon H-U, Kimchi A. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. 2009 2009/03/27/online;16(7):966-975.
19. Vicencio JM, Galluzzi L, Tajeddine N, Ortiz C, Criollo A, Tasdemir E, et al. Senescence, Apoptosis or Autophagy? *Gerontology.* 2008;54(2):92-99.

20. Narita M, Young AR. Autophagy facilitates oncogene-induced senescence. *Autophagy*. 2009 Oct;5(7):1046-1047.
21. Hayflick L. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res*. 1965 Mar;37:614-636.
22. Braig M, Schmitt CA. Oncogene-Induced Senescence: Putting the Brakes on Tumor Development. *Cancer Res*. 2006;66(6):2881-2884.
23. Schmitt CA, Fridman JS, Yang M, Lee S, Baranov E, Hoffman RM, et al. A Senescence Program Controlled by p53 and p16INK4a Contributes to the Outcome of Cancer Therapy. *Cell*. 2002 2002/5/3;109(3):335-346.
24. Caino MC, Meshki J, Kazanietz MG. Hallmarks for senescence in carcinogenesis: novel signaling players. *Apoptosis*. 2009 Apr;14(4):392-408.
25. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Sep 26;92(20):9363-9367.
26. Shay JW, Roninson IB. Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *oncogene*. 2004;23(16):2919-2933.
27. Ohtani N, Mann DJ, Hara E. Cellular senescence: Its role in tumor suppression and aging. *Cancer Science*. 2009;100(5):792-797.
28. Liu Y, Perdreau SA, Chatterjee P, Wang L, Kuan SF, Duensing A. Imatinib mesylate induces quiescence in gastrointestinal stromal tumor cells through the CDH1-SKP2-p27Kip1 signaling axis. *Cancer Res*. 2008 Nov 1;68(21):9015-9023.
29. Podtcheko A, Ohtsuru A, Namba H, Saenko V, Starenki D, Palona I, et al. Inhibition of ABL tyrosine kinase potentiates radiation-induced terminal growth arrest in anaplastic thyroid cancer cells. *Radiation research*. 2006 Jan;165(1):35-42.
30. Kuribara R, Honda H, Matsui H, Shinjyo T, Inukai T, Sugita K, et al. Roles of Bim in apoptosis of normal and Bcr-Abl-expressing hematopoietic progenitors. *Mol Cell Biol*. 2004 Jul;24(14):6172-6183.
31. Belloc F, Moreau-Gaudry F, Uhalde M, Cazalis L, Jeanneteau M, Lacombe F, et al. Imatinib and nilotinib induce apoptosis of chronic myeloid leukemia cells through a Bim-dependant pathway modulated by cytokines. *Cancer Biol Ther*. 2007 Jun;6(6):912-919.
32. Rebbaa A, Zheng X, Chou PM, Mirkin BL. Caspase inhibition switches doxorubicin-induced apoptosis to senescence. *ONCOGENE*. 2003 0000///print;22(18):2805-2811.
33. Dix MM, Simon GM, Cravatt BF. Global Mapping of the Topography and Magnitude of Proteolytic Events in Apoptosis. *Cell*. 2008;134(4):679-691.
34. Demarchi F, Cataldo F, Bertoli C, Schneider C. DNA damage response links calpain to cellular senescence. *Cell Cycle*. 9(4):755-760.
35. Roninson IB, Broude EV, Chang B-D. If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resistance Updates*. 2001;4(5):303-313.
36. Nelyudova A, Aksenov N, Pospelov V, Pospelova T. By blocking apoptosis, Bcl-2 in p38-dependent manner promotes cell cycle arrest and accelerated senescence after DNA damage and serum withdrawal. *Cell Cycle*. 2007 Sep 1;6(17):2171-2177.
37. Young AR, Narita M. Connecting autophagy to senescence in pathophysiology. *Curr Opin Cell Biol*. 2010 Apr;22(2):234-240.
38. Young AR, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JF, et al. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev*. 2009 Apr 1;23(7):798-803.
39. White E, Lowe SW. Eating to exit: autophagy-enabled senescence revealed. *Genes & Development*. 2009 April 1, 2009;23(7):784-787.
40. Demidenko ZN, Zubova SG, Bukreeva EI, Pospelov VA, Pospelova TV, Blagosklonny MV. Rapamycin decelerates cellular senescence. *Cell Cycle*. 2009 Jun 15;8(12):1888-1895.

41. Chang NC, Nguyen M, Germain M, Shore GC. Antagonism of Beclin 1-dependent autophagy by BCL-2 at the endoplasmic reticulum requires NAF-1. 2010 2010/02/03/print;29(3):606-618.
42. Priault M, Hue E, Marhuenda F, Pilet P, Oliver L, Vallette FM. Differential dependence on Beclin 1 for the regulation of pro-survival autophagy by Bcl-2 and Bcl-xL in HCT116 colorectal cancer cells. PLoS One. 2010;5(1):e8755.
43. Sheng Z, Ma L, Sun JE, Zhu LJ, Green MR. BCR-ABL suppresses autophagy through ATF5-mediated regulation of mTOR transcription. Blood. 2011 June 29, 2011.
44. Pocaly M, Lagarde V, Etienne G, Dupouy M, Lapaillerie D, Claverol S, et al. Proteomic analysis of an imatinib-resistant K562 cell line highlights opposing roles of heat shock cognate 70 and heat shock 70 proteins in resistance. Proteomics. 2008 Jun;8(12):2394-2406.

Figures Legends

Figure 1 : Electronic microscopy analysis of the response of K562 cells to imatinib

K562 cells were grown in the presence of vehicle only (A, control), imatinib (B and C, Ima, 1 μ M) or incubated with Z-vad (50 μ M) and Ima (1 μ M) for 48h (D). Upon treatment, cells were fixed and used as described in method. Results are representative of 3 independent experiments.

Figure 2 : Imatinib-induced senescence of K562 cells is potentialized by caspase inhibition

K562 cells were grown in the presence of vehicle only, imatinib (Ima, 1 μ M) or preincubated 30 min with Z-vad (50 μ M) and then Ima (1 μ M) for 48h. An aliquot was incubated for 15 min in the presence of annexin-V-FITC. Samples were analyzed by flow cytometry and labelled cells were quantified as described in methods. Results from 8 experiments are expressed as the % of annexin V-labelled cells (**A**, n = 8). Samples treated as above were used for detection of the cleaved form of caspase 3 by western-blot and Hsp60 (as loading control). LC3B proteins were detected by western-blot and Hsp60 was used as loading control. (**B**). An aliquot of K562 cells treated as above (10^5 cells) was washed in PBS, fixed in PFA (4%) during 15 min and then incubated overnight in a 96 wells plate in the presence of X-Gal (1mg/ml) at 37°C as described in methods. The day after, the cells were washed once in PBS and SA- β -Gal activity was detected by a blue cell staining visualized under an inverted microscope. Pictures were acquired and analyzed using the NIS Nikon software. A representative result is shown in the top of the figure C. SA- β -Gal positive cells were quantified by counting 10^2 cells on three separate fields for each condition. Results show the mean of 8 independent experiments (**C**). P21 was detected and Hsp60 was used as a loading control. Results are from one experiments representative of 5. The level of expression of p21 was quantified by densitometry analysis using ImageJ and results were normalized to the untreated condition (**D**).

Figure 3 : Blocking apoptosis modulates senescence of K562 cells

K562 cells were infected by lentivirus coding for a shRNA anti-Bim or the cDNA of Bcl2. Lentiviral particles were incubated for 24 h with K562 cells. Then, the cells were washed twice in PBS and grown for 6 days before sorting. Samples were analysed for Bim and Bcl2 expression by western-blotting (**A**). K562 shBim and K562 Bcl2 cells were incubated with vehicle only or imatinib (Ima, 1 μ M) for 48h. Then, an aliquot was incubated for 15 min in the presence of annexin-V-FITC. Samples were analyzed by flow cytometry and labelled cells were quantified as described in methods. Results from 5 experiments are expressed as the % of annexin V-labelled cells (**B**, n = 5). An aliquot of K562 shBim and K562 Bcl2 cells treated as above (10^5 cells) was washed in PBS, fixed in PFA (4%) during 15 min and then incubated overnight in a 96 wells plate in the presence of X-Gal (1mg/ml) at 37°C as described in methods. The day after, the cells were washed once in PBS and SA- β -Gal activity was detected by a blue cell staining visualized under an inverted microscope. Pictures were acquired and analyzed using the NIS Nikon software. A representative result is shown in the top of the figure C. SA- β -Gal positive cells were quantified by counting 10^2 cells on three separate fields for each condition. Results show the mean of 5 independent experiments (**C**).

Figure 4 : Inhibition of autophagy prevents caspase-inhibition induced potentiation of senescence

K562 cells were infected by lentivirus coding for a shRNA anti-ATG7 by incubation for 24h. Then, the cells were washed twice in PBS and grown for 6 days before sorting. Samples were analysed for ATG7 expression by western-blotting and inhibition of autophagy by detecting LC3B proteins by western-blot (**A**). K562 shATG7 cells were incubated with vehicle only, imatinib (Ima, 1 μ M) or incubated with Z-vad (50 μ M) and Ima (1 μ M) for 48h. Then, an aliquot was incubated for 15 min in the presence of annexin-V-FITC. Samples were analyzed by flow cytometry and labelled cells were analyzed as described in methods. Results from 5 experiments are expressed as the % of annexin V-labelled cells (**B**, n = 8). An aliquot of K562 shATG7 cells treated as above (10^5 cells) was washed in PBS, fixed in PFA (4%) during 15 min and then incubated overnight in a 96 wells plate in the presence of X-Gal (1mg/ml) at 37°C as described in methods. The day after, the cells were washed once in PBS

and SA- β -Gal activity was detected by a blue cell staining visualized under an inverted microscope. Pictures were acquired and analyzed using the NIS Nikon software. A representative result is shown in the top of the figure C. SA- β -Gal positive cells were quantified by counting 10^2 cells on three separate fields for each condition. Results show the mean of 5 independent experiments (C). P21 was detected and Hsp60 was used as a loading control. Results are from one experiments representative of 5. The level of expression of p21 was quantified by densitometry analysis using ImageJ and results were normalized to the untreated condition (D).

Figure 5 : Inhibition of apoptosis and autophagy limits imatinib-induced K562 cells senescence

K562 shBim and K562 Bcl2 cells were infected by lentivirus coding for a shRNA anti-ATG7. Lentiviral particles were incubated for 24 h. Then, the cells were washed twice in PBS and grown for 6 days before sorting. Sample were analysed for Bim, Bcl2 and ATG7 expression by western-blotting (A). K562 shBim/ahATG7 and K562 Bcl2/shATG7 cells were incubated with vehicle only or imatinib (Ima, 1 μ M) for 48h. Then, an aliquot was incubated for 15 min in the presence of annexin-V-FITC. Samples were analyzed by flow cytometry and labelled cells were analyzed as described in methods. Results from 5 experiments are expressed as the % of annexin V-labelled cells (B, n = 5). An aliquot of K562 shBim/shATG7 and K562 Bcl2/shATG7 cells treated as above (10^5 cells) was washed in PBS, fixed in PFA (4%) during 15 min and then incubated overnight in a 96 wells plate in the presence of X-Gal (1mg/ml) at 37°C as described in methods. The day after, the cells were washed once in PBS and SA- β -Gal activity was detected by a blue cell staining visualized under an inverted microscope. Pictures were acquired and analyzed using the NIS Nikon software. A representative result is shown in the top of the figure C. SA- β -Gal positive cells were quantified by counting 10^2 cells on three separate fields for each condition. Results show the mean of 5 independent experiments (C).

Supplementary data

Figure 1S : Electronic microscopy analysis of the response of K562 cells to imatinib using annexin V-coupled gold beads

K562 cells were grown in the presence of vehicle only (A, control), imatinib (B), Ima, 1 μ M) or incubated with Z-vad (50 μ M) and Ima (1 μ M) for 48h (C). Upon treatment, cells were fixed and used as described in method. Results are representative of 3 independent experiments and provide several views. Note the annexin V-coupled gold beads labelling only on apoptotic cells Figure 1S B.

Figure 1

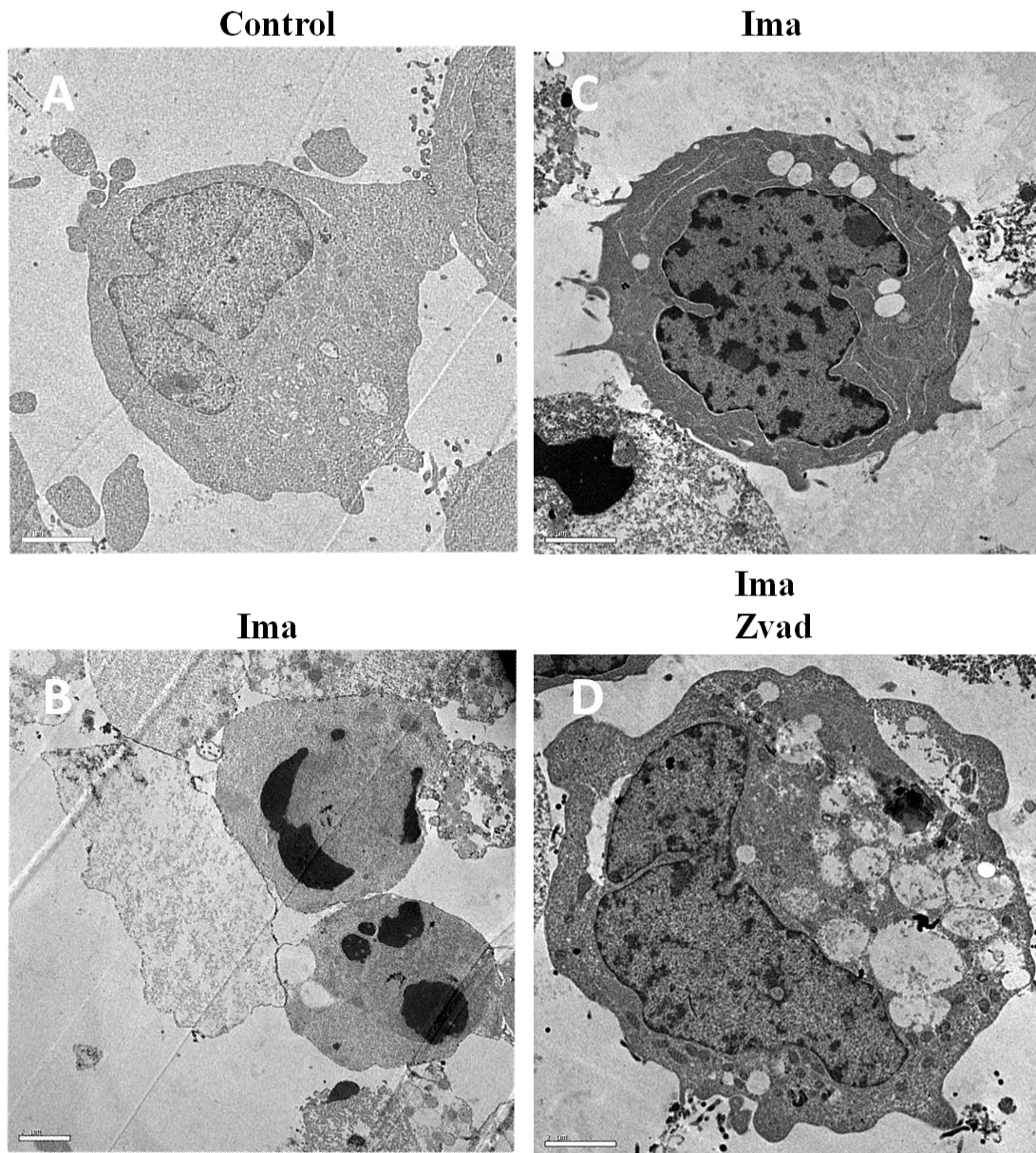


Figure 2

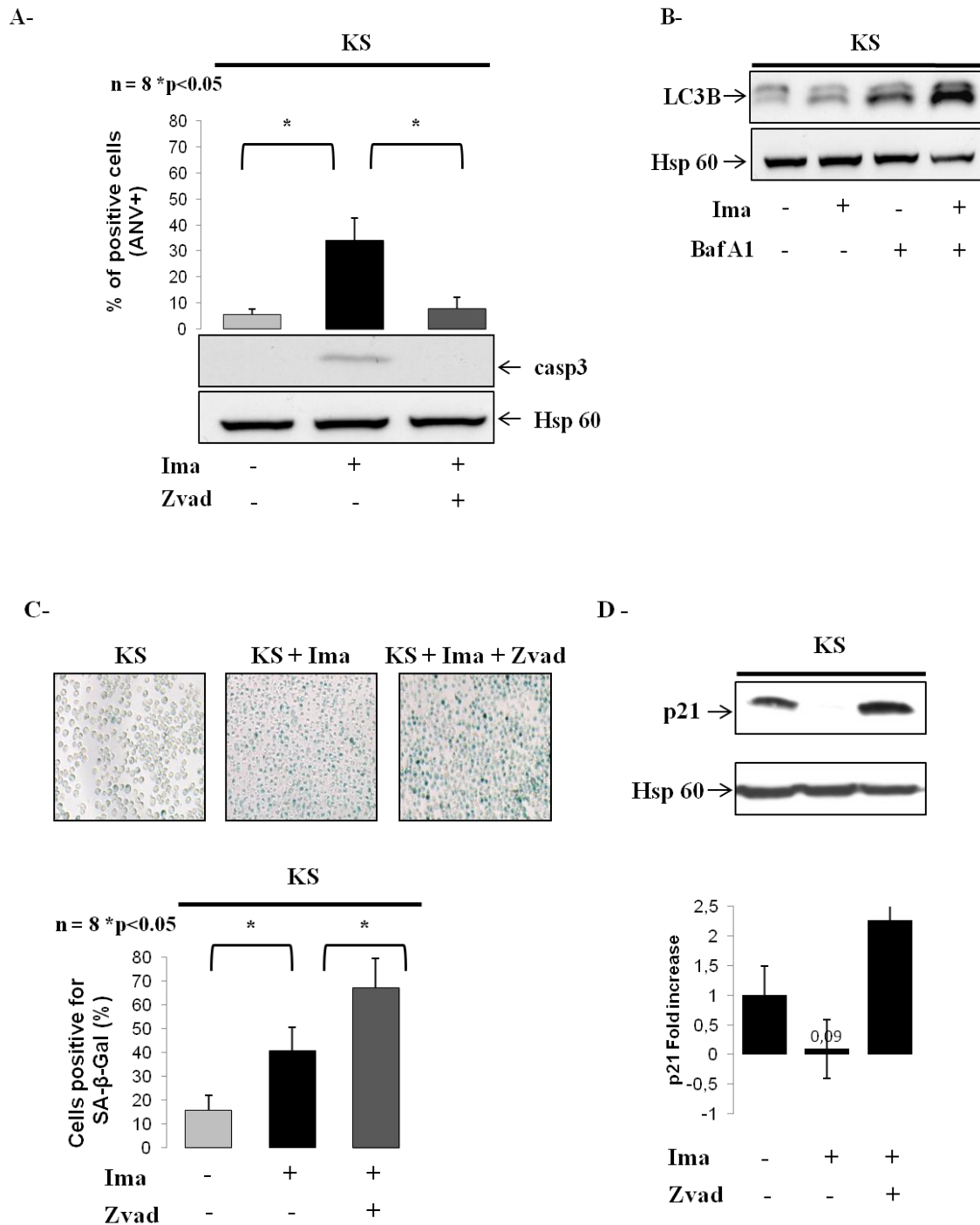


Figure 3

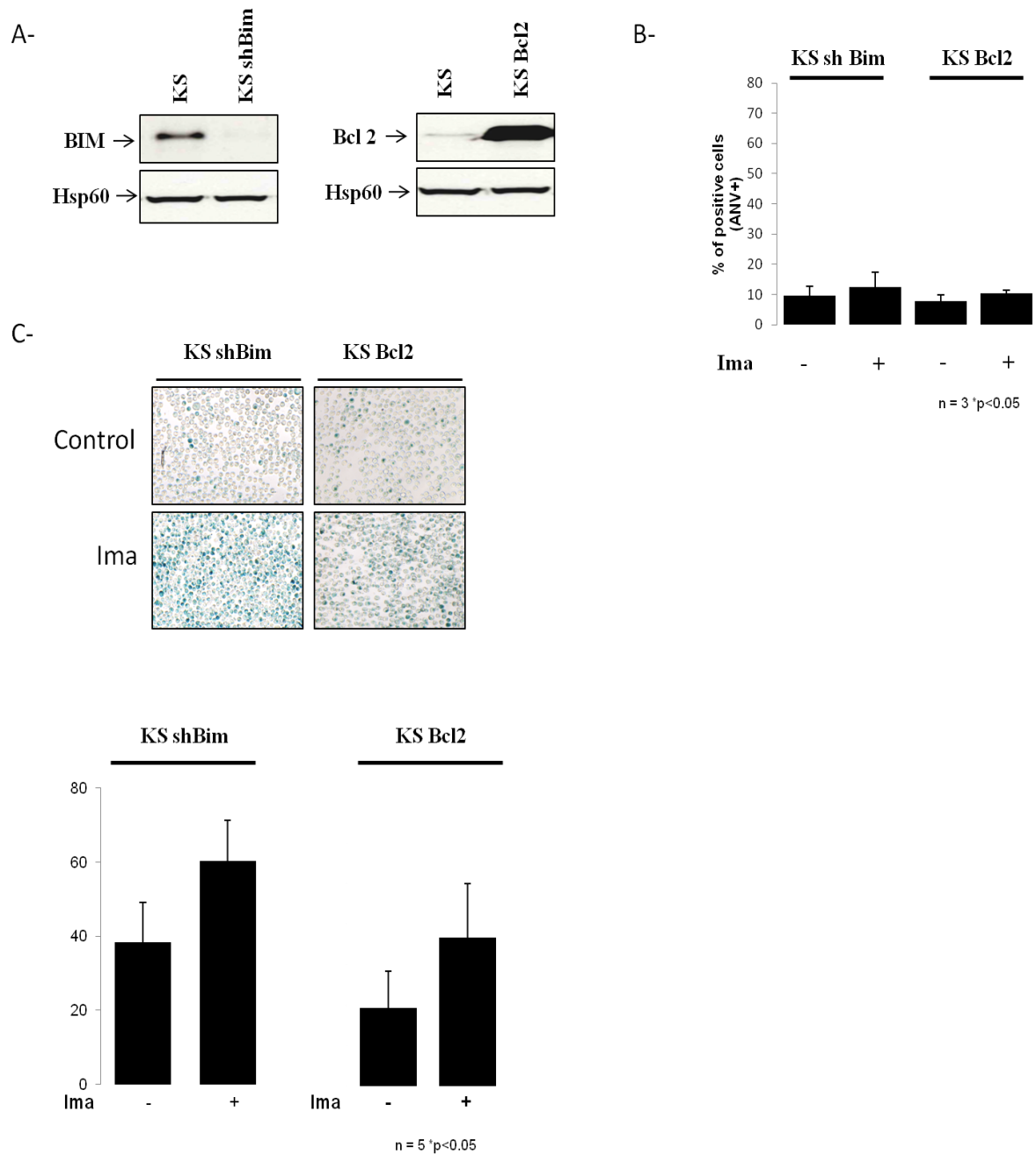


Figure 4

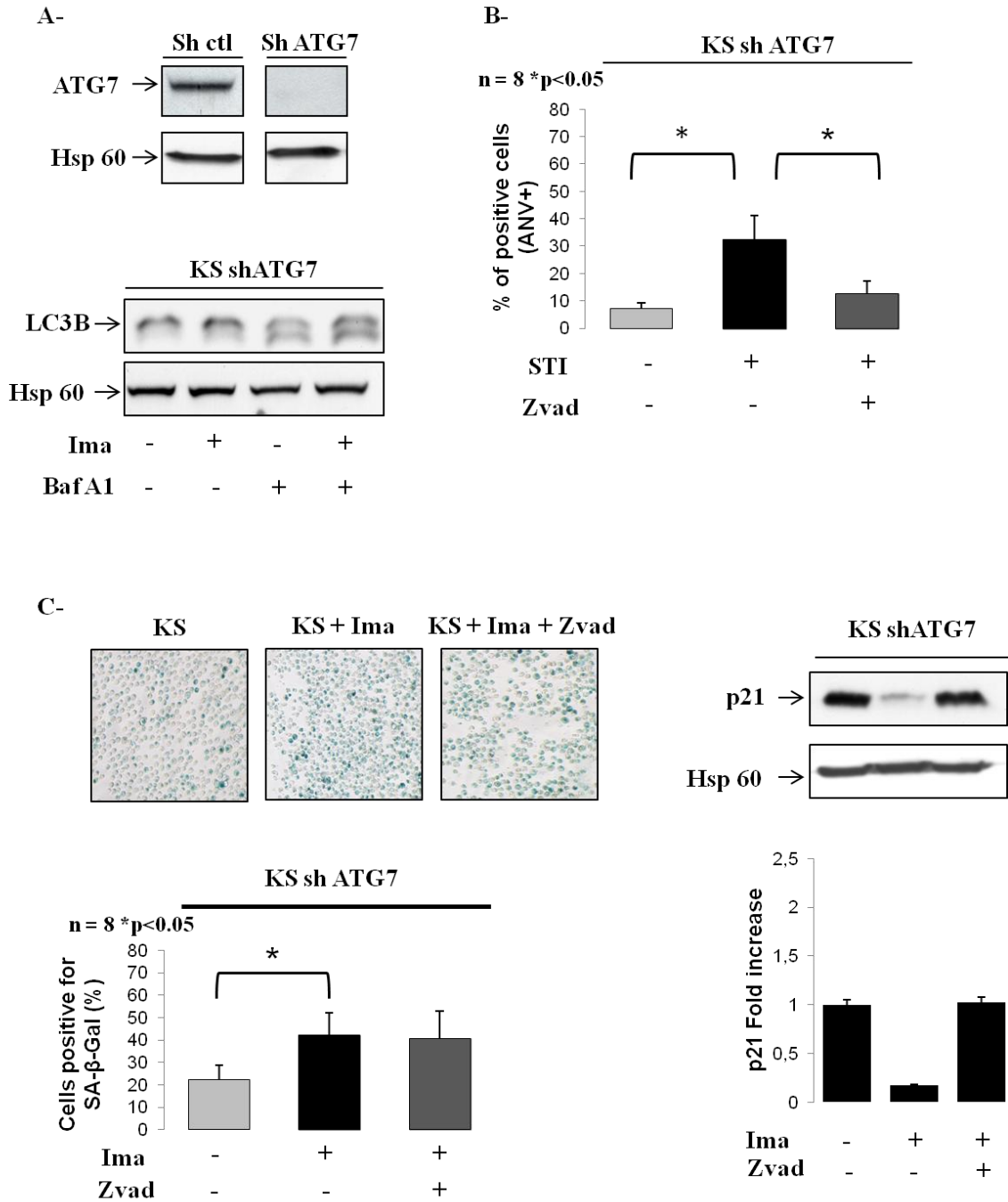
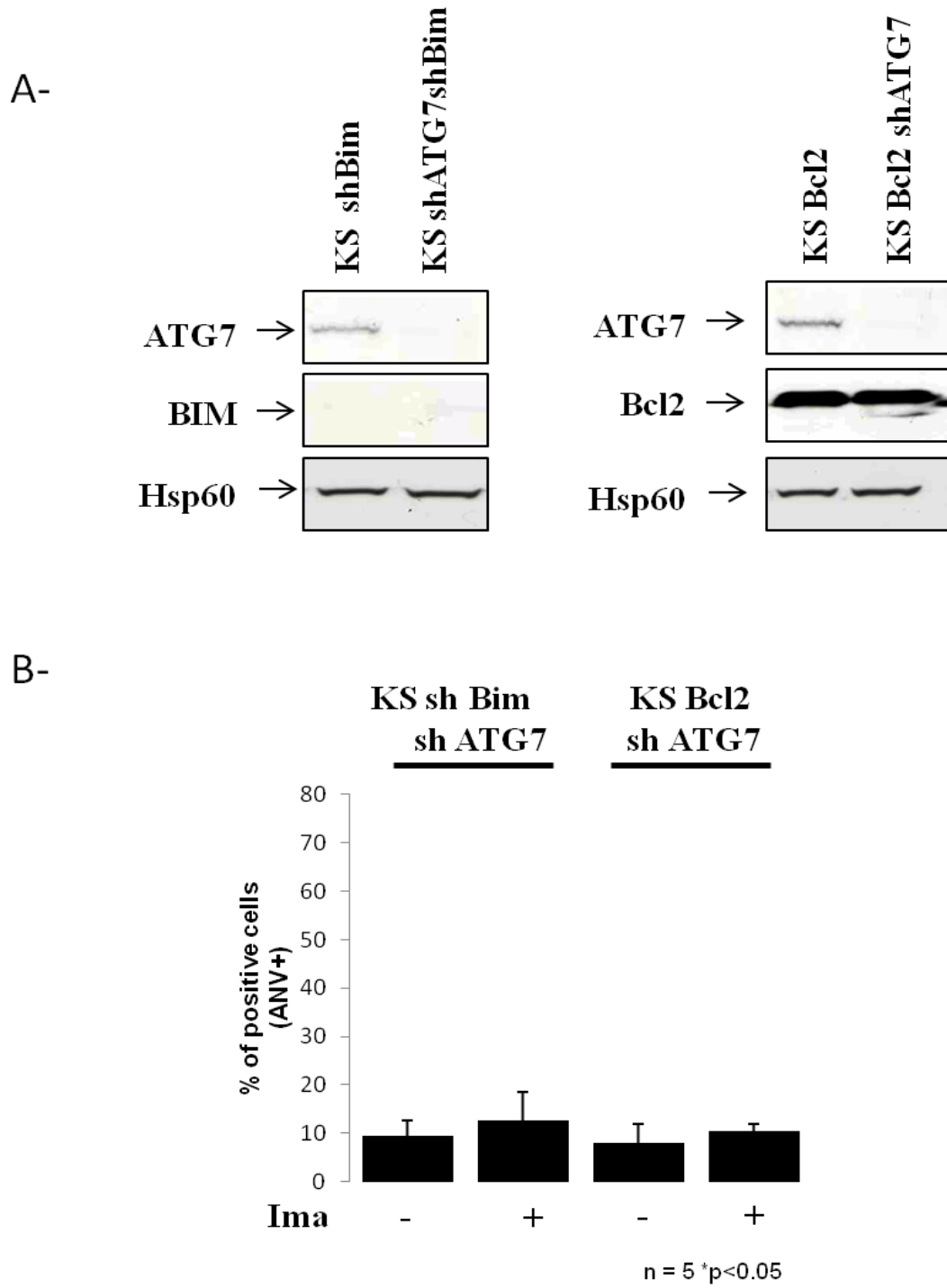


Figure 5



C-

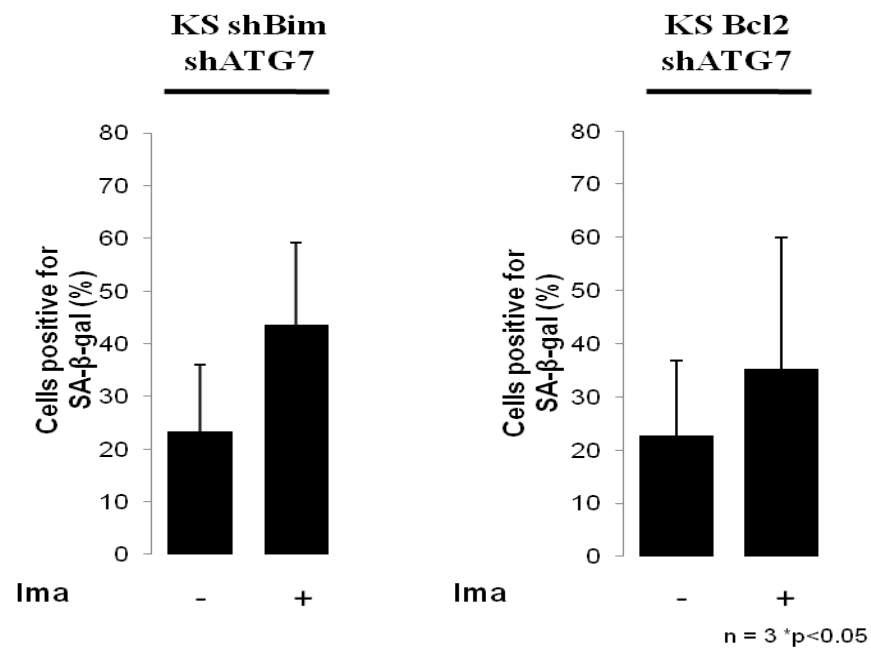
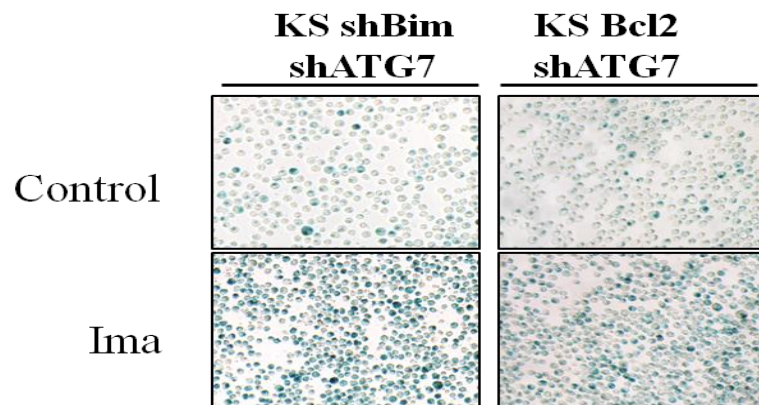


Figure 1SA

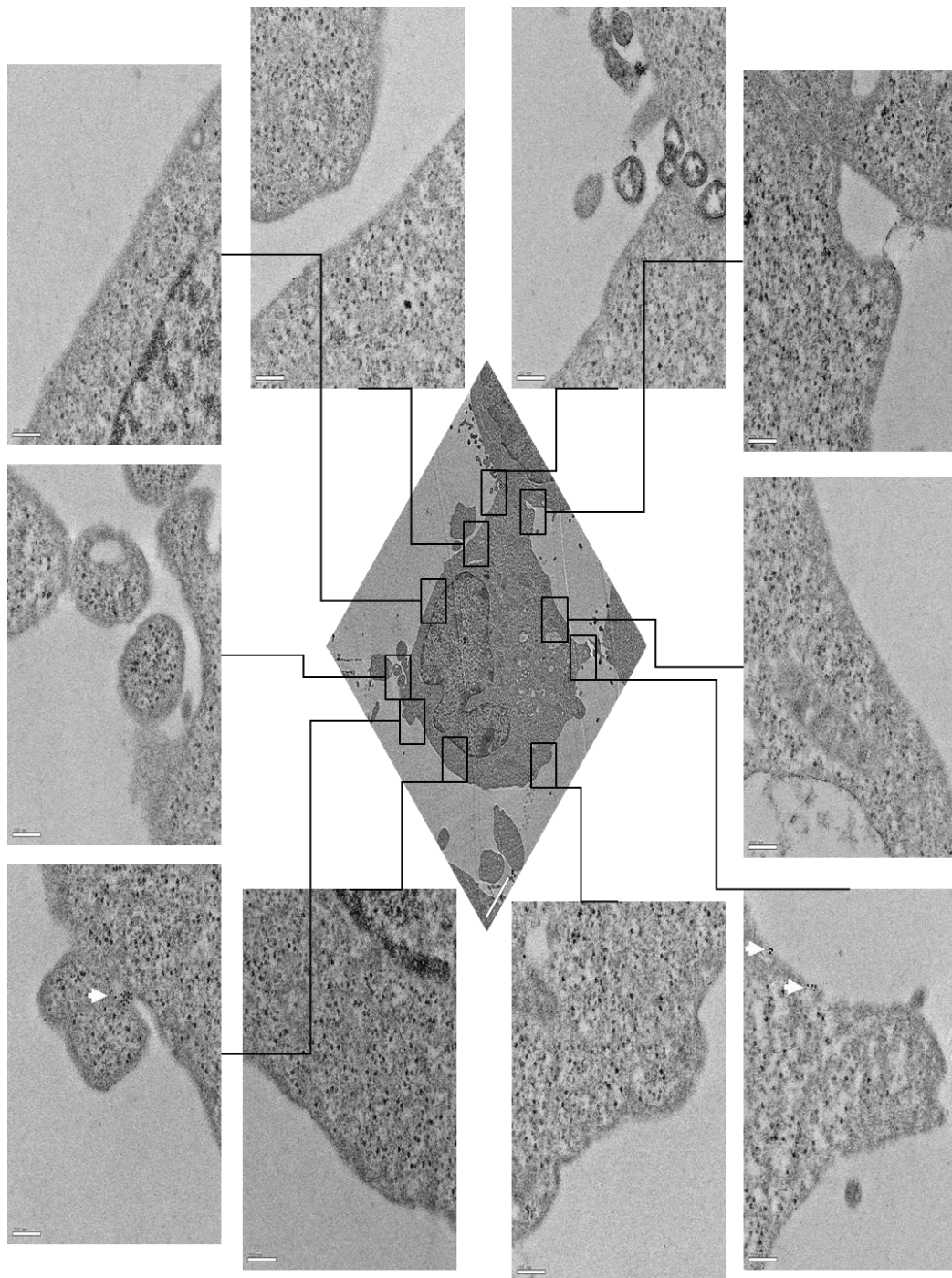


Figure 1SB

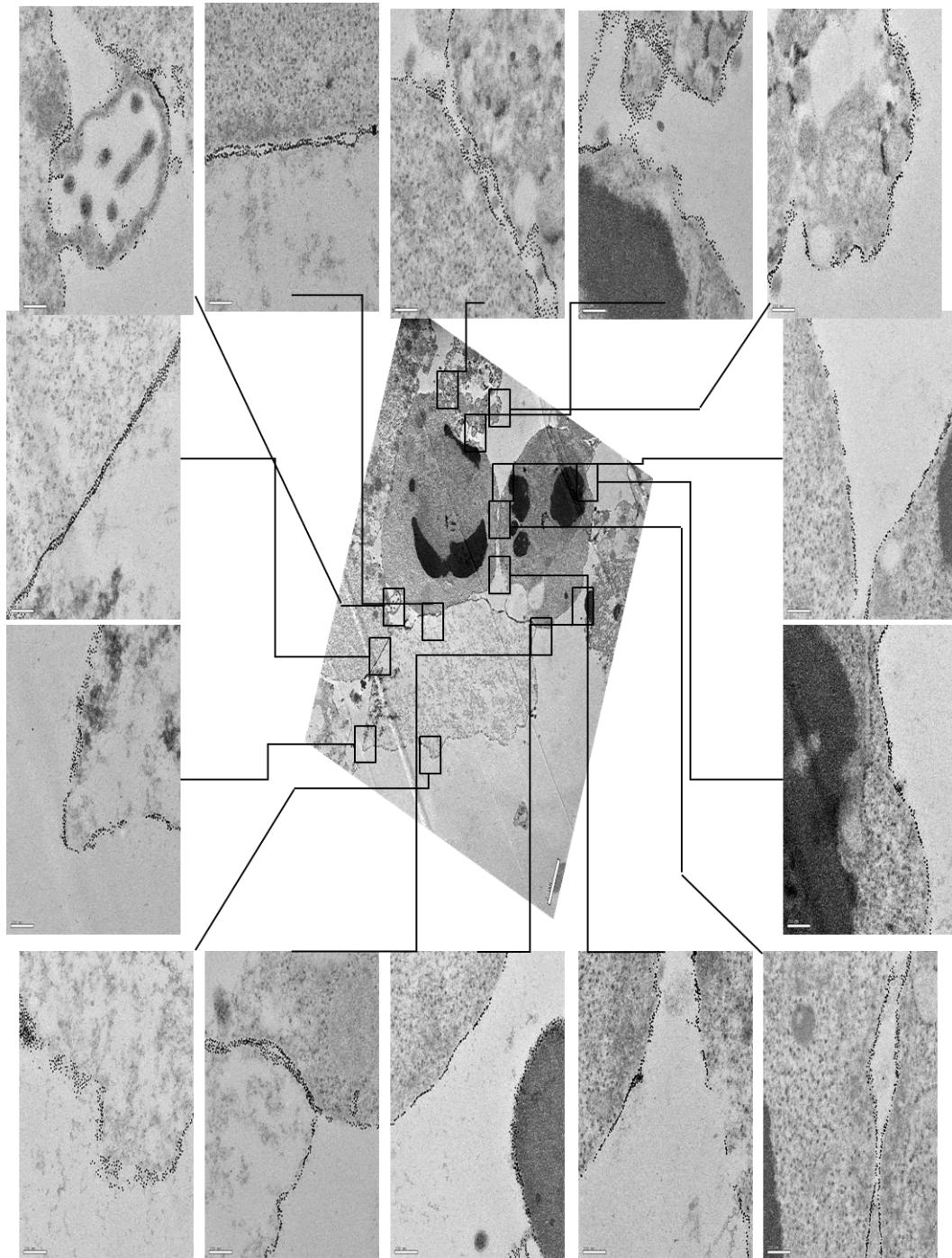
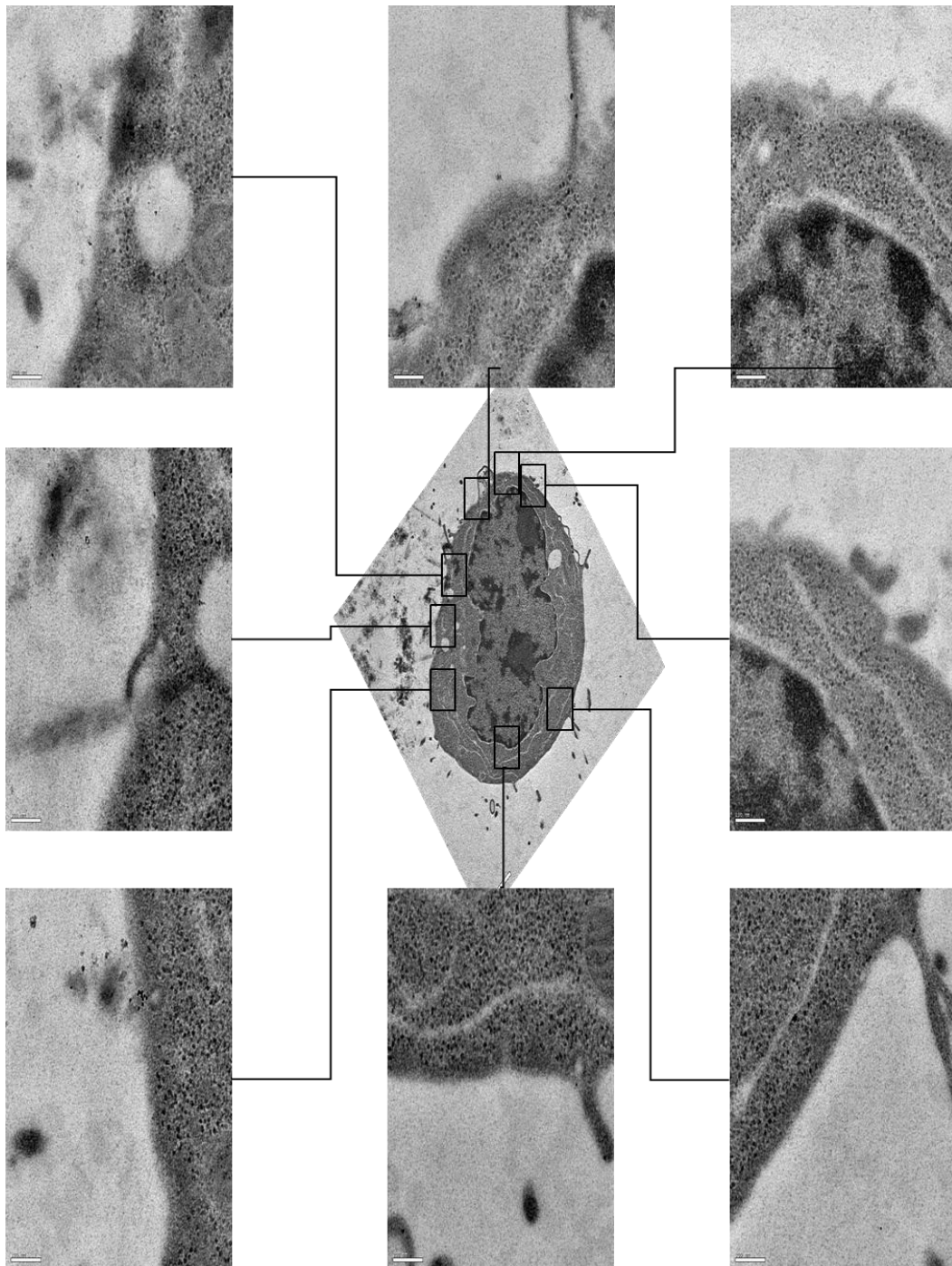


Figure 1SC



I.C. Conclusion

Dans cette étude, nous avons pour la première fois identifié, en plus de l'apoptose et de l'autophagie, une réponse sénescence dans les lignées K562 traitées par de l'imatinib (38% vs 14%). Ce mécanisme a également été observé en présence de nilotinib ou de dasatinib.

La réponse sénescence induite est d'autant plus importante que l'apoptose est inhibée, et ce, quelque soit le mécanisme d'inhibition : Z-vad (67% vs 38%) dans les cellules K562. En absence d'autophagie (K562 shRNA ATG7), l'imatinib induit toujours une réponse sénescence mais on perd la potentialisation de cette dernière en absence d'apoptose. Ces résultats suggèrent que l'on a ici deux types de sénescence : l'une indépendante et l'autre dépendante de l'autophagie.

Nous avons ensuite montré que la potentialisation de la sénescence observée était due à la levée de l'inhibition qu'exerce l'apoptose sur la sénescence. En s'appuyant sur des études ultérieures concernant les acteurs moléculaires clefs de l'apoptose induite par les ITK, nous avons surexprimé la protéine anti-apoptotique Bcl-2 ou inhiber l'expression de la protéine pro-apoptotique Bim. Ces modèles nous ont permis d'éliminer la composante apoptotique (en générant des lignées K562 déficientes pour l'apoptose). L'utilisation de ces lignées cellulaires (shRNA Bim et cDNA Bcl-2) montre que l'apoptose est une mort induite par les ITK qui exerce un rôle négatif sur la sénescence. En effet, dans les cellules shRNA Bim, la sénescence en réponse à l'imatinib est détectée en proportion comparable à celle des cellules sauvages dans les conditions où l'apoptose induite par l'imatinib était inhibée avec le Z-vad (60% vs 39%). De manière similaire les lignées surexprimant Bcl-2 ont une sénescence augmentée bien qu'elle soit plus faible que dans le modèle shRNA Bim (43% vs 20%). Ceci peut s'expliquer par le fait qu'une surexpression de Bcl-2 permet à la fois d'inhiber l'apoptose mais aussi l'autophagie notamment *via* l'inhibition de la protéine Beclin-1.

Nous avons ainsi confirmé que la potentialisation de la sénescence observée était bien due à la levée de l'inhibition qu'exerce l'apoptose sur la sénescence. La sénescence est une nouvelle CICD mise en évidence en réponse aux ITK, dans le modèle K562.

Certaines études rapportant l'implication de protéases dans les CICD comme par exemple la sérine protéase mitochondriale Omi/HtrA1 dans la nécroptose ou encore une aspartyl protéase lysosomale, la cathépsine D dans l'apoptose et l'autophagie, nous avons étudié leur participation dans la réponse sénescence. Dans le modèle K562, la sénescence observée en réponse à l'imatinib ne semble pas être dépendante de ces deux protéases puisque l'inhibition par deux inhibiteurs Ucf-101 inhibiteurs d'Omi/HtrA1 et CA-074, inhibiteurs de la cathepsine D ne modifie en rien cette réponse sénescence.

De façon intéressante, cette sénescence est de deux niveaux : la première est la sénescence « initiale » indépendante de l'autophagie (imatinib seul) et la seconde, la sénescence dépendante de l'autophagie (induite en absence d'apoptose). Ces deux mécanismes de sénescence pourraient expliquer l'absence de différence dans la réponse sénescence entre les lignée K562 Bcl-2 et K562 Bcl-2 shATG7 en présence d'imatinib.

Bien que l'on ait mis en évidence une hiérarchie entre l'apoptose, l'autophagie et la sénescence, les liens moléculaires entre ces mécanismes restent encore à caractériser. Il est possible qu'ils impliquent en partie certains substrats des caspases comme par exemple la protéine Rb ou encore la p21 qui est responsable de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G₁. Etant donné le spectre d'action du Z-Vad (aux concentrations utilisées), d'autres protéases telles que les calpaïnes pourraient être impliquées. En effet, leur rôle dans l'apoptose et l'autophagie et récemment dans la sénescence a été décrit ^{410,411}. Cependant, les modèles déficients dans la réponse apoptotique et/ou autophagique confirment nos résultats précédents et semblent écarter le rôle d'autres protéases.

Nous avons donc ici utilisé le modèle de la LMC et des ITK anti-Abl pour mettre en évidence les différentes morts cellulaires en réponse aux ITK anti-Abl et les régulations qui existent entre ces mécanismes. Même si ces résultats n'apportent pas directement des informations pour une meilleure prise en charge thérapeutique, ils amènent cependant de nouvelles informations sur les mécanismes de morts cellulaires et les régulations qui les contrôlent.

PARTIE 2

II. RÉSULTATS : PARTIE 2

Surexpression de Bcr-Abl dans la résistance au dasatinib : un modèle d'étude de la hiérarchie entre l'apoptose et la sénescence induite par l'oncogène Bcr-Abl (OIS).

II.A. Présentation du modèle

Le dasatinib permet de dépasser les résistances à l'imatinib à l'exception des résistances dues à une mutation de Bcr-Abl en T315I. Dans le laboratoire, il a été généré une lignée K562 résistante au dasatinib (5nM) pour étudier les mécanismes de résistance à cet ITK. En caractérisant le mécanisme de résistance, nous avons mis en évidence une surexpression importante à la fois de l'ARNm (30 fois) et de la protéine Bcr-Abl (17 fois). Il est décrit que la surexpression d'un oncogène comme par exemple Ras est capable d'induire une réponse apoptotique et/ou sénescence^{314,412}.

Nous avons donc utilisé ce modèle résistant au dasatinib pour étudier d'une part la sénescence induite par Bcr-Abl (OIS) et d'autre part les régulations existantes entre l'apoptose et la sénescence.

Pour cela nous avons suivi en cinétique l'impact du sevrage en dasatinib sur la réponse apoptotique et sénescence des cellules surexprimant Bcr-Abl. Après 24 heures de sevrage, nous avons observé une augmentation de l'activité tyrosine kinase de Bcr-Abl due à

la surexpression de la protéine associée quelques jours plus tard à une diminution de la viabilité cellulaire. Il était donc intéressant pour nous d'identifier les morts cellulaires induites lors du sevrage en dasatinib.

Nous avons détecté l'apoptose et la sénescence au cours du sevrage sur une cinétique de 21 jours. Après 10 jours de sevrage, 36% des cellules mourraient par apoptose et 41% de cellules étaient sénescents. Lorsque l'on poursuivait la cinétique à 13 jours, 46% des cellules étaient mortes par apoptose et 39% de cellules étaient sénescents. De façon intéressante, à 21 jours, les cellules prolifèrent à nouveau, ne présentent plus de surexpression de Bcr-Abl et sont sensibles au dasatinib. Afin de déterminer s'il existait une régulation entre l'apoptose et la sénescence lors du sevrage en dasatinib (hiérarchie/coopération), et si l'autophagie contrôlait ces réponses comme cela avait été détecté suite au traitement par l'imatinib, nous nous sommes placés dans les mêmes conditions de sevrage et nous avons détecté les différentes réponses dans des modèles cellulaires déficients pour l'apoptose ou l'autophagie. Lorsque l'apoptose est inhibée, l'OIS est potentialisée.

Dans ce modèle, l'autophagie, en tant que mécanisme de survie cellulaire, semble ne pas avoir d'effet sur la sénescence induite par la surexpression de Bcr-Abl. Néanmoins, nous avons ici un second modèle confirmant l'effet limitant de l'apoptose sur la sénescence.

II.B. Résultats

Surexpression de Bcr-Abl dans les lignées K562 résistantes au dasatinib (KRD)

Les cellules résistantes au dasatinib (KRD) ont été obtenues en maintenant les cellules K562 sensibles (KS) en culture en présence de concentrations croissantes de dasatinib jusqu'à atteindre la concentration finale de 5 nM. Cette concentration a été choisie par rapport aux concentrations de dasatinib plasmatiques mesurées chez les patients traités. Nous avons montré par FISH (Figure 1A) ainsi que par RT-PCR quantitative une augmentation du nombre de copie du gène Bcr-Abl, de l'ARNm et par Western Blot de la protéine Bcr-Abl. En effet, les résultats montrent une surexpression de 30 fois de l'ARNm de Bcr-Abl et de 17 fois de la protéine Bcr-Abl par rapport aux cellules K562 sensibles. Bien que la surexpression de Bcr-Abl soit importante, elle n'est pas accompagnée d'une augmentation de l'activité tyrosine kinase de l'oncogène du fait de la présence de dasatinib dans le milieu (Figure 1B).

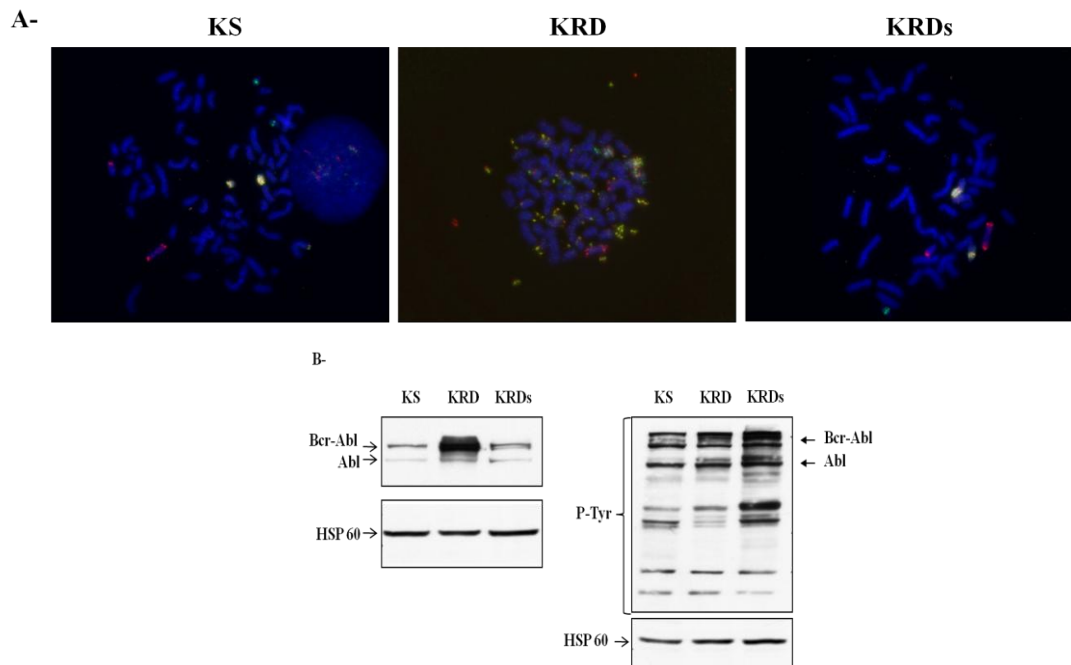


Figure 1 : Détection de l'oncogène dans les cellules sensibles (KS), résistantes au dasatinib (KRD) et les cellules résistantes au dasatinib sevrées (KRDs). Détection du nombre de copies du gène Bcr-Abl par FISH (Fluorescence In situ Hybridation) (A). Détection de l'expression de Bcr-Abl dans les cellules KS, KRD et KDR sevrées à 21 jours de sevrage (B). Détection des protéines tyrosine phosphorylées dans les cellules KS, KRD et KRD sevrées 24h (C).

Ces résultats montrent que la résistance des KRD est dépendante de la surexpression de Bcr-Abl, c'est une résistance acquise. La surexpression d'oncogène pouvant conduire à de la sénescence, comme par exemple lorsque Ras est activé, il est intéressant dans le cadre de mon projet de thèse, de déterminer si la surexpression de Bcr-Abl peut conduire à la mort de ces cellules.

Induction de l'apoptose lors du sevrage en dasatinib des cellules KRD

Nous avons suivi au cours d'une cinétique la prolifération et la mort cellulaire des cellules KRD sevrées en dasatinib. Nous observons dans les premières 24h une augmentation de l'activité tyrosine kinase que nous détectons en western blot p-Tyr. Dès trois jours de sevrage, une diminution de la prolifération et une augmentation importante de la mort cellulaire sont observées. De façon surprenante, au delà de 15 jours de sevrage les cellules prolifèrent à nouveau.

Afin de déterminer quelles morts cellulaires étaient induites par le sevrage, j'ai tout d'abord suivi en cinétique l'apparition de l'apoptose par un marquage à l'aide d'Annexine-V. Les résultats montrent une augmentation croissante du nombre de cellules apoptotiques jusqu'à 13 jours avec 66% de cellules Annexine-V positives vs 19% pour les cellules non sevrées en dasatinib (Figure 2A). L'apoptose s'accompagne d'un clivage de la PARP (poly (ADP-ribose) polymérase, fragment à 89 kDa) et d'une activation de la caspase 3 (fragment à 17 kDa). Le clivage de ces deux protéines est bloqué lorsque les cellules sont traitées par un inhibiteur pan caspase (Zvad) (Figure 2B).

En absence d'apoptose (inhibition des caspases par le Zvad), il persiste une population Annexine-V positive suggérant soit une inhibition incomplète par le Zvad, soit l'existence d'une apoptose indépendante des caspases (CICD) dans notre modèle. En effet, à 10 et 13 jours de sevrage, malgré le traitement par le Zvad, 18% et 48% de la population reste Annexine-V positive (Figure 2A).

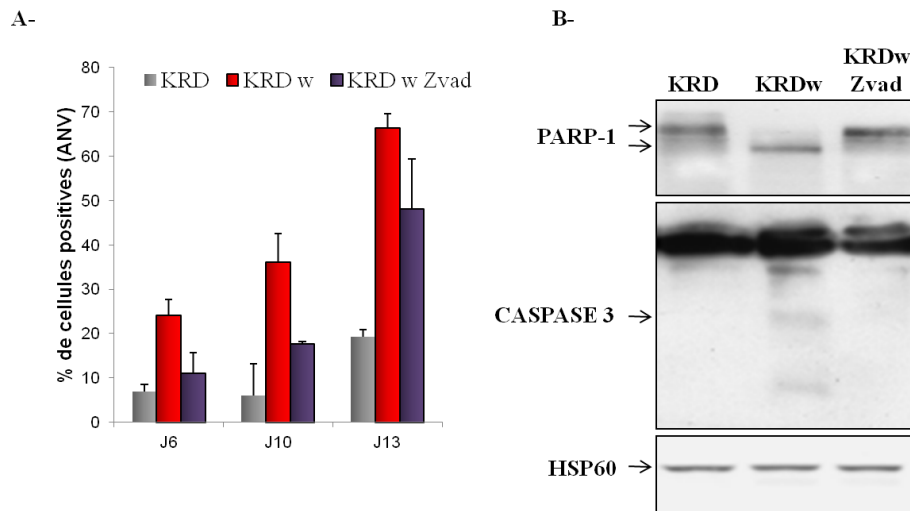
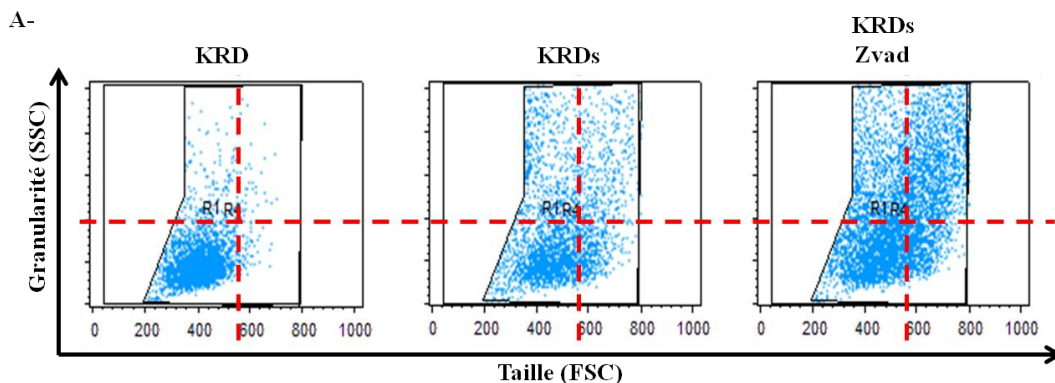


Figure 2 : Détection de l'apoptose sur les cellules résistantes au dasatinib (KRD), sevrées (KRDs) et sevrées en présence de Z-vad (KRDs Zvad). Mesure du pourcentage de cellules marquées par l'Annexine-V en cytométrie en flux à J6, J10 et J13 (A). Détection du clivage de la PARP et de la caspase 3 en western blot à J10 (B).

En conclusion, le sevrage des cellules KRD induit de l'apoptose mais également, de façon non négligeable, des morts caspases indépendantes (CICD). Nous avons donc voulu identifier les CICD induites.

Le sevrage en dasatinib induit de la sénescence

Lors du sevrage en dasatinib, nous avons constaté un arrêt du cycle cellulaire mais également une augmentation importante de la granularité et de la taille cellulaire par observation en microscopie et en cytométrie en flux (Figure 3A et B). Ces paramètres m'ont conduit à détecter la sénescence induite par les oncogènes.



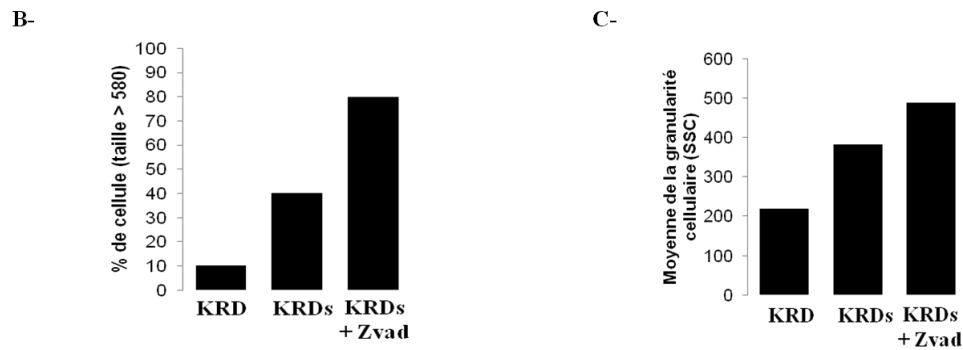
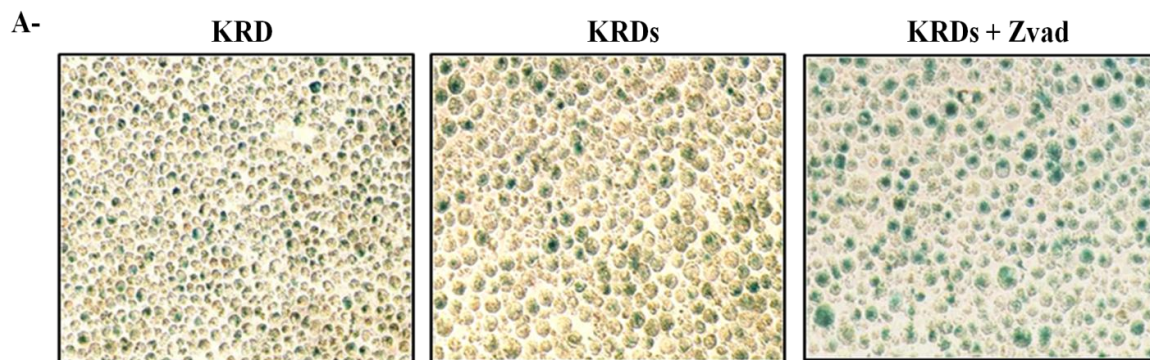


Figure 3 : Détection de la granularité (SSC) et de la taille (FSC) des cellules résistantes au dasatinib (KRD), sevrées (KRDs) et sevrées en présence de Zvad (KRDs + Zvad) après 10 jours. Résultats de cytométrie en flux, SSC en fonction du FSC (A). Quantification sur une expérience représentative du pourcentage de cellules dont la taille (B) et la granularité (C) sont supérieures à la population vivante.

L'activité β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β -gal) a été mesurée au cours du sevrage en dasatinib. Les résultats obtenus après 10 jours de sevrage montrent que 41% de cellules (vs 15% de cellules en présence de dasatinib) entrent en sénescence contre 65% lorsque l'apoptose est inhibée par le peptide Z-vad (Figure 4). Ceci suggère un rôle limitant de l'apoptose sur la sénescence induite par la surexpression de l'oncogène Bcr-Abl.



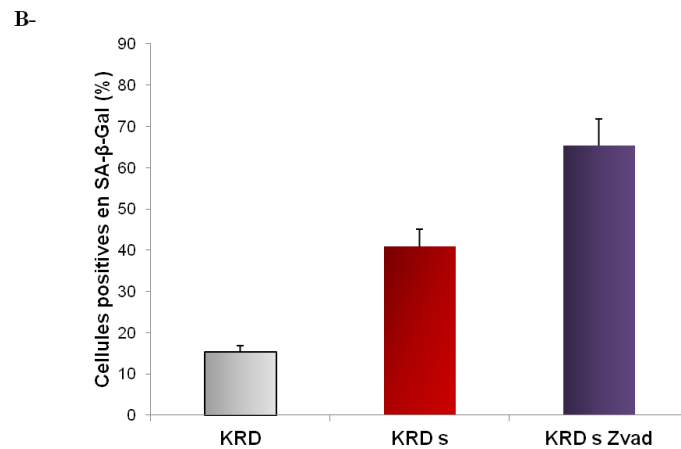


Figure 4 : Détection et quantification de la sénescence SA-β-gal sur les cellules KRD, KRDs et KRDs sevrées en présence de Zvad après 10 jours de sevrage. Images de microscopie photonique (A). Quantification de la sénescence (B) ($n = 3$, $p < 0.05$).

Ces résultats confirment bien le rôle limitant de l'apoptose sur la sénescence comme nous avons pu le voir dans le modèle d'induction de morts cellulaires par les ITK.

L'autophagie, promoteur ou frein de la sénescence ? un rôle à confirmer.

Mes résultats concernant l'autophagie dans ce modèle restant à confirmer je dois encore accumulé un nombre suffisant de résultats pour trancher définitivement sur son rôle vis-à-vis de la sénescence. En effet, il existe dans mes premiers résultats un manque de reproductibilité. De plus, les photos prises en microscopie photonique et la quantification du marquage SA-β-gal montre encore une fois qu'il est nécessaire dans ce type d'approche d'être prudent sur l'interprétation des résultats à la vue de l'hétérogénéité de la réponse et du facteur manipulateur dépendant.

Si on se tient à ce que l'on peut observer sur les images de microscopie (Figure 5A), il semblerait que le sevrage induise moins de sénescence dans les populations KRD shATG7 que sur les KRD. Cette observation est confirmée par une quantification du marquage avec 38% contre 63% de cellules SA-β-Gal positives respectivement ce qui suggère que l'autophagie régule positivement la sénescence induite lors du sevrage (Figure 5B).

Dans le cas où l'apoptose est bloquée, il semble au contraire que la sénescence soit plus importante pour les populations KRD shATG7 que pour les KRD lors du sevrage. En effet, la quantification montre 82% (KRD s shATG7) vs 75% (KRD s) de cellules marquées. Il convient donc d'augmenter le nombre d'expériences pour pouvoir déterminer si cette différence est significative. Il semblerait cependant que l'autophagie ait un rôle de frein sur la sénescence dans les conditions où l'apoptose est absente ce qui est opposé à la régulation mise en évidence en réponse aux ITK.

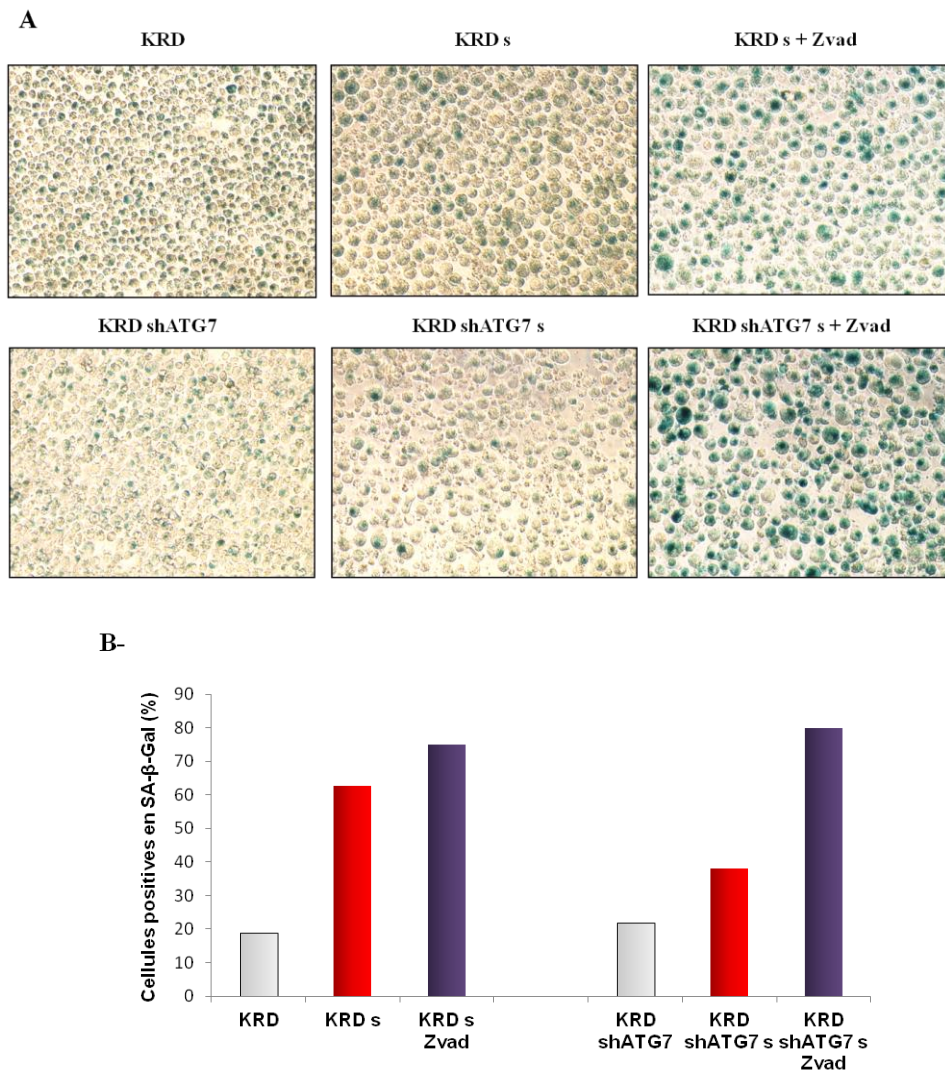


Figure 5 : Détection et quantification de la sénescence SA-β-gal sur les cellules KRD ou KRD shATG7 sevrées en dasatinib pendant 10 jours (n=2). Images de microscopie photonique (A). Quantification de la sénescence (B).

II.C. Conclusion

Dans cette étude, nous montrons que les cellules K562 résistantes au dasatinib (KRD) surexprimant Bcr-Abl sont capables de rentrer en sénescence et en apoptose lorsque l'on retire à la cellule la pression due à l'inhibiteur de tyrosine kinase. Comme cela a été décrit pour l'oncogène Ras, lorsque Bcr-Abl est surexprimé et actif (c'est-à-dire lorsqu'on retire l'ITK), de l'apoptose et de la sénescence sont alors induites. Nous avons également confirmé la potentialisation de la sénescence par l'inhibition des caspases avec le Z-vad. Cependant, le rôle de l'autophagie est beaucoup plus ambigu. En effet, un défaut d'autophagie semble restreindre la réponse sénescence lors du sevrage alors qu'elle la potentialise lorsque l'apoptose est inhibée.

Même si la régulation de l'apoptose sur la sénescence a été retrouvée dans ce modèle de sevrage en dasatinib, il semblerait que les voies de signalisation impliquées soient différentes de celles impliquées dans la sénescence induite par un ITK. En effet, les résultats montrent que l'apoptose induite lors du sevrage n'est pas totalement inhibée par le peptide Z-vad, le shRNA Bim (24% vs 3%) ou en surexprimant la protéine Bcl-2 (10% vs 2%) contrairement à ce que l'étude des morts cellulaires en réponse aux ITK mettait en évidence. De plus, la lignée surexprimant Bcl-2 semble insensible à la réponse sénescence lors du sevrage en dasatinib contrairement à la lignée K562 shBim. On peut penser que cette absence de réponse sénescence est due au rôle de Bcl-2 dans le mécanisme d'autophagie. En effet, une surexpression de Bcl-2 inhibe le mécanisme d'autophagie dépendant de Beclin-1. Ainsi, si l'autophagie est importante pour cette sénescence (comme nous l'avons constaté sur les réponses cellulaires aux ITK) cela pourrait expliquer la faible sensibilité de cette lignée pour la sénescence.

Néanmoins, nos résultats préliminaires sur le rôle de l'autophagie dans ce modèle tendent à montrer que l'autophagie a bien un rôle négatif sur l'apoptose mais son rôle sur la sénescence reste difficile à interpréter. A 10 jours de sevrage, l'autophagie n'a aucun effet sur la réponse sénescence mais lorsqu'on se place dans les conditions où l'apoptose est absente, il semblerait que l'autophagie soit un frein à la sénescence. Ce résultat reste contradictoire à ce que l'on a

pu observer en réponse aux ITK. Il serait intéressant d'étudier le rôle de mTOR dans ces mécanismes : dans un modèle d'induction de la sénescence par l'oncogène Ras, mTOR est non seulement capable d'inhiber les étapes initiatrices de l'autophagie mais peut également dans un complexe TASC (TOR-Autophagy Spatial Coupling Compartment) au niveau de l'autolysosome favoriser l'autophagie ⁴¹³.

Nos cellules K562 n'expriment ni la protéine p53, ni la protéine p16. Or ces deux protéines sont impliquées dans les deux grandes voies de signalisation de la sénescence induite par Ras. Il est donc essentiel pour nous de déterminer les voies de signalisation p53 indépendantes pouvant être activées. L'importance de la voie p38MAPK dans la sénescence induite par un stress génotoxique dans des cellules mutées sur le gène p53 a été rapportée. En effet, dans ces cellules, l'activation de la p38MAPK suffit à maintenir les cellules en sénescence. A l'opposé, son inhibition permet aux cellules de « by passer » la sénescence ³²⁹. La protéine p21 est régulée par p53 mais elle peut aussi être activée par d'autres facteurs de transcription, par exemple, E2F, C/EBP α et β ou encore STAT ⁴¹⁴. Les facteurs clef de la prolifération comme les Klf (Kruppel like transcript factor) et notamment le KLF4 sont capables d'activer p21 et permettent le passage du checkpoint entre la phase G1 et la phase S du cycle cellulaire ⁴¹⁵. Un autre facteur, Cdx2, est intéressant car c'est un suppresseur de tumeur dont l'expression est souvent inhibé dans les cancers comme le cancer colorectal et son inhibition est corrélée à une diminution de la protéine p21 ⁴¹⁶.

Cette étude met en évidence une hiérarchie entre l'apoptose et la sénescence induite par un oncogène comme nous l'avons déjà observé dans la réponse aux ITK. En effet, l'apoptose aurait un rôle limitant sur l'OIS dans notre modèle cellulaire. Cependant cette étude doit être complétée pour déterminer l'implication exacte de l'autophagie en tant que mécanisme de survie ainsi que pour identifier les voies de signalisation p53 indépendantes communes à l'apoptose et la sénescence qui pourraient permettre le shift de la cellule vers l'une ou l'autre de ces morts cellulaires.

PARTIE 3

III. RÉSULTATS: PARTIE 3

Peut-on contrecarrer les résistances aux ITK par des morts non apoptotiques ?

Acide mycophénolique, un agent capable de dépasser les résistances aux ITK par la mort apoptotique ou par la sénescence like des cellules résistantes de LMC.

III.A. Introduction

Malgré l'efficacité des ITK, des résistances persistent notamment dans les phases blastiques de la maladie et nous pouvons suspecter l'apparition de nouveaux mécanismes de résistance dans le futur avec le développement des nouveaux ITK. Actuellement, 20% des patients LMC sont résistants aux thérapeutiques ou rechutent après une rémission. Il est donc fondamental de savoir comment restaurer la sensibilité à l'apoptose et/ou éliminer une cellule de LMC résistante aux ITK par des morts non apoptotiques.

L'expertise du laboratoire sur les résistances aux ITK m'a permis de bénéficier de modèles cellulaires résistants à l'imatinib, au nilotinib et de modèles présentant des mutations de Bcr-Abl (lignée Baf3-Bcr-Abl sauvage ou mutée en T315I). Les lignées K562 résistantes générées au laboratoire ont des mécanismes de résistance différents qui ont été précédemment caractérisés. La lignée K562-R (résistante à l'imatinib) surexprime la protéine Hsp70 qui bloque la signalisation apoptotique à au moins six niveaux différents comme nous l'avons vu

dans l'introduction. La lignée K562-RN surexprime plusieurs tyrosines kinases telles que Lyn et Axl.

Des études protéomiques entreprises par le laboratoire ont permis de détecter dans plusieurs lignées cellulaires résistantes aux ITK une surexpression d'une enzyme, l'Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2 (IMPDH2), enzyme clé dans la biosynthèse de la guanosine triphosphate (GTP). Cette surexpression est fréquemment retrouvée dans les pathologies cancéreuses. L'acide mycophénolique (MPA, métabolite actif du mofetil mycophenolate) est un inhibiteur non compétitif et sélectif de l'IMPDH2. Il est utilisé comme immunosuppresseur dans les transplantations rénales⁴¹⁷. L'inhibition de cette enzyme par le MPA diminue la croissance de plusieurs tumeurs (foie, pancréas, colon, lymphomes) en induisant la mort cellulaire^{418 419}. L'IMPDH2 semble donc indispensable à la prolifération et à la survie des cellules cancéreuses.

Il a été rapporté que le MPA bloque le cycle cellulaire en phase G₁ ou en phase S car l'inhibition de l'IMPDH2 conduit à l'épuisement du pool de GTP de la cellule. De plus, le MPA a été décrit dans les lymphocytes comme un agent nécrotique⁴²⁰. Nous savons également que dans le modèle K562, il potentialise l'effet apoptotique de l'imatinib⁴²¹.

Nous avons pu montrer que le MPA induit la mort des cellules de LMC sensibles ou résistantes aux ITK (collaboration avec le Dr P.Legembre). Cependant, le mécanisme d'action du MPA sur les cellules de LMC sensibles ou résistantes ainsi que les morts induites n'a jamais été étudié. Nous nous sommes donc intéressés aux types de morts que pouvait induire le MPA dans les cellules de LMC. Pour cela, nous avons utilisé les lignées K562 sensibles ou résistantes ainsi que des cellules primaires CD34⁺ de LMC afin de déterminer quelles morts cellulaires permettaient de dépasser les résistances aux ITK et déterminer s'il existait une hiérarchie ou une coopération entre elles.

Notre étude montre que le MPA est capable de faire mourir les cellules sensibles ou résistantes aux ITK quel que soit le mécanisme de résistance en cause en bloquant le cycle cellulaire dans la progression de la phase S. De façon intéressante, 15% des cellules K562 sensibles ou résistantes aux ITK meurent par apoptose en réponse au MPA. Ce même agent est capable d'induire une apoptose massive des cellules Baf3-Bcr-Abl sauvages ou mutées en

T315I ainsi que d'autres lignées de LMC telles que les Lama-84 ou les AR-230. Le MPA induit des dommages à l'ADN (détectés par la phosphorylation de γ H2AX) qui sont reversés par l'addition de guanosine. Après trois jours de traitement au MPA, la population de cellules K562 a un volume augmenté et une vacuolisation importante qui peut être observée au microscope. Cette population présente également une augmentation de l'activité SA- β -Gal. Nous avons donc ici, toutes les caractéristiques d'une sénescence avec un arrêt irréversible du cycle, une augmentation du volume cellulaire et de l'activité SA- β -Gal. Nous n'avons réussi à détecter aucune nécrose et aucun mécanisme dépendant de la protéase Omi/Htr1 comme cela avait été décrit dans le cas de nécrose like⁴⁰².

Nous avons déterminé si l'autophagie pouvait exercer un rôle dans cette sénescence induite par le MPA comme celui que nous avons observé en réponse aux ITK. Malgré les différentes approches utilisées pour inhiber le mécanisme autophagique (siRNA LC3B, blocage du flux autophagique par la chloroquine ou le 3-méthyl adénine, shRNA anti-ATG7) nous n'avons observé aucun effet sur la sénescence induite par le MPA. Il semble donc que l'autophagie ne protège pas la cellule de LMC de la sénescence induite par le MPA.

Nous tenions à vérifier le potentiel du MPA sur des cellules primaires provenant de patients atteints de LMC pour valider nos données expérimentales obtenues *in vitro*. *Ex vivo*, les cellules CD34⁺ de patients atteints de LMC sensibles ou résistants aux ITK, répondent au MPA par une apoptose massive comme nous avons pu le montrer en cytométrie en flux à l'aide de l'Annexine-V. Malgré une augmentation de la taille des cellules, aucune sénescence n'a pu être observée.

Cette étude montre donc que le MPA est à la fois capable de contourner la résistance en induisant de la sénescence (lignées cellulaires K562 sensibles ou résistantes) mais également de restaurer la sensibilité à l'apoptose (cellules de patients de LMC sensibles ou résistants aux ITK, lignées cellulaires Bcr-Abl sauvages ou mutées). Nos résultats suggèrent donc que le MPA est tout à fait prometteur pour dépasser la résistance aux ITK quel que soit le mécanisme de résistance mis en cause : en induisant de la sénescence ou de l'apoptose. De plus, cet agent et les modèles cellulaires utilisés permettent d'étudier les liens moléculaires qui existent entre les différents types de morts.

III.B. Article 2

Mycophenolic acid overcomes imatinib and nilotinib resistance of chronic myeloid leukemia cells by apoptosis or a senescent-like cell cycle arrest.

Claire Drullion¹, Valérie Lagarde¹, Romain Gioia¹, Patrick Legembre², Muriel Priault³, Bruno Cardinaud¹, Eric Lippert¹, François-Xavier Mahon¹, Jean-Max Pasquet¹

4- Hématopoïèse leucémique et cibles thérapeutiques, INSERM U1035, Université Bordeaux Ségalen, 146 rue Léo Saignat Bat TP 4^e étage, 33076 Bordeaux, France.

5- Université RENNES-1, IRSET, EA-4427 SERAIC, 2 Avenue du Professeur Léon Bernard, 35043 RENNES, France.

6- UMR CNRS 5095, I.B.G.C, 1 rue Camille Saint Saëns, Université Bordeaux Ségalen, 33077 Bordeaux, France.

Soumis dans *Leukemia Research and Treatment*

Abstract

In this study we used K562 cells sensitive or generated resistant to imatinib or nilotinib to investigate their response to mycophenolic acid (MPA). MPA induced DNA damage leading to cell death with a minor contribution of apoptosis, as revealed by annexin V labeling (up to 25%). In contrast, cell cycle arrest and positive staining for senescence-associated β -galactosidase activity, were detected for a large cell population (80%). MPA-induced cell death was potentialized by the inhibition of autophagy and this is associated to the upregulation of apoptosis. In contrast, senescence was neither decreased nor abrogated in autophagy deficient K562 cells. Primary CD34 cells from CML patients sensitive or resistant to imatinib or nilotinib respond to MPA although apoptosis is mainly detected. These results show that MPA is an interesting tool to overcome resistance in vitro and in vivo mainly in the evolved phase of the disease.

Introduction

Chronic myeloid leukaemia (CML) is a myeloproliferative disorder characterized by a reciprocal translocation leading to the Philadelphia chromosome (Ph⁺) with a fusion gene BCR-ABL, the molecular hallmark of CML and Ph-positive acute lymphoblastic leukaemia (LAL) [1-3]. The resulting chimeric protein contains the kinase domain of the tyrosine-kinase Abl N-terminal fused to a portion of Bcr including its dimerization domain [1]. The constitutive dimerization of Bcr-Abl results in the deregulated activation of the tyrosine-kinase driving uncontrolled proliferation and suppression of apoptosis in the affected hematopoietic cells. This pathophysiology explains the remarkable efficacy of Abl tyrosine-kinase inhibitors (TKI) in controlling CML. Indeed, when exposed to TKI, Bcr-Abl expressing cells undergo apoptosis [4]. Although TKI have represented a tremendous progress in the management of CML patients, resistances to TKI treatment have emerged. About a third of these resistances can be explained by the acquisition of additional mutations in the kinase domain of Abl. These mutations typically impede the inhibitor binding to its target and second generation inhibitors have been designed to overcome these resistances whenever possible. In the remaining resistant patients, the mechanisms are certainly more varied and often remain elusive. In an attempt, to characterize and so to overcome resistance to TKI, we have generated K562-derived cell lines resistant to imatinib or nilotinib [5, 6]. We and other have shown that amplification of Bcr-Abl, overexpression of stress proteins or deregulation of Src kinases are among the mechanisms explaining resistance to imatinib and nilotinib [6-9].

We previously reported that treatment with mycophenolic acid (MPA) could induce CML cell death independently of the sensitivity to TKI [10]. MPA, an active metabolite of Mycophenolate mofetil, is a non competitive reversible inhibitor of IMPDH (Inosine monophosphate dehydrogenase; EC1.1.1.205) widely used as an immunosuppressive drug. MPA reduces the GTP pool resulting in a cycle arrest mainly in G₀/G₁ phase although some blockage in S phase is also reported [11, 12]. It has been reported to act in synergy with imatinib or methotrexate in Bcr-Abl positive K562 cells [13, 14]. MPA is described as a potent necrosis inducer on activated lymphocytes [15]. Because the level of expression of

IMPDH is increased in leukemic cells in comparison to normal cells and MPA is able to induce the death of both TKI sensitive and resistant CML cells, it could be interesting to identify how CML cells died in response to the agent [16, 17]. The interplay between these mechanisms of cell death in killing Bcr-Abl expressing cells has not been thoroughly characterized, especially in the context of resistance to TKI. In this study, we investigated cell death triggered by MPA in Bcr-Abl expressing cells. Using K562 and CML primary cells, we explored how MPA induced cell death and over rided resistance. In our models, MPA induced cell deaths mainly relied on senescence and apoptosis. In addition, TKI-induced autophagy acts to rescue the cells from apoptosis, but fail to impair senescence-induced cell death.

Materials and Methods

Reagents

RPMI 1640 medium, fetal calf serum (FCS), phosphate buffered saline (PBS), trypan blue, mycophenolic acid, chloroquine, propidium iodide and the antibody against LC3 were from Sigma (St Quentin Fallavier, France). Tyrosine kinase inhibitors Imatinib and Nilotinib were kindly provided by Novartis Pharma (Basle, Switzerland). The broad caspase inhibitors Z-VAD-fmk were purchased from Peptanova (Sandhausen, Germany). The following antibodies caspase 3 was from Cell Signalling (Danvers, USA) and Hsp60 were from Santa Cruz (Bergheimer, Germany). Annexin-V-FITC or APC conjugated were from Beckman coulter (Villepinte, France).

Cell lines

The human erythroleukemia Bcr-Abl positive human cell lines used in this study : K562 was from ATCC (CCL-243). TKI-resistant cell lines were derived as previously described for imatinib or nilotinib and designated K562-R or K562-RN [5, 6]. Cells were maintained in RPMI 1640 medium (Sigma, R0883) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; GIBCO, 10270), 2 mM L-glutamine (Invitrogen, 25030), 100 U/mL penicillin /0.1 mg/mL streptomycin (Invitrogen, 15140) at 37°C in a humidified atmosphere containing 5 % CO₂. Aliquots were taken at 24h intervals for assessment of cell viability by Trypan blue exclusion.

Western Blot

Protein lysates were prepared according to Mahon et al.[6]. Protein concentration was measured by the BCATM Protein Assay (Pierce, Rockford IL, USA) and the lysates were stored at -80°C. Equal amounts of protein were separated by electrophoresis on an SDS-PAGE 12.5 or 15% and transferred to a pvdf membrane as described [17]. After blocking, the membrane was incubated with primary antibodies and secondary antibodies. Protein-antibody complexes were detected by an enhanced chemiluminescence immunoblotting ECL (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France).

Flow cytometry

Cells (10^5 cells) were incubated for 15 min in 500µl of PBS with 2 mM Ca^{2+} , 2µl of Annexin V-FITC and 0.25 µg of propidium iodide before flow cytometry analysis on FacsCalibur. At least ten thousand events are acquired for statistical analysis.

Cell cycle

Cells (10^6 cells) were harvested and washed once with PBS-SVF 5% then permeabilized with PBS 1% PFA 0,1% saponin for 30 min. Cell incubated with PBS- propidium iodide (PI, 0,5 µg/ml containing RNase) for 15 min before analysis by flow cytometry. Each cell cycle step was quantified by counting cellular events in SubG₁, G₀/G₁, S and G₂.

Autophagy inhibition by RNA silencing.

To stably inhibit autophagy, HIV-1 lentivirus-based vectors were used to introduce shRNAs against ATG7 into cells as previously described [18]. Briefly, shRNAs were cloned in FG12 lentivector, HEK293FT cells were used as packaging cells, and virus production was performed as previously described.[19] The human ATG7 siRNA sequence was 5'- AGG ATA CAG CTG GAG TCA G -3'. Negative control shRNA was used as already described [20]. To confirm autophagy inhibition by silencing of ATG7, transduced cells were grown in nutrient deprived medium (HBSS) in the absence or in the presence of Bafilomycin A and both LC3B I and II form were detected by western-blot.

SA-β-Galactosidase labeling

Cells (10^6 cells) were washed with PBS once, before being fixed 4 min with 3% PFA (paraformaldehyde) then washed once with PBS. Cells were then incubated in a 96 wells plate with a mix (1vol/20vol) of solution I containing X-Gal (20mg/ml X-Gal in dimethylformaldehyde, Promega, V3941) and solution II (5 mM ferricyanure, 5 mM ferrocyanure, 2 mM MgCl_2 150 mM NaCl, 30 mM Citric acid/phosphate pH=6) for 24 hours at 37°C [21]. Cells were then washed with PBS and SA-β-gal activity was observed by detection of a bleu staining with an inverted Nikon Microscope (Eclipse Ti) and analyzed

with the Nikon software NIS. For SA- β -gal positive staining cell quantification, 100 cells were counted on three separate fields and the mean of blue stained cells were calculated as followed (number of blue cells / (number of total cells)). Results are expressed as the percent of SA- β -gal positive cells.

CD34 cells isolation and culture

Mononuclear cells were isolated from blood by Ficoll gradient. CD34 positive cells were purified according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotech, Germany) and purity was analyzed by flow cytometry using phycoerythrin-conjugated anti-CD34 antibody (Becton Dickinson, France). CD34 cells (10^5 /ml) were grown in X-vivo 10 medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; GIBCO, 10270), 2 mM L-glutamine (Invitrogen, 25030), 100 U/mL penicillin /0.1 mg/mL streptomycin (Invitrogen, 15140) at 37°C in a humidified atmosphere containing 5 % CO₂. Cells were incubated with vehicle only, imatinib 1 μ M or MPA 3 μ g/ml for 3 days.

Statistical analysis

Wilcoxon or Friedman tests were used to calculate differences between means; differences were considered significant only when $p \leq 0.05$.

Results

MPA inhibits proliferation of TKI sensitive or resistant K562 cells by blocking the cell cycle.

K562 cells sensitive to imatinib (K562), resistant to imatinib (K562-R) or resistant to nilotinib (K562-RN) were treated with various doses of MPA (1 to 10 µg/mL). All showed similar sensitivity to the drug as assessed by trypan blue exclusion assay. The dose of 3 µg/mL (9µM) was chosen for further studies as equally potent in inducing cell death after three days in all three lines and in the range of the plasmatic concentration of MPA-treated patients. MPA inhibited cell proliferation of all three cell lines (Figure 1A). Since MPA inhibits IMPDH thus impairing GTP synthesis, addition of exogenous guanosine is expected to rescue the effects of MPA. Addition of guanosine indeed rescued K562 cells from mortality (supplementary Figure 1), but had a modest effect on global proliferation even at longer time. Cell cycle analyses showed that MPA-induced cell death was correlated to a blockage in the S phase with a weak sub-G1 population in all three lines (Figure 1B). Consistently, phosphorylation of histone γ H2AX, a marker of DNA damage, was induced in all three cell lines, an effect that was prevented by addition of guanosine (Figure 1C).

MPA induces apoptosis in K562 cells

In an attempt to determine how MPA-treated cells died, we first look at apoptosis. Annexin V/Propidium Iodide (PI) labelling revealed a weak induction of apoptosis in response to MPA (Figure 2A). Even after 3 days of exposure, the number of annexin V positive cells remained very low compared to the apoptosis induced by imatinib in the TKI-sensitive K562 cell line (Figure 2A last lane). Indeed, the weak apoptosis of these cells was further confirmed by the measurement of mitochondrial membrane depolarization using DiOC6 and of PARP cleavage (data not shown). In addition, inhibition of caspase by incubation with 50 µM Z-vad-fmk resulted in a decrease of MPA-induced cleavage of caspase 3 (Figure 2B) and in the weak proportion of annexin V-positive cells, except for the K562-RN cell line (figure 2A). These results indicate that MPA induce weak apoptosis in the three K562 cell lines. No significant necrosis (isolated PI stained cell population) was detected.

MPA induces a senescent phenotype in treated K562 cells

To explain the mortality of our cells in the absence of necrosis and with only limited apoptosis, we studied alternative cell death. Because MPA-treated K562 cells showed an arrest of cell cycle and an increase of cell granularity by flow cytometry, we explored markers of senescence such as an increase of senescence-associated β -Galactosidase activity (SA- β -gal). The upregulation of p16 and p53, as markers of senescence, cannot be detected in our cells as these genes are deleted in K562 cells. A significant increase of SA- β -Gal activity was detected in 70-80% of MPA-treated K562 cells (Figure 3A and 3B). In addition, MPA induced also foci formation in the nuclei as revealed by DAPI staining (supplementary Figure 2). As was observed with global cell mortality, addition of exogenous guanosine partially abolished the effects of MPA (Figure 3B).

Autophagy limits apoptosis but not senescence in MPA-treated K562 cells

Because K562 cells sensitive or resistant to imatinib or nilotinib respond to MPA by a senescent-like cell cycle arrest and a weak apoptosis, we next wondered whether autophagy, a mechanism known to modulate various cell death mechanisms, could intervene with MPA-induced K562 cell death. The conversion of the microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) from its cytosolic form (LC3BI) to the membrane-bound form (LC3BII) was detected as a bona fide marker of autophagy. Because autophagy is a flux process, MPA increased LC3BII is visualized by the addition of Bafilomycine A1 (20 nM) 6 hours before the end of MPA incubation. Both forms of LC3 (Figure 4A) are upregulated in K562 cells following MPA treatment, indicating that autophagy is actually stimulated in this condition.

In order to understand whether autophagy modulates MPA-induced cell death, we incubated the cells with 3-methyl adenine (3-MA) or chloroquine (CQ), two drugs known to inhibit autophagy. MPA-induced apoptosis of K562 cells was significantly increased (2 to 3 fold) when cells were co-incubated with 3-MA and MPA or to even higher levels after CQ treatment (supplementary Figure 3A), indicating that autophagy physiologically limits MPA-induced cell apoptosis.

We next asked whether autophagy could also alter the MPA-induced senescent-like cell cycle arrest. After treatment of the cells with 3-MA, MPA-induced SA- β -gal activity was not

significantly modified (supplementary Figure 3B), suggesting that inhibition of autophagy had no effect in modulating the senescent response. Chloroquine inhibits the revelation of SA- β -gal activity by modifying the pH of lysosomes and we could not use it to emphasize a potential role of autophagy in senescence. As an alternative, we inhibited autophagy by RNA silencing (shRNAs) to shut down the expression of ATG7, a major player of autophagy whose down regulation has been shown to be inhibitory. Inhibition of ATG7 expression was confirmed by western-blotting (Figure 4B) and strongly decreased MPA induced autophagy as reported the decrease of LC3BII level (Figure 4A). Even though the expression of ATG7 was completely abolished, no significant difference in MPA-induced SA- β -gal activity was observed suggesting that autophagy does not alter MPA induced senescent-like cell cycle arrest (Figure 4B).

MPA overcomes resistance in primary CD34 CML cells

The efficacy of MPA was investigated on CD34 primary cells isolated from blood samples of CML patients responding to imatinib (patient 1) or resistant to imatinib and nilotinib (patient 2 to 4). Patient 2 and 3 overexpressed several tyrosine kinase such as Src-kinase whereas patient 4 was mutated on Abl kinase domain carrying the mutation T315I. All primary cells were grown in the presence of vehicle only, imatinib 1 μ M or MPA 3 μ g/ml for 3 days. Annexin-V binding and SA- β -Gal was detected at days 0 and upon treatment at day 3. Apoptosis was significantly detected for patient 1 in response to imatinib or MPA. For imatinib or nilotinib resistant CML patients only MPA induced apoptosis (Figure 5). When SA- β -Gal was revealed no significant labeling was detected despite an increase in cell size and morphology observed in flow cytometry suggesting that primary cells respond mainly by apoptosis (supplementary figure 4).

Discussion

Despite the major improvement of CML patients' management due to anti-Abl TKIs, one issue remain to be resolved : the emergence of resistances to TKI and relapse [22, 23]. Whatever the mechanisms implicated, they are linked to an impaired TKI-induced apoptosis [24, 25]. This explains that drugs triggering alternative cell death mechanisms are very interesting potential therapeutic tools. MPA is efficiently killing K562 cells, including those resistant to imatinib and nilotinib harbouring different mechanism of resistance. MPA increase mortality of our cells, a specific response since the addition of guanosine prevents it. However, the lack of a total restoration of cell proliferation by guanosine indicates that MPA may also act by other ways although guanosine used at 200 μ M may be not enough to refill the GTP pool. In CML cells, a synergy between MPA and imatinib has been reported which partially overcome resistance to TKI [13]. In our hands, MPA alone blocks the cell cycle and induces the death of K562 cells, either sensitive or rendered resistant to TKI. Inhibition of cell cycle by MPA is associated to a blockade to proceed in the S phase. This is similar to the arrest reported by Moosavi et colleagues using GTP depletion [26]. Apoptosis accounts for only a limited part of MPA-induced K562 death and can be inhibited by preincubation with Z-vad-fmk, a broad inhibitor of caspase. Caspase3 cleavage occurred in all three lines, including K562-RN although the effect of Z-vad-fmk was extremely weak in this particular cell line. This would suggest that the modifications of tyrosine kinome generated when rendering these cells resistant to TKI may be involved for a switch towards a caspase-independent apoptosis. This hypothesis is in line with the fact that tyrosine-kinase activity (several are overexpressed in K562-RN) influence DNA damage and caspase-independent apoptosis as shown in breast cancer cells [6, 27]. This could also explain that H2AX phosphorylation in response to MPA is lower in K562-RN cells compared to the other two lines which do not overexpress tyrosine-kinases. A caspase-independent cell death has been reported in Bcr-Abl positive cells treated by a combination of TKI and Z-Vad-fmk which harbour a necrosis-like phenotype [28]. In their model, Okada *et al* show the role of the serine protease Omi/HtrA2 in a necrosis-like death. This death could be involved in the response of K562 cells to MPA. However, incubation with the serine protease inhibitor ucf-101, which

inhibits Omi/HtrA2, did not modified MPA-induced cell death suggesting again a different death than necrosis (data not shown).

In addition to the weak apoptotic response, we have observed a large and significant senescent-like cell cycle arrest in MPA-treated K562 cells associated to a large increase in SA- β -galactosidase positive cells. This would suggest that MPA induced senescence in K562 cells. Indeed, stress induced senescence can be triggered by p53 dependent pathways and p16/INK4 upregulation. However, these pathways cannot be activated in our cells in which these genes are deleted. Senescence has been shown to be triggered by p53 and p16 independent pathway that could be indirectly through cell cycle arrest and ATM activation [29-32].

MPA is able to block proliferation and to induce death of primary CD34 CML cells either sensitive or resistant to imatinib or nilotinib. Although CD34 CML cells respond to MPA mainly by apoptosis, it may be a powerful tool in the evolved CML disease or TKI resistant like those harbouring the T315I mutation or overexpressing tyrosine kinases. This also suggests that K562 cells possess additional molecular anomalies that rely on the blast phase. Despite an arrest of proliferation, we were not able to detect SA- β -Gal in MPA-treated CD34 CML cells. Interestingly, RNA silencing of p53 in other CML cell line did not switch MPA induced apoptosis to a senescent response confirming that other candidates play roles (Drullion, unpublished results).

Since autophagy has been shown to induce cell surviving, by the rescue the cells from apoptosis or by cell death depending on the cellular context, we thought of interest to study this response in MPA-treated K562 cells. The increased expression of LC3B indicates that MPA induced autophagy certainly through the inhibition of the mTor pathway as suggest the study of Gu et al [13]. To the best of our knowledge, this is the first report showing that MPA is able to induce autophagy in CML cells. Autophagy has been shown to rescue CML cells from TKI-induced apoptosis [33-35]. Here, we see that the similar thing happens in MPA-treated cells and that inhibition of autophagy increases apoptosis in the K562 treated cells. This emphasizes that MPA induced apoptosis is weak partially because the cells are rescued by autophagy. Regarding senescence however, we failed to observe any effect of autophagy inhibition. The inhibition of autophagy by anti-ATG7 shRNA did not abolish or modify

MPA-induced senescent-like cell cycle arrest. In light of what was described about the positive role of autophagy on stress-induced senescence, different mechanisms may explain the absence of regulation of MPA-induced senescence by autophagy in our model [36]. Even no significant inhibitory role of autophagy has been point out, the senescent response did not required an upstream autophagic response to occur as the inhibition of the later did not abolished senescence. It will be interesting to check in our model if the lack of a positive regulation of senescence by autophagy is correlated to the absence of expression of the different autophagic-related genes discovered to be up-regulated during senescence [36]. Another explanation may be that MPA induced autophagy by non canonical pathway like it was described for resveratrol [37, 38]. This peculiar pathway triggering a non canocical autophagy is described independent of Beclin 1 and of inhibition of Vps34, a PI3 kinase, by 3-MA. In our hands, 3-MA was inhibiting MPA-induced autophagy leading to an increase of cell mortality mainly by apoptosis but not by senescence. The inhibition of the expression of ATG7 in K562 cells decreases autophagy although it failed to fully block the transformation of LC3BI in LC3BII suggesting that residual autophagy can occur. This could explain why we were unable to demonstrate a link between autophagy and senescence in response to MPA. Moreover, the inhibition of autophagy by 3-MA or siRNA against LC3 did not change the senescence response to MPA arguing for an absence of role. These results also highlight that the relations between the different deaths observed in a specific model are not a constant rule. We were not able to demonstrate an inhibition or conversely potentiating of MPA-induced senescent-like cell cycle arrest whatever the way used to block autophagy. Indeed, this suggests that in contrast to apoptosis, autophagy is not able to rescue MPA-treated cells from senescence.

One interesting point to induce a senescent-like cell cycle arrest or apoptosis in CML disease is that resistance to TKI-treatment and persistence of leukemic cells are associated to relapse and the evolution of the disease. MPA is able to target both, CML cells of the chronic phase, like we did with CML primary cells, or blastic cells, like we did with CML cell lines. Such molecule is actively looked for. In conclusion, molecules triggering cell death independently of tyrosine-kinase inhibition are interesting tools to get rid of resistant CML

cells. MPA which triggers apoptosis and senescent-like cell cycle arrest is one of these interesting drugs.

Acknowledgements

We thank Dr. Elisabeth Buchdunger and Paul Manley (Novartis Pharma, Basel, Switzerland) for providing us imatinib and nilotinib. This work was supported by la Ligue Nationale Contre le Cancer Comité de la Dordogne, l'Université Victor Ségalen Bordeaux 2, la région Aquitaine and l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.

CD is a fellowship from la “Ligue Nationale Contre le Cancer” and FH is a postdoctoral fellow from “region Aquitaine”.

References

1. Rowley JD, Testa JR. Chromosome abnormalities in malignant hematologic diseases. *Adv Cancer Res.* 1982;36:103-148.
2. Groffen J, Heisterkamp N, Stam K. Oncogene activation by chromosomal translocation in chronic myelocytic leukemia. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51 Pt 2:911-921.
3. Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukaemia. *Leukemia.* 1996 May;10(5):751-756.
4. Druker BJ. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nature Medicine.* 1996;2:561-566.
5. Mahon FX, Deininger MW, Schultheis B, Chabrol J, Reiffers J, Goldman JM, et al. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood.* 2000 Aug 1;96(3):1070-1079.
6. Mahon FX, Hayette S, Lagarde V, Belloc F, Turcq B, Nicolini F, et al. Evidence that resistance to nilotinib may be due to BCR-ABL, Pgp, or Src kinase overexpression. *Cancer Res.* 2008 Dec 1;68(23):9809-9816.
7. Donato NJ, Wu JY, Stapley J, Gallick G, Lin H, Arlinghaus R, et al. BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571. *Blood.* 2003 Jan 15;101(2):690-698.
8. Ray S, Lu Y, Kaufmann SH, Gustafson WC, Karp JE, Boldogh I, et al. Genomic mechanisms of p210BCR-ABL signaling: induction of heat shock protein 70 through the GATA response element confers resistance to paclitaxel-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2004 Aug 20;279(34):35604-35615.
9. Pocaly M, Lagarde V, Etienne G, Ribeil JA, Claverol S, Bonneau M, et al. Overexpression of the heat-shock protein 70 is associated to imatinib resistance in chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 2007 Jan;21(1):93-101.
10. Guidicelli G, Chaigne-Delalande B, Dilhuydy MS, Pinson B, Mahfouf W, Pasquet JM, et al. The necrotic signal induced by mycophenolic acid overcomes apoptosis-resistance in tumor cells. *PLoS One.* 2009;4(5):e5493.
11. Huo J, Luo RH, Metz SA, Li G. Activation of caspase-2 mediates the apoptosis induced by GTP-depletion in insulin-secreting (HIT-T15) cells. *Endocrinology.* 2002 May;143(5):1695-1704.
12. Floryk D, Huberman E. Mycophenolic acid-induced replication arrest, differentiation markers and cell death of androgen-independent prostate cancer cells DU145. *Cancer Lett.* 2006 Jan 8;231(1):20-29.
13. Gu JJ, Santiago L, Mitchell BS. Synergy between imatinib and mycophenolic acid in inducing apoptosis in cell lines expressing Bcr-Abl. *Blood.* 2005 Apr 15;105(8):3270-3277.
14. Penuelas S, Noe V, Morales R, Ciudad CJ. Sensitization of human erythroleukemia K562 cells resistant to methotrexate by inhibiting IMPDH. *Med Sci Monit.* 2005 Jan;11(1):BR6-12.
15. Chaigne-Delalande B, Guidicelli G, Couzi L, Legembre P. An atypical necrotic signal induced by immunosuppressive and anti-viral agents. *Autophagy.* 2009 Apr;5(3):425-427.
16. Nagai M, Natsumeda Y, Konno Y, Hoffman R, Irino S, Weber G. Selective up-regulation of type II inosine 5'-monophosphate dehydrogenase messenger RNA expression in human leukemias. *Cancer Res.* 1991 Aug 1;51(15):3886-3890.
17. Pocaly M, Lagarde V, Etienne G, Dupouy M, Lapailleurie D, Claverol S, et al. Proteomic analysis of an imatinib-resistant K562 cell line highlights opposing roles of heat shock cognate 70 and heat shock 70 proteins in resistance. *Proteomics.* 2008 Jun;8(12):2394-2406.

18. Priault M, Hue E, Marhuenda F, Pilet P, Oliver L, Vallette FM. Differential dependence on Beclin 1 for the regulation of pro-survival autophagy by Bcl-2 and Bcl-xL in HCT116 colorectal cancer cells. *PLoS One*. 2010;5(1):e8755.
19. Qin XF, An DS, Chen IS, Baltimore D. Inhibiting hiv-1 infection in human t cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering rna against ccr5. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:183-188.
20. Gioia R, Leroy C, Drullion C, Lagarde V, Etienne G, Dulucq S, et al. Quantitative phosphoproteomics revealed interplay between Syk and Lyn in the resistance to nilotinib in chronic myeloid leukemia cells. *Blood*. 2011 Aug 25;118(8):2211-2221.
21. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Sep 26;92(20):9363-9367.
22. Hochhaus A, Kreil S, Corbin A, La Rosee P, Lahaye T, Berger U, et al. Roots of clinical resistance to STI-571 cancer therapy. *Science*. 2001 Sep 21;293(5538):2163.
23. Graham SM, Jorgensen HG, Allan E, Pearson C, Alcorn MJ, Richmond L, et al. Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood*. 2002;99(1):319-325.
24. Hochhaus A, La Rosee P. Imatinib therapy in chronic myelogenous leukemia: strategies to avoid and overcome resistance. *Leukemia*. 2004 Aug;18(8):1321-1331.
25. Deininger MW, Druker BJ. SRCircumventing imatinib resistance. *Cancer Cell*. 2004 Aug;6(2):108-110.
26. Moosavi MA, Yazdanparast R, Lotfi A. GTP induces S-phase cell-cycle arrest and inhibits DNA synthesis in K562 cells but not in normal human peripheral lymphocytes. *Journal of biochemistry and molecular biology*. 2006 Sep 30;39(5):492-501.
27. Seoane S, Montero JC, Ocana A, Pandiella A. Effect of multikinase inhibitors on caspase-independent cell death and DNA damage in HER2-overexpressing breast cancer cells. *J Natl Cancer Inst*. 2010;102(18):1432-1446.
28. Okada M, Adachi S, Imai T, Watanabe K, Toyokuni SY, Ueno M, et al. A novel mechanism for imatinib mesylate-induced cell death of BCR-ABL-positive human leukemic cells: caspase-independent, necrosis-like programmed cell death mediated by serine protease activity. *Blood*. 2004 Mar 15;103(6):2299-2307.
29. Michaloglou C, Vredeveld LCW, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CMAM, et al. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature*. 2005;436(7051):720-724.
30. Reinhardt HC, Aslanian AS, Lees JA, Yaffe MB. p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage. *Cancer Cell*. 2007 Feb;11(2):175-189.
31. Oliva JL, Caino MC, Senderowicz AM, Kazanietz MG. S-Phase-specific activation of PKC alpha induces senescence in non-small cell lung cancer cells. *J Biol Chem*. 2008 Feb 29;283(9):5466-5476.
32. Cipriano R, Kan CE, Graham J, Danielpour D, Stampfer M, Jackson MW. TGF-beta signaling engages an ATM-CHK2-p53-independent RAS-induced senescence and prevents malignant transformation in human mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 May 24;108(21):8668-8673.
33. Boya P, Gonzalez-Polo RA, Casares N, Perfettini JL, Dessen P, Larochette N, et al. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol*. 2005 Feb;25(3):1025-1040.
34. Yuko Mishima YT, Yuji Mishima, Akiko Taniyama, Ryoko Kuniyoshi, Toshihiro Takizawa, Shinya Kimura, Keiya Ozawa, Kiyohiko Hatake,. Autophagy and autophagic cell death are

- next targets for elimination of the resistance to tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Science*. 2008;99(11):2200-2208.
35. Bellodi C, Lidonnici MR, Hamilton A, Helgason GV, Soliera AR, Ronchetti M, et al. Targeting autophagy potentiates tyrosine kinase inhibitor-induced cell death in Philadelphia chromosome-positive cells, including primary CML stem cells. *J Clin Invest*. 2009;119(5):1109-1123.
 36. Young AR, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JF, et al. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev*. 2009 Apr 1;23(7):798-803.
 37. Scarlatti F, Maffei R, Beau I, Ghidoni R, Codogno P. Non-canonical autophagy: an exception or an underestimated form of autophagy? *Autophagy*. 2008 Nov 16;4(8):1083-1085.
 38. Puissant A, Robert G, Fenouille N, Luciano F, Cassuto J-P, Raynaud S, et al. Resveratrol Promotes Autophagic Cell Death in Chronic Myelogenous Leukemia Cells via JNK-Mediated p62/SQSTM1 Expression and AMPK Activation. *Cancer Res*. 2010;70(3):1042-1052.

Figures Legends

Figure 1 : Inhibition of K562 cell proliferation by MPA

K562-S, K562-R and K562-RN cells (2.10^5 /ml) were grown in the presence of vehicle only, MPA (3 μ g/ml) or incubated with guanosine (200 μ M) and MPA (3 μ g/ml) for 3 days. At day 3, cell proliferation was measured by counting cells using trypan blue exclusion assay. Cell counts from triplicate counting are expressed as the mean of 7 independent experiments (A). Cells treated as described above were fixed, permeabilized then incubated with propidium iodide (PI 2 μ g/ml) and analyzed by flow cytometry for cell cycle measurement. Results are from one experiment representative of five and are expressed as the percent of cells in each phase of cell cycle as described in methods (B). MPA-induced phosphorylation of γ H2AX was detected by western-blot on samples as described in A (C). Hsp60 was used as loading control.

Figure 2 : MPA induced a moderated apoptosis

K562-S, K562-R and K562-RN cells (2.10^5 /ml) were grown in the presence of vehicle only, MPA (3 μ g/ml) or incubated with Z-vad-fmk (50 μ M) and MPA (3 μ g/ml) for 3 days. An aliquot was incubated for 15 min in the presence of annexin-V and propidium iodide. Samples were analyzed by flow cytometry and labelled cells were analyzed as described in methods. Results from 6 experiments are expressed as the % of annexin V-labelled cells in comparison to a positive control corresponding to imatinib-treated K562 cells (A, n = 6). Samples treated as above were used for detection of the cleaved form of caspase 3 by western-blot and Hsp60 (as loading control) (B).

Figure 3 : MPA induced SA- β -Galactosidase activity

K562-S, K562-R and K562-RN cells (2.10^5 /ml) were grown in the presence of vehicle only or MPA (3 μ g/ml) for 3 days. An aliquot was washed in PBS and 10^5 cells/well were fixed in PFA and then incubated overnight in a 96 wells plate in the presence of X-Gal

(1mg/ml) at 37°C as described in methods. The day after, the cells were washed once in PBS and SA- β -gal activity was detected by a blue cell staining visualized under an inverted microscope. Pictures were acquired and analyzed using the NIS Nikon software **(A)**. SA- β -gal positive cells were quantified by counting 10^2 cells on three separate fields for each condition. Results show the mean of five independent experiments **(B)**.

Figure 4 : MPA induced autophagy in K562 cells

K562-S, K562-R and K562-RN cells (2.10^5 /ml) were grown in the presence of vehicle only or MPA (3 μ g/ml) for 3 days. Six hours before the end of the incubation, samples were separated in two batches and incubated in the absence or in the presence of bafilomycin A1 (20 nM) to block the autophagic flux. Then, K562 cells were washed once in PBS and lysed in a modified RIPA buffer for detection by western-blot of LC3B and Hsp60 (as a loading control) **(A)**. K562-S, K562-R and K562-RN cells (2.10^5 /ml) were infected by lentivirus coding for a shRNA anti-ATG7. Lentiviral particles were incubated for 24 h with K562 cells. Then, the cells were washed twice in PBS and grown in the presence of medium for 6 days before sorting based on GFP expression and experimental use. After 3 days, each sample was analysed for ATG7 inhibition by western-blotting **(B)**. K562-S, K562-R and K562-RN cells (2.10^5 /ml) and K562-S, K562-R and K562-RN cells (2.10^5 /ml) deficient for ATG7 were grown in the presence of vehicle only, MPA (3 μ g/ml). After 3 days, SA- β -gal positive cells were quantified by counting 10^2 cells on three separate fields for each condition **(C)**. Results show the mean of three experiments.

Figure 5 : MPA induced autophagy in K562 cells

Primary CD34 cells isolated from blood samples of CML patients responding to imatinib (patient 1) or resistant to imatinib and nilotinib (patient 2 to 4) were grown in the presence of vehicle only, imatinib 1 μ M or MPA 3 μ g/ml for 3 days. Patient 2 and 3 overexpressed several tyrosine kinase such as Src-kinase whereas patient 4 was mutated in Abl kinase domain harbouring the T315I mutation. Annexin-V binding was detected at days 0 and upon treatment at day 3.

Supplementary data

Figure 1 : Inhibition of K562 cell proliferation by MPA

K562-S, K562-R and K562-RN cells ($2.10^5/\text{ml}$) ($2.10^5/\text{ml}$) were grown in the presence of vehicle only, MPA ($3\mu\text{g}/\text{ml}$) or incubated with guanosine ($200\text{ }\mu\text{M}$) and MPA ($3\mu\text{g}/\text{ml}$) for 3 days. At day 3, cell proliferation was measured by counting cells using trypan blue exclusion assay. Cell viability from triplicate counting is expressed as the mean of 7 independent experiments (A).

Figure 2 : MPA induced nuclear foci in K562 cells

K562 cells were grown in the presence of vehicle only or MPA ($3\mu\text{g}/\text{ml}$) for 3 days. K562 cells (5.10^4) were fixed in PFA and then permeabilized with triton X-100 (0.1%) for 5 min at room temperature. After one wash in PBS, slides were incubated in the presence of Dapi ($1\mu\text{g}/\text{ml}$) for 5 min at room temperature. After washes, cells were visualized under an inverted microscope. Pictures were acquired and analyzed using the NIS Nikon software.

Figure 3 : MPA-induced autophagy is limiting death

K562-S, K562-R and K562-RN cells were grown in the presence of vehicle only, MPA ($3\mu\text{g}/\text{ml}$) or incubated with 3-methyl adenine (3-MA, 2.5 mM), chloroquine (CQ, $25\mu\text{M}$) and MPA ($3\mu\text{g}/\text{ml}$) for 3 days. K562 cells (5.10^4) were incubated for 15 min in the presence of annexin-V and propidium iodide. Samples were analyzed for annexin-V and PI positive cells by flow cytometry. Results show the % of annexin V-labelled cells (A, $n = 5$). K562 cells (10^5) were fixed in PFA and then incubated overnight in a 96 wells plate in the presence of X-Gal ($1\text{mg}/\text{ml}$) at 37°C as described in Figure 3. SA- β -gal positive cells were quantified by counting 10^2 cells on three separate fields for each condition. Results show the mean of six independent experiments. (B, $n= 6$).

Figure 4 : Inhibition of CD34 cell proliferation by MPA

Primary CD34 cells isolated from blood samples of CML patients responding to imatinib were grown in the presence of vehicle only, imatinib 1 μ M or MPA 3 μ g/ml for 3 days. Cell morphology was observed upon treatment at day 3 (A) or used for detection of SA- β -gal positive cells (B).

Figure 1

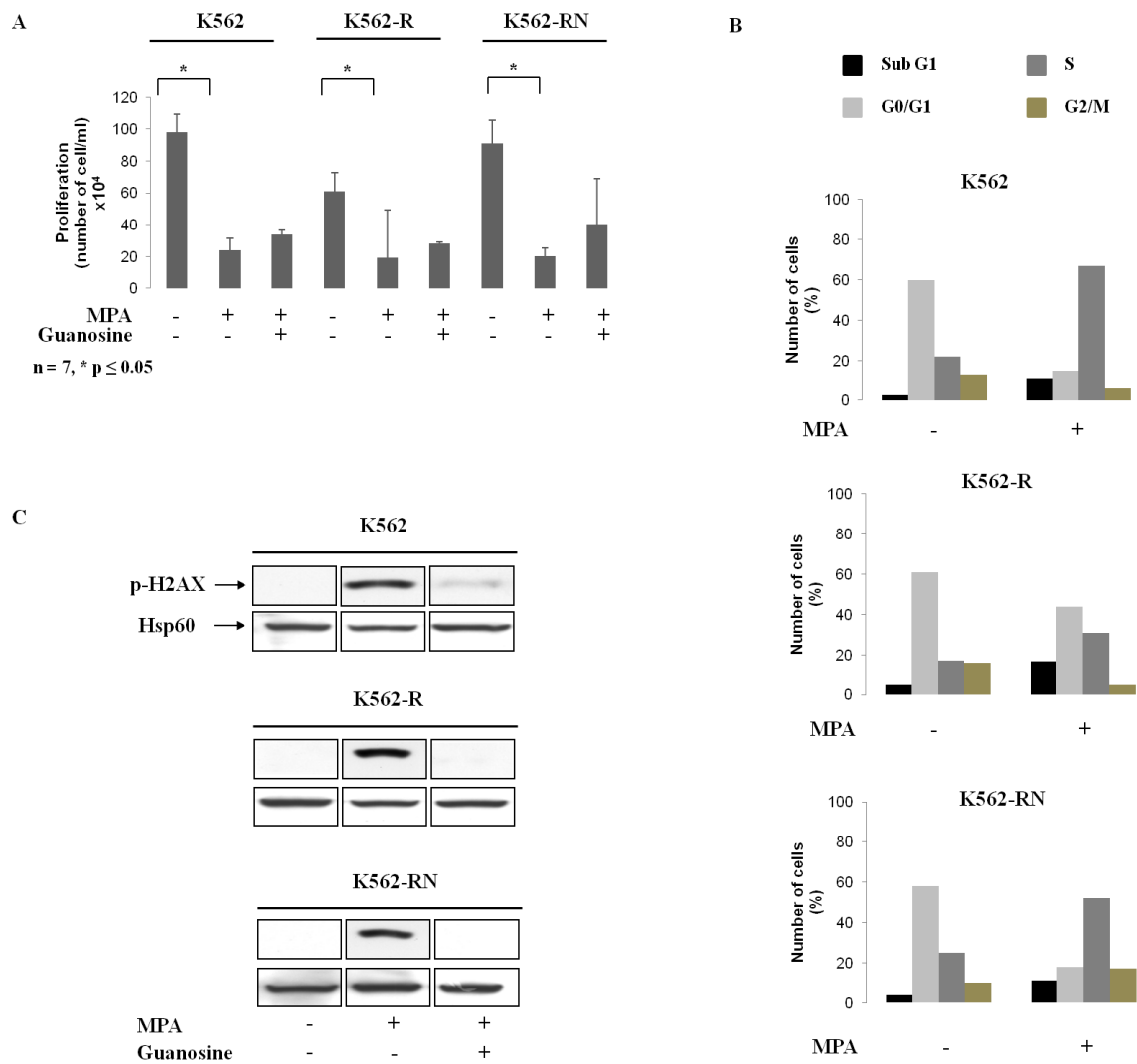


Figure 2

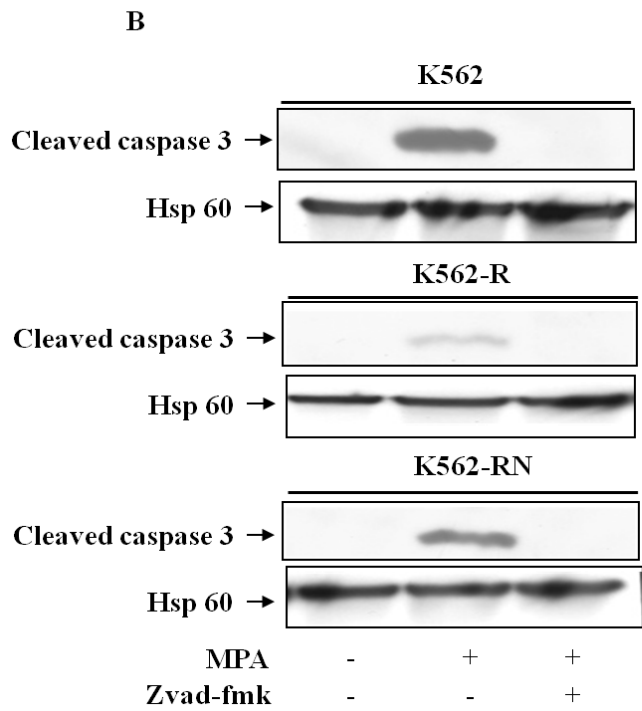
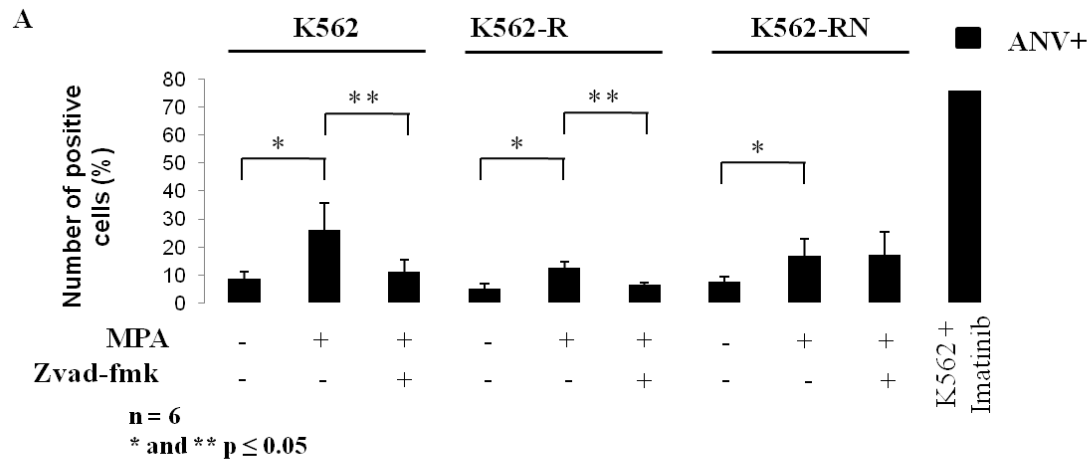


Figure 3

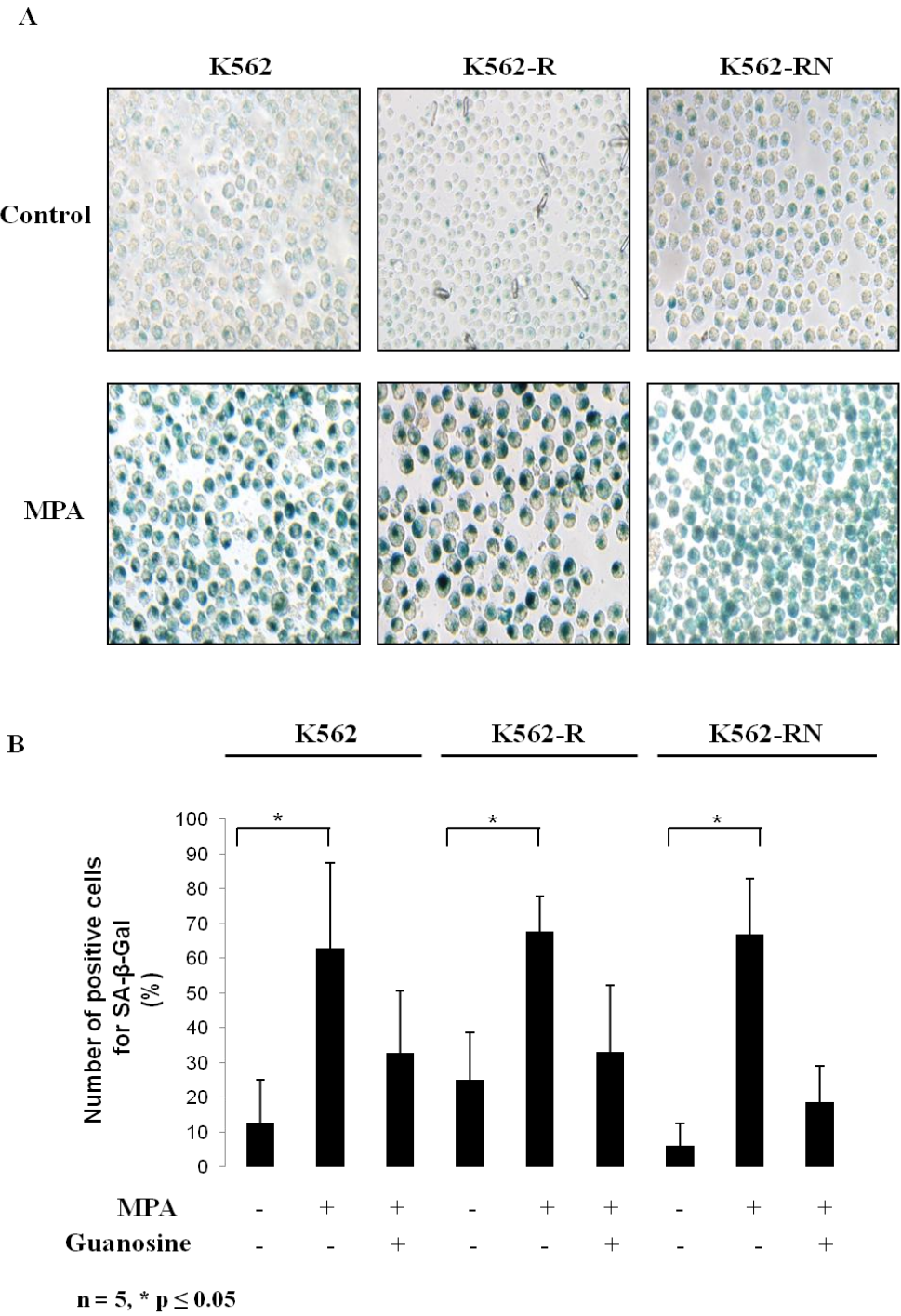


Figure 4

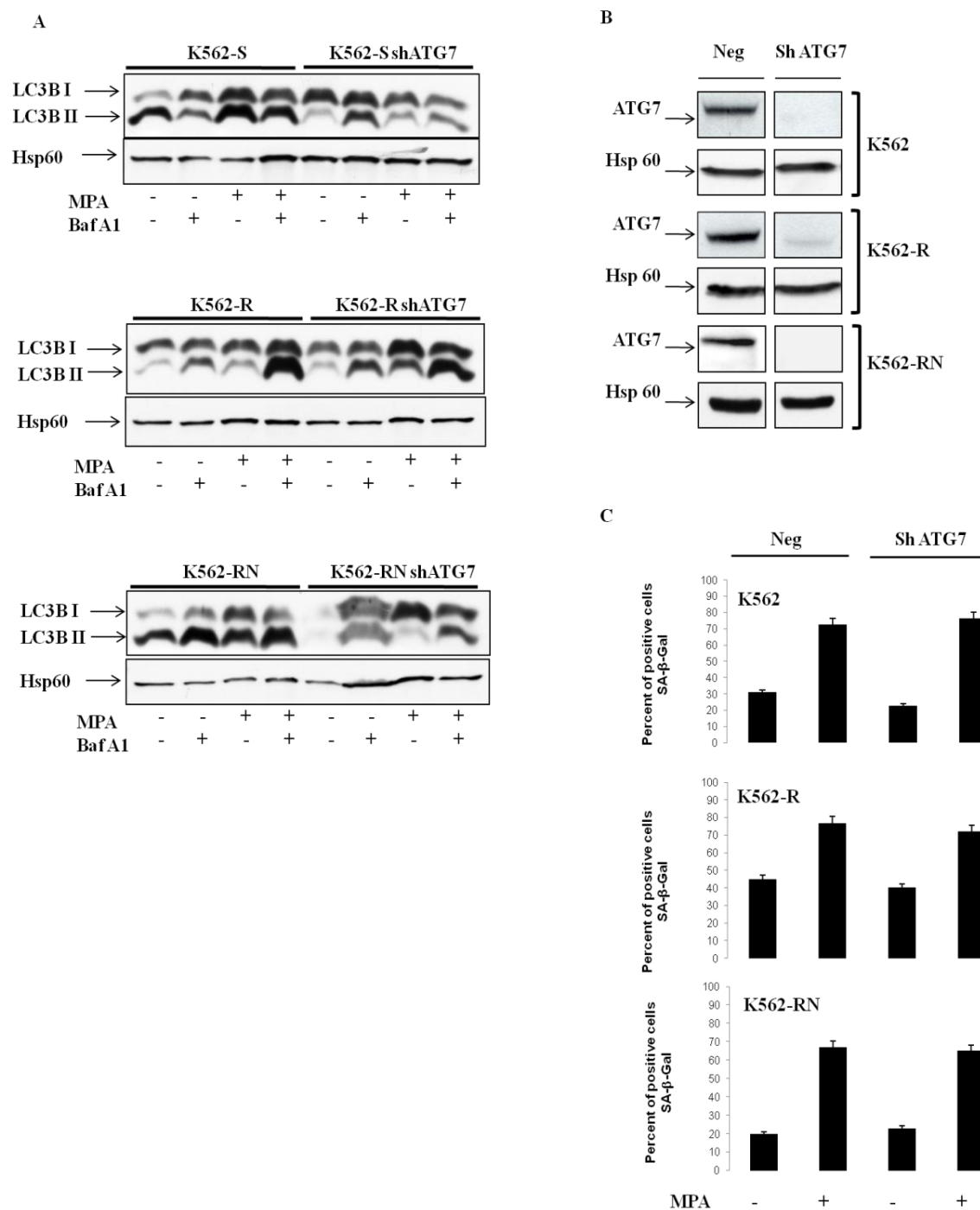
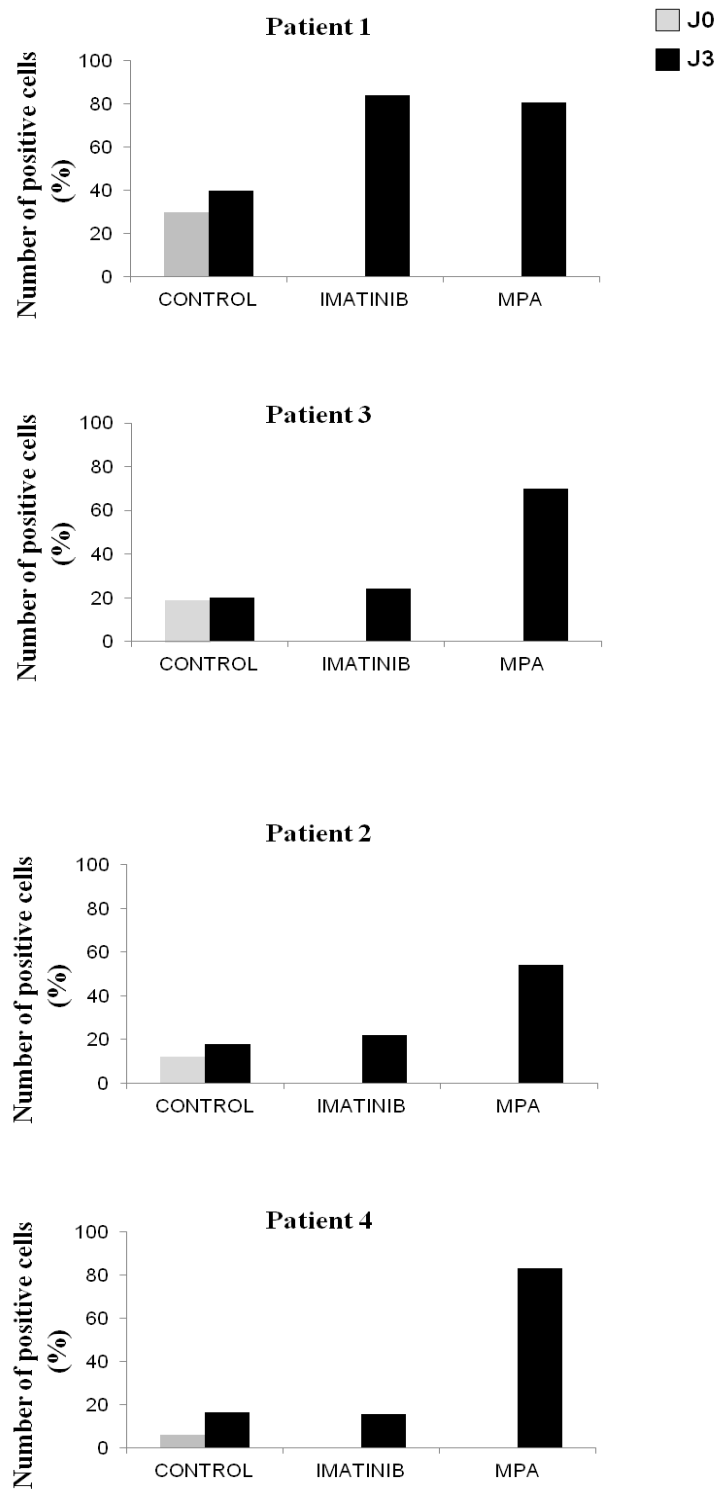
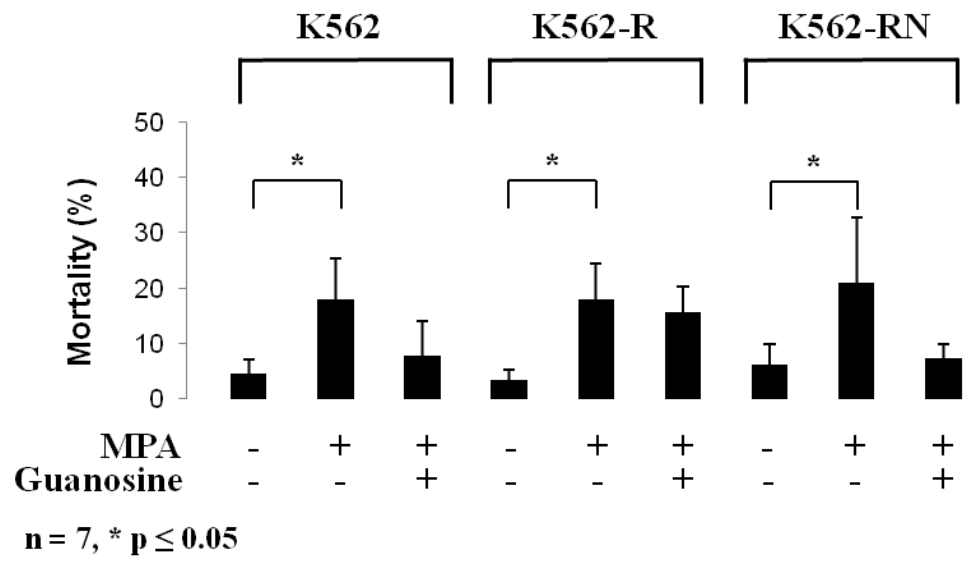


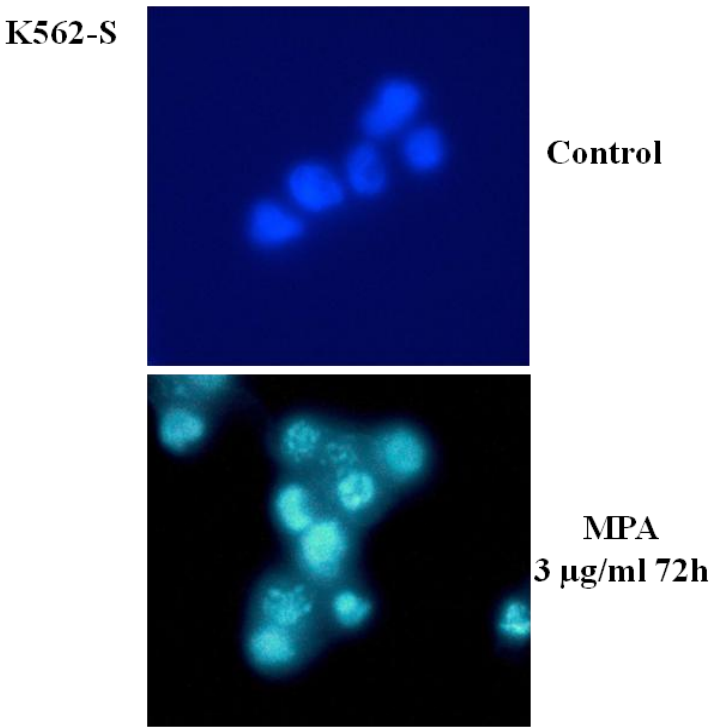
Figure 5



Supplementary Figure 1

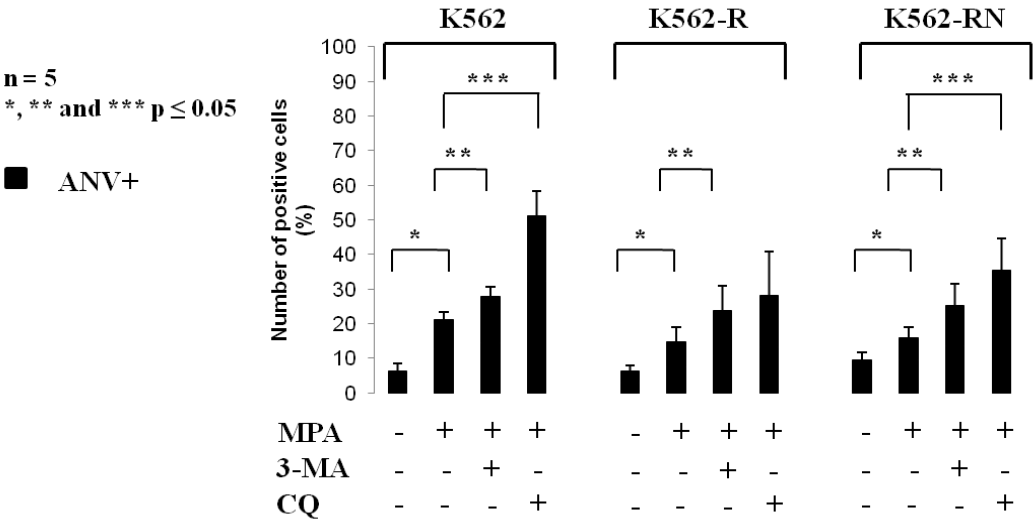


Supplementary Figure 2

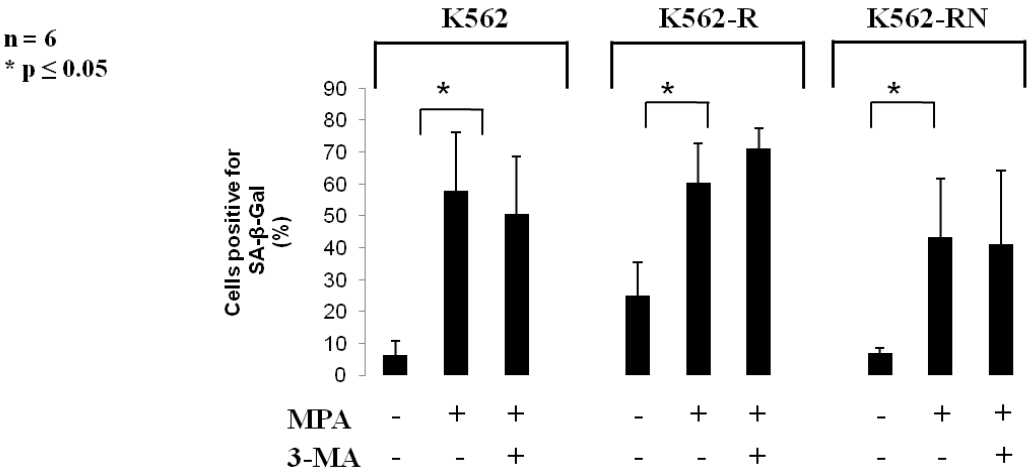


Supplementary Figure 3

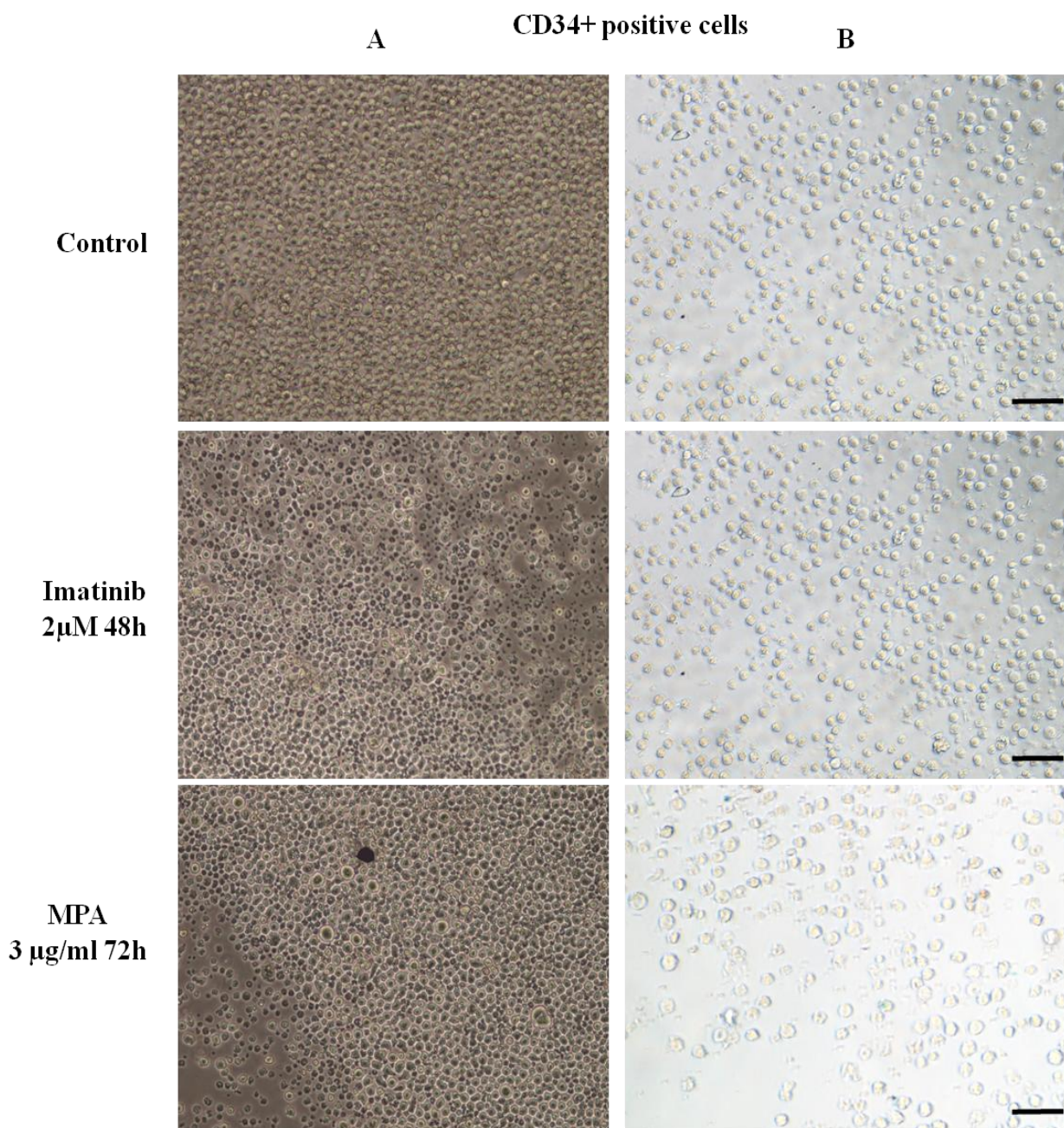
A



B



Supplementary Figure 4



III.C. Conclusion

La résistance aux ITK demeure une question essentielle dans la LMC. Cette résistance des cellules de LMC est souvent associée à un défaut d'induction de l'apoptose, c'est pourquoi il est intéressant de déterminer si une cellule résistante est capable d'être à nouveau sensibilisée à l'apoptose et/ou si elle peut être éliminée par des morts non apoptotiques.

On sait aujourd'hui que des voies de signalisations alternatives à l'apoptose caspase indépendante existent ⁴²². De nombreuses études ont montré qu'en absence d'activation des caspases d'autres mécanismes de mort cellulaire se mettent en place comme c'est le cas pour la nécroptose ³¹¹. Il semblerait même que des protéases autres que les caspases entrent alors en jeu, par exemple les cathepsines ou les calpaïnes ⁴²³. La signalisation conduisant aux différentes morts cellulaires est complexe, plusieurs voies pouvant être activées de manière concomitante par un même stimulus. C'est une des raisons pour lesquelles un type de mort n'est identifiable que si l'on peut mettre en évidence plusieurs marqueurs spécifiques. C'est aussi pourquoi certaines morts n'ont pas pu être mises en évidence à ce jour. Le problème est qu'il existe en plus d'une hiérarchie, l'apoptose occupant la première place du podium, des coopérations entre ces différentes morts cellulaires. Nous l'avons vu en observant les réponses au MPA de cellules de lignées de LMC ou de cellules primaires de patients.

Nous avons préalablement observé que le MPA induisait la mort des cellules K562 sensibles ou résistantes à l'imatinib ou au nilotinib ainsi que les cellules murines Baf3 exprimant Bcr-Abl sous forme sauvage ou mutée en T315I. L'étude que nous avons entreprise nous a permis de montrer que le MPA induit, dans les lignées K562 sensibles ou résistantes aux ITK, un blocage de la prolifération par un arrêt irréversible du cycle cellulaire en phase S par déplétion du pool de GTP. Cela se traduit par des dommages à l'ADN qui sont « reversés » par la présence de guanosine dans le milieu. Cependant, la prolifération n'étant que partiellement rétablie par la présence de guanosine exogène, cela suggère que le MPA agirait également sur des voies secondaires non connues ou que la quantité de guanosine utilisée reste toujours insuffisante pour rétablir le niveau du pool de GTP adéquat pour la prolifération de nos cellules.

A défaut d'être un agent nécrotique dans les cellules K562, le MPA induit peu d'apoptose (15%) sur les trois lignées cellulaires K562 : KS, KR et KRN. En parallèle, dans une large proportion de la population cellulaire (80%) est détectée une réponse sénescence par un arrêt irréversible du cycle, par une augmentation de la granularité cellulaire et une augmentation de l'activité SA- β -galactosidase. Cette sénescence est indépendante des voies p53 et p16 dans les cellules K562 mais il est possible qu'elle soit dépendante de l'activation de la kinase ATM 329,412,424.

De façon surprenante, MPA bloque la prolifération et induit une apoptose massive des progéniteurs CD34⁺ de patients sensibles ou résistants à l'imatinib. Le MPA peut donc dépasser les résistances aux ITK notamment celles associées aux mutations de Bcr-Abl. En effet, le MPA est capable d'induire une réponse apoptotique même dans les cellules Bcr-Abl possédant la mutation T315I (cellules Baf3 et CD34).

Nous avons pu observer que le MPA est à la fois capable de faire rentrer les cellules résistantes ou sensibles en sénescence (modèle K562 *in vitro*), en apoptose (*in vitro* sur les Lama-84, et AR-230 mais aussi les cellules primaires de patients atteints de LMC). Cette molécule pourrait donc être utilisée comme agent thérapeutique chez les patients en phase blastique de la maladie pour lesquels aucune thérapeutique ne s'avère efficace.

Cette étude nous a aussi montré que des régulations existent entre les différentes morts et qu'il existe une certaine hiérarchie. Cependant, il est difficile de mettre en évidence un lien entre l'autophagie et la sénescence induite par le MPA. En effet, en utilisant des siRNA anti LC3B, le 3-méthyladénine, la choroquine ou encore les shRNA anti-ATG7, nous avons observé le rôle négatif de l'autophagie sur l'apoptose mais aucune action de l'autophagie sur la sénescence. Il semblerait que l'autophagie n'ait aucun rôle protecteur sur la sénescence induite par le MPA. Il est possible que le MPA induise de l'autophagie non canonique indépendante de la protéine Béclin 1 pouvant conduire à cette indépendance de la sénescence. De plus, malgré l'extinction de la protéine ATG7 dans les cellules, il est possible qu'une

autophagie résiduelle persiste et soit suffisante pour masquer le rôle de l'autophagie sur la sénescence.

En conclusion, il est intéressant de voir que le MPA est à la fois capable de sensibiliser des cellules primaires de LMC (CD34⁺) sensibles ou résistants aux ITK à l'apoptose ou d'éliminer par sénescence des cellules de lignées (cellules K562) elles aussi sensibles ou résistantes aux ITK. Il semble évident que le contexte cellulaire joue un rôle très important. Il sera donc intéressant de comparer certaines grandes voies de signalisation pour comprendre quels événements moléculaires contrôlent le choix de la mort. Les morts non apoptotiques sont des stratégies tout à fait pertinentes dans le cadre du cancer et notamment des résistances dans la LMC.

CONCLUSION ET

DISCUSSION

I. DISCUSSION

Les thérapeutiques ciblées telles que les ITK développées depuis 2002 ont été une révolution dans le traitement de la LMC en permettant la rémission chez 80% des patients. Cependant, malgré l'efficacité de ces thérapeutiques, des résistances sont apparues et continuent d'apparaître. En effet, avec un recul d'une dizaine d'années, les ITK anti-Abl ont apporté un bénéfice thérapeutique indiscutable dans la LMC tout en soulevant le problème des résistances.

Ces résistances touchent à la fois les progéniteurs hématopoïétiques mais aussi une fraction de cellules plus immatures comme les cellules souches à l'origine de la persistance de la maladie.

La résistance des cellules souches aux ITK est un enjeu d'avenir dans le domaine de la LMC mais également dans celui des cancers en général. En effet, réussir à sensibiliser les cellules souches (aux ITK ou à d'autres agents) c'est faire mourir les cellules souches par apoptose ou par des morts non apoptotiques, et donc, éradiquer la maladie. J'ai décidé dans le cadre de ma thèse d'utiliser les modèles cellulaires sensibles ou résistants aux ITK pour déterminer si on était capable de faire mourir une cellule leucémique dont les mécanismes de résistance ont été identifiés.

La résistance des cellules de LMC se traduit par une absence de réponse que l'on associe à une résistance à l'apoptose. C'est pourquoi, j'ai voulu déterminer comment restaurer l'apoptose et/ou induire des morts non apoptotiques pour s'affranchir de la résistance aux ITK. Pour atteindre cet objectif, il m'a été nécessaire dans un premier temps de déterminer comment pouvait mourir une cellule leucémique en présence d'ITK et s'il y avait une ou des régulations entre les différentes morts induites. Une meilleure compréhension de la coopération ou de la hiérarchie entre ces différentes morts devrait permettre d'en utiliser certaines pour abolir la résistance mais aussi augmenter l'efficacité des thérapeutiques actuelles.

I.A. Comment meure une cellule leucémique en réponse aux ITK?

I.A.1 La sénescence, une mort secondaire ?

La première partie de mon travail a montré, qu'en plus d'une réponse apoptotique et autophagique induite par l'imatinib, la sénescence est également un mécanisme important capable d'éliminer les cellules de LMC. En effet, le traitement de cellules K562 par l'imatinib induit une réponse sénescence aussi importante en proportion (38%) que la réponse apoptotique (35%). De manière similaire, une telle réponse sénescence a été mise en évidence dans des cellules GIST en présence d'imatinib¹⁹⁹. Bien que certains marqueurs de sénescence ne soient pas présents dans le modèle K562 du fait de l'absence des protéines p53 et p16, la sénescence que j'ai observé s'accompagne d'un arrêt du cycle cellulaire ainsi que d'une augmentation de la taille, de la granularité, de l'expression de p21 et enfin de l'activité SA- β -galactosidase.

Mes résultats confirment donc non seulement l'existence de CICD en présence d'imatinib (ou de nilotinib) dans les cellules de LMC mais surtout une réponse sénescence. Les CICD sont longtemps passées inaperçues car elles ne sont dévoilées que lorsque les caspases sont inactivées, soit par des agents pharmacologiques, soit par des inhibiteurs endogènes des caspases ou par un déficit en protéine effectrice de l'apoptose comme c'est le cas dans certaines cellules cancéreuses qui n'expriment plus certaines caspases. Jusqu'à présent, les études mettant en évidence les CICD dans des cellules de LMC décrivaient principalement des morts nécrose-like notamment dépendantes de la protéase Omi/Htra1⁴⁰². On trouve aussi des morts lysosomales et des catastrophes mitotiques^{403,425 426}. Il convient donc d'insister sur le fait que l'apoptose reste une des morts principales en réponse aux ITK dans la LMC mais qu'elle n'est pas la seule. En effet, la sénescence observée en réponse aux ITK dans certaines cellules de LMC est concomitante à l'apoptose induite. Cette sénescence devient prépondérante et majeure lorsque l'apoptose est inhibée. Quoiqu'il en soit, le contexte cellulaire est très important puisque cette hiérarchie observée dans toutes les lignées de LMC n'a pas pu l'être dans les progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ de patients atteints de LMC.

Il est donc fort probable que certains types cellulaires sont plus ou moins sensibles à certaines morts notamment apoptotiques.

Etant donné les différentes morts cellulaires induites par l'imatinib, à savoir l'apoptose, la sénescence et l'autophagie (mécanisme régulateur), il était intéressant de déterminer quelle était la hiérarchie et/ou la coopération entre elles.

I.A.2 Hiérarchie et/ou coopération entre l'apoptose, la sénescence et l'autophagie ?

Mon hypothèse de départ était de déterminer si on peut utiliser les CICD comme outils thérapeutiques pour dépasser la résistance aux ITK. Pour cela, il était indispensable de comprendre les liens qui unissent les morts cellulaires entre elles.

Dans nos modèles, la sénescence est induite par l'imatinib ou par l'hyperactivité de l'oncogène Bcr-Abl. Dans ce cas, elle se trouve associée à une augmentation de la protéine p21 ainsi qu'à un arrêt du cycle en phase G1 et elle est potentialisée lorsque l'apoptose est bloquée (Zvad, shRNA Bim, cDNA Bcl-2). Les cellules K562 étant délétées pour la p53 et mutée pour la p16, la sénescence observée implique donc des voies de signalisation p53 et p16 indépendantes. Cette dernière pourrait toutefois impliquer ATM ou la voie p38 MAPK^{329,331,412}. J'ai d'ailleurs entrepris d'étudier leur rôle dans la sénescence en réponse aux ITK notamment en utilisant des shRNA dirigés contre certaines protéines potentiellement impliquées telles que les protéines p21, ATM, Caspase 3.

La potentialisation de la réponse sénescence en absence d'apoptose que j'ai observée avait déjà été rapportée dans des cellules de neuroblastomes traitées à la doxorubicine⁴²⁷. Dans ce modèle, la sénescence était accompagnée d'une augmentation de l'expression de la protéine p21 en présence de faibles doses de doxorubicine, alors qu'à fortes concentrations une apoptose se mettait en place avec une activation de la caspase 3 et une diminution conséquente de l'expression de p21, cette dernière étant un substrat de la caspase 3.

L'identification des protéines clefs faisant le lien entre l'apoptose et la sénescence est essentielle. Il est tentant de penser que ce lien pourrait se faire par l'intermédiaire de

régulateur du cycle cellulaire comme la protéine Rb, E2F ou p21. Nos résultats sur les modèles de LMC traités avec de l'imatinib montre un clivage caspase-dépendant de la p21. En effet, le peptide Z-Vad-fmk ou le shRNA Bim préviennent l'activation des caspases ce qui conduit en réponse aux ITK à une augmentation de la p21 et à une réponse sénescence. Néanmoins, d'autres protéases pourraient être impliquées puisque le Z-vad aux concentrations utilisées (50µM) n'inhibe pas que les caspases.

La calpaïne pourrait aussi être un candidat liant l'apoptose à la sénescence. Elle possède de nombreux substrats allant des protéines du cytosquelette (taline, myosine, vinculine), aux facteurs de transcription et aux enzymes (PKC, PTEN, Caspases). En effet, son rôle dans l'apoptose n'est plus à démontrer notamment par sa capacité d'activer les caspase 3, 7 et 12⁴²⁸. Son rôle dans le vieillissement cellulaire a été suggéré par la corrélation entre une suractivation des calpaïnes lors du vieillissement ou de pathologies neuro dégénératives⁴²⁹.

La protéine p21 peut être induite de façon indépendante de p53 par d'autres facteurs de transcription comme E2F, STAT, le facteur Klf4 ou encore Cdx2^{414 415,416}.

Des protéines, comme par exemple la p38MAPK, sont à la fois impliquées dans les voies apoptotiques, de différenciation mais également de sénescence. Il a récemment été montré une réponse sénescence induite par un stress génotoxique indépendante de p53⁴³⁰. De plus, la p38 MAPK a de nombreuses cibles comme par exemple E2F, STAT-1, ou ATF-2, un activateur de mTOR impliqué dans la régulation négative de Bcr-Abl sur l'autophagie⁴³¹. Certaines de ces voies sont communes à différentes morts cellulaires ce qui fait que la signalisation entre l'apoptose et la sénescence reste encore peu connue au niveau moléculaire.

L'autophagie dans nos modèles n'est pas considérée comme une mort cellulaire mais plutôt comme un système de survie protégeant la cellule des morts cellulaires induites. Nous avons, retrouvé la coopération négative réciproque entre apoptose et autophagie décrite auparavant notamment en réponse aux ITK^{398,432,433}. Par contre, nous avons observé une potentialisation de la sénescence induite par les ITK lorsque l'apoptose est déficiente mais seulement dans les cellules capables d'une réponse autophagique. En effet, quelle que soit l'inhibition de l'apoptose utilisée (peptide Z-vad-fmk, shRNA Bim ou cDNA Bcl-2), nous avons toujours détecté cette potentialisation de la sénescence induite par les ITK confirmant

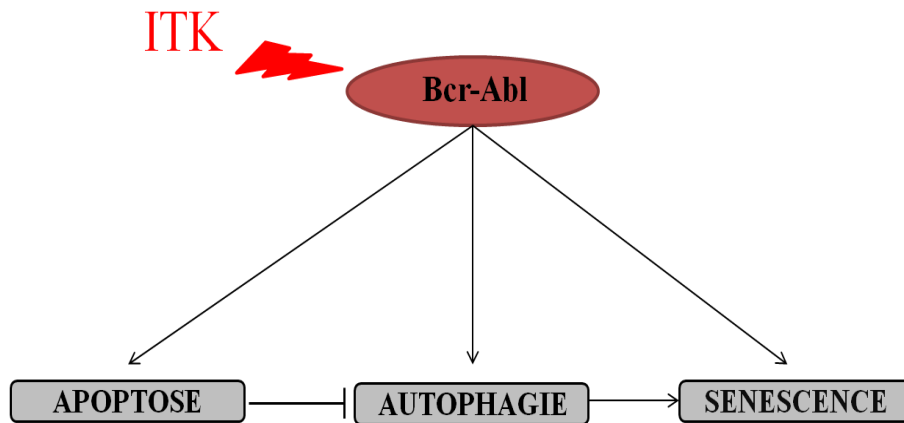
que le mécanisme apoptotique exerce bien un contrôle négatif sur la sénescence mais de façon indirecte *via* l'autophagie.

Dans le modèle résistant au dasatinib, nous permettant d'étudier la sénescence induite par l'oncogène Bcr-Abl, le sévrage en dasatinib conduit à de l'apoptose et de la sénescence. Cette dernière devient le type de mort prépondérant (75% des cellules) lorsque l'on a inhibé la réponse apoptotique confirmant mes précédents résultats.

Cependant, dans le cas d'une surexpression de Bcr-Abl, la participation de l'autophagie apparait beaucoup moins simple. En effet, le rôle négatif de l'autophagie sur l'apoptose est observé dans les cellules résistantes au dasatinib déficiente pour la réponse autophagique (KRD shRNA ATG7). De plus, le sevrage induit une faible réponse sénescence dans ces cellules déficientes pour l'autophagie (KRD shRNA ATG7) suggérant un rôle positif de l'autophagie sur la réponse sénescence. Par contre, mes résultats sur ces cellules KRD shRNA ATG7 montrent que la sénescence est augmentée au cours du sevrage lorsque l'apoptose est bloquée suggérant que dans ce cas l'autophagie aurait aussi un rôle négatif sur la sénescence. Ces résultats demandent à être reproduits pour déterminer si l'autophagie joue un rôle positif sur la sénescence en réponse aux ITK mais un rôle négatif sur la sénescence induite par l'oncogène Bcr-Abl.

Il convient de se rappeler qu'en réponse aux ITK, seulement une partie de la sénescence dépend de l'autophagie. En effet, lorsque l'on étudie la réponse à l'imatinib, deux niveaux de sénescence semblent se mettre en place, une sénescence dépendante de l'autophagie et l'autre indépendante. Cette sénescence dépendante de l'autophagie est aussi celle qui est négativement régulée par l'apoptose.

A travers ces différents modèles d'étude, j'ai pu m'apercevoir que les morts cellulaires induites par l'imatinib constituaient un véritable réseau. Elles sont liées directement ou indirectement les unes aux autres ce qui rend leur étude complexe. Il est maintenant indispensable de mettre en évidence les voies de signalisation qui permettent le « shift » entre une mort cellulaire et une autre, ceci afin de pouvoir ensuite cibler certaines voies pour dépasser les résistances aux ITK.



Modèle hypothétique des régulations observées dans nos modèles K562 entre l'apoptose, l'autophagie et la sénescence induite par les ITK

I.B. Quelles morts cellulaires pour contourner les résistances aux ITK ?

L'inositol-monophosphate déshydrogénase de type 2 (IMPDH2) est une enzyme surexprimée dans une multitude de cancers et les approches protéomiques développées au laboratoire ont montré que cette expression était encore plus élevée dans différents modèles de LMC résistants aux ITK. Mon travail a été de déterminer le potentiel thérapeutique de l'inhibition de cette enzyme nécessaire à la biosynthèse du GTP pour contourner la résistance. Dans le cadre de thérapies anticancéreuses, antivirales, ou immunosuppressives, des inhibiteurs de l'IMPDH ont pu être développés comme par exemple la Ribavirin dans le cadre de l'Hépatite C ⁴³⁴, le VX-498 ⁴³⁵ ou l'acide mycophénolique (MPA) en tant qu'immunosuppresseurs dans les transplantations rénales et cardiaques. Le MPA est un inhibiteur non compétitif, réversible et sélectif de l'IMPDH2 qui va inhiber son activité synthase et ainsi induire une déplétion du pool de GTP dans la cellule ⁴³⁶. C'est une thérapie efficace sur les lymphocytes T étant donné qu'il inhibe leur seule voie de synthèse du GTP. Il est également capable d'induire l'apoptose des lymphocytes T activés en réponse à un stimulus antigénique.

J'ai utilisé différents modèle : les lignées K562 résistantes à l'imatinib (surexpression de l'Hsp70), au nilotinib (surexpression de Lyn et Axl) et au dasatinib (surexpression de Bcr-Abl). Toutes ces lignées résistantes surexpriment l'IMPDH2. Les résultats, que nous avons obtenus en collaboration avec le Dr P.Legembre, ont montré que quel que soit le modèle de cellules de LMC utilisé, sensible ou résistant aux ITK, tous étaient sensibles au MPA et mouraient. La question était alors de déterminer quels types de morts permettent de les éliminer ? Et s'il existe une hiérarchie et/ou une coopération entre ces différentes morts ?

I.B.1 Contourner la résistance aux ITK par des morts non apoptotiques

Le MPA en réduisant le pool de GTP dans les cellules K562 inhibe le cycle cellulaire en bloquant la progression de la phase S. Mes résultats ont montré que le MPA induit une apoptose caspase-dépendante faible et une mort caspase indépendante dans le modèle K562. Cette dernière est indépendante des protéases comme Omi/HtrA1 ou la cathepsine D puisque leur inhibition ne l'empêche pas. En plus d'un arrêt du cycle cellulaire, le MPA induit un gonflement des cellules ainsi qu'une augmentation importante de l'activité SA- β -Gal indiquant une sénescence. Cette sénescence est corrélée à des dommages de l'ADN révélés par la phosphorylation de l'histone γ H2AX. On peut penser qu'elle est induite par ATM en réponse aux dommages de l'ADN causés par une déplétion en GTP. Néanmoins, le rôle d'ATM reste très discuté dans la sénescence en réponse à des dommages de l'ADN puisqu'elle est impliquée dans la sénescence de fibroblastes en réponse à une forme mutée de Ras³³¹ alors que ce même oncogène induit une sénescence indépendante d'ATM mais TGF- β dépendante dans des cellules épithéliales⁴¹². La réponse au MPA est prévenue par la pré-incubation des cellules avec de la guanosine. Dans ce cas, on prévient bien les dommages de l'ADN (détectés par la phosphorylation de γ H2AX) ainsi que la sénescence et l'apoptose induites mais on ne restaure pas totalement la prolifération cellulaire pour autant. Ceci suggère que le MPA a d'autres effets, conséquents ou non à l'inhibition de l'IMPDH2, notamment sur la prolifération cellulaire.

L'activation de l'autophagie par le MPA m'a permis de confirmer la régulation réciproque et négative entre l'autophagie et l'apoptose, que l'on avait déjà retrouvée lors de la

réponse aux ITK, suggérant un rôle protecteur de l'autophagie sur la cellule. Par contre, dans nos modèles, l'autophagie (quelle que soit la méthode pour l'inhiber) ne régule pas la réponse sénescence induite par le MPA. Cette propriété est fort intéressante puisqu'elle permettrait contrairement à la réponse apoptotique d'induire la sénescence sans que l'autophagie lui nuise.

I.B.2 Une dualité entre l'apoptose et la sénescence

En voulant confirmer mes résultats *ex vivo*, sur des cellules CD34⁺ de patients atteints de LMC sensibles ou résistants à l'imatinib, je me suis rendue compte que le MPA n'induit aucune sénescence, du moins détectable mais était à lui seul très efficace pour éliminer ces cellules par une apoptose massive.

La protéine p53, est une protéine pouvant être impliquée dans la régulation de l'apoptose mais également de la sénescence. Je me suis alors posée la question du rôle de p53 dans le choix entre une mort apoptotique et sénescence. C'est une des raisons pour laquelle j'ai inhibé l'expression de la p53 dans plusieurs modèles de lignées de LMC (LAMA-84 et AR-230). Ces deux modèles répondent au MPA par de l'apoptose et de la sénescence. Néanmoins, l'inhibition de l'expression de la p53 par un shRNA ne modifie en rien la balance entre apoptose et sénescence en réponse au MPA.

L'histoire du MPA comme je « m'amuse » à la nommée, nous a donc réservé bien des surprises avec cette dualité entre l'apoptose et la sénescence selon le type cellulaire. L'avantage de cet agent est qu'il est déjà utilisé en thérapeutique (immunosuppressive), et qu'il est à lui seul capable d'induire la mort des cellules leucémiques sensibles ou résistantes aux ITK quel que soit le mécanisme de résistance (heat shock protéine, surexpression de tyrosine kinase, surexpression ou mutation de Bcr-Abl). Cependant, son avenir dans la thérapeutique de la LMC semble peu envisageable puisque le MPA agit de la même façon sur des cellules non leucémiques à partir du moment où elles sont en cycle. Malgré tout, il est possible que ce soit une solution thérapeutique envisageable dans le cas où les patients sont en crise blastique et qu'ils deviennent alors insensibles à toutes les thérapeutiques.

I.C. La sénescence, une CICD prometteuse contre le cancer ?

I.C.1 Le rôle contradictoire de la sénescence : anti-tumoral ou pro-tumoral

La sénescence est induite par les ITK et par l'acide mycophénolique dans les lignées de LMC. Elle est aussi induite par une hyperexpression de l'oncogène Bcr-Abl dans cellules KRD lors d'un sevrage en dasatinib. Même si l'apoptose occupe la première place du podium, la sénescence présente un intérêt incontestable. En effet, en réponse à la pression thérapeutique, l'inhibition ou l'absence d'apoptose s'accompagne d'une augmentation de la sénescence.

La sénescence est une mort fréquemment induite par les thérapeutiques anti-cancéreuses, par exemple, en réponse au cisplatine, à la doxorubicine ou encore à la camptothécine, inhibiteur de la topoisomérase I⁴³⁷⁻⁴³⁹. Elle a même un rôle anti-tumoral puisqu'elle est très souvent retrouvée dans les étapes pré-cancéreuses mais pas au niveau des tumeurs malignes⁴⁴⁰. Théoriquement, la sénescence peut donc être un mécanisme très prometteur dans le cadre des thérapeutiques anti-cancéreuses. D'une part parce qu'elle se caractérise par un arrêt du cycle cellulaire irréversible et donc permet de bloquer la progression tumorale. D'autre part, de faibles doses d'agents thérapeutiques suffisent à faire rentrer les cellules en sénescence. Par exemple, de faibles doses de doxorubicine ou de 5-azacytidine permettent l'entrée en sénescence des cellules cancéreuses pancréatiques alors que de fortes doses aboutissent à leur apoptose⁴⁴¹.

Les cellules cancéreuses ou les cellules blastiques de LMC possèdent de nombreuses anomalies. Ces anomalies surnuméraires ne sont pas l'élément initial oncogénique mais participent aux processus multi-étapes du cancer. Par exemple, dans la moitié des tumeurs la protéine p53 est mutée ou inactivée, dans l'autre moitié c'est Rb⁴⁴². Si p53 est de ce fait non-fonctionnelle, il devient fort intéressant de développer des thérapeutiques pro-sénescences indépendantes de p53. Il a récemment été rapporté que cibler certaines protéines du cycle cellulaire pourrait être une bonne stratégie pour induire une sénescence indépendante de la voie p53. L'équipe de Lin a montré qu'une inhibition de Skp2 (S-phase kinase associated protein-2, une enzyme membre du complexe de protéines ubiquitine ligases) dans des

fibroblastes de souris, en présence d'un stress oncogénique, pourrait permettre de bloquer la protéine p27 et induire l'entrée en sénescence des cellules ⁴⁴³.

D'un autre côté, on ne doit pas négliger les potentiels effets pro-tumoraux de la sénescence à long terme. En effet, d'une part la cellule sénescence est résistante à l'apoptose ce qui peut être une cause de résistance à certaines thérapeutiques et d'autre part, la sécrétion paracrine de certains facteurs (cytokines, chimiokines ou facteur de croissance) peut être néfaste aux cellules elles-même mais également aux cellules avoisinantes comme c'est le cas lors de la sécrétion d'IL-6 et IL-8 ^{444 445}.

I.C.2 Similarité entre un état sénescence et quiescence

L'autophagie est un mécanisme qui régule la sénescence dans certaines conditions (comme nous l'avons vu) mais il a aussi un rôle important dans le maintien d'une hématopoïèse normale. Il a été observé, chez la souris, que les cellules souches hématopoïétiques leucémiques (CSL) présentent une augmentation de la masse mitochondriale, une accumulation de ROS et une instabilité génétique. De même, une extinction de FIP200 (complexe initial de l'autophagie avec ULK1) met en évidence le rôle essentiel de l'autophagie sur l'hématopoïèse fœtal chez la souris ^{446 447}. Ces résultats ne permettent pas de déterminer si l'autophagie contrôle l'état quiescent des CSL et/ou la reprise leucémique dans le cas des CSL mais tendent à montrer qu'un défaut d'autophagie peut aussi être à l'origine de la leucémie.

De plus, la sénescence ne peut-elle pas être considérée comme une quiescence cellulaire irréversible ? Contrairement à une cellule sénescence, une cellule en quiescence est capable de proliférer à nouveau mais rentre dans un « état de repos » en attendant de reprendre le cycle. Elle est arrêtée réversiblement en phase G0 du cycle cellulaire. On observe une diminution de l'expression des protéines p21, Rb, p16 ou encore p53. La sénescence et la quiescence bien que différentes possèdent des points communs et sont peut être même liées. En effet, il a été montré qu'un blocage de Skp2 en présence d'un stress oncogénique induisait la sénescence des cellules. La protéine Skp2 fait partie d'un complexe avec la cyclin A et le CDK2. Elle est capable de reconnaître l'état de phosphorylation de la CDKI (p27^{KIP}) pour la dégrader ^{448 449}. Chez la souris, Skp2 est également primordiale dans la régulation de la quiescence et de

l'auto renouvellement des CSH. En effet, dans les souris $Skp2^{-/-}$, la prolifération de la population CSH est augmentée *via* une augmentation de la cyclin D1 et son état quiescent diminue. De plus, l'absence de $Skp2$ permet d'augmenter la sensibilité des CSH de souris et des lignées K562 aux agents thérapeutiques (cyclophosphamide, 5-Fluorouracil, Doxorubicine)⁴⁵⁰.

Une compréhension des mécanismes impliqués dans l'état de sénescence ou de quiescence est une étape importante pour envisager de futures thérapeutiques curatives des cancers.

II. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Il semblerait qu'une cellule, quel que soit le stimulus, puisse répondre par différents types de mort, dont certains ne sont mis en évidence que lorsque l'apoptose est inhibée. Dans nos modèles, certaines morts ne sont détectées que dans les lignées de LMC, comme la sénescence, suggérant que ces réponses sont spécifiques des cellules de la crise blastique ayant accumulées de nombreuses anomalies moléculaires additionnelles à Bcr-Abl.

A ce titre, les résultats que j'ai obtenus sur les cellules primaires $CD34^{+}$ de LMC sensibles ou résistants aux ITK montrent que le MPA ou l'imatinib induisent une réponse apoptotique majeure et je n'ai jamais mis en évidence une réponse sénescence avec les marqueurs dont je dispose. Nous nous sommes donc posé les questions suivantes : la sénescence n'a-t-elle pas lieu ? Est-elle masquée par la réponse apoptotique ?

A ce jour malgré une augmentation de la taille cellulaire des cellules $CD34^{+}$ traitées au MPA, ou par de l'imatinib en présence de Zvad, aucun marquage SA- β -Gal n'a été détecté. Par contre une des expériences que je souhaite réaliser sera de détecter ces différents types de mort en réponse au MPA mais aussi aux ITK sur des blastes de patients atteints de LMC ou de leucémie aigue.

Mes résultats m'ont prouvé qu'il n'existe pas une voie de signalisation unique mais un labyrinthe de voies conduisant à la mort cellulaire. Certaines de ces voies sont communes à différentes morts cellulaires. Il est donc important de comprendre les voies de signalisation

impliquées dans la réalisation de ces morts cellulaires pour pouvoir ensuite les cibler notamment pour dépasser les résistances.

Parmi ces résistances, le problème majeur qui persiste dans la LMC, ainsi que de façon générale dans les cancers, c'est celui de la cellule souche cancéreuse à l'origine de la persistance et de la récurrence de la maladie. Dans la LMC, les cellules souches leucémiques (CSL) persistent et sont à l'origine de la rechute leucémique. La résistance de la CSL qui semble être multifactorielle (quiescence, expression diminuée d'OCT-1 et/ou augmentée du MDR, absence d'expression ou indépendance vis-à-vis de Bcr-Abl) demande à être comprise et caractérisée. A ce titre, des études récentes suggèrent la participation de l'autophagie dans le maintien de la cellule souche. Les souris ATG7^{-/-}, déficientes pour l'autophagie ont une hématopoïèse altérée aboutissant à une myéloprolifération et une lymphoprolifération suivie de la mort de la souris.

Nos résultats montrant un rôle de l'autophagie sur la réponse sénescence, une compréhension plus approfondie des morts cellulaires pourrait permettre de faire basculer une cellule quiescente vers un état sénescence ou de la sensibiliser aux ITK et ainsi d'épuiser le pool de cellules souches leucémiques. Pour cela il est nécessaire de posséder des modèles d'études adéquats qui permettraient de mimer l'état « souche » d'une cellule : les cellules pluripotentes induites (IPS) sont un de ces modèles possibles puisqu'il s'agit de reprogrammer une cellule primaire pour lui permettre d'acquérir les caractéristiques d'une cellule souche. Un modèle rapporté il y a quelques années concerne l'hypoxie prolongée qui permet de faire rentrer des cellules K562 dans un état de quiescence cellulaire avec une absence d'expression de Bcr-Abl et donc une résistance aux ITK. Nous allons développer ce modèle pour mimer certaines propriétés de la CSL et ainsi être capables premièrement de cribler des molécules de manière comparée et deuxièmement pour étudier la participation de l'autophagie dans le maintien et la reprise leucémique.

Mon projet d'étude sur les morts cellulaires dans la résistance aux ITK dans le cadre de la LMC a été initié il y a maintenant trois ans. Malheureusement le temps passe et ma thèse touche aujourd'hui à sa fin. On dit souvent que la fin n'est que le commencement d'autre chose alors j'espère dans le futur participer à la meilleure compréhension des mécanismes de sénescence et/ ou de quiescence dans les cellules cancéreuses.

RÉFÉRENCES

Références

1. Fialkow PJ, Jacobson RJ, Papayannopoulou T. Chronic myelocytic leukemia: Clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage. The American Journal of Medicine. 1977;63:125-130.
2. Till JE ME. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. 1961. Radiation Research. 1961;14:132-122.
3. Dexter TM, Moore MAS. In vitro duplication and /`cure/" of haemopoietic defects in genetically anaemic mice. Nature. 1977;269:412-414.
4. Bradley TR, Metcalf D. THE GROWTH OF MOUSE BONE MARROW CELLS IN VITRO. Aust J Exp Biol Med. 1966;44:287-300.
5. Sutherland HJ, Lansdorp PM, Henkelman DH, Eaves AC, Eaves CJ. Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers. PNAS. 1990;87:3584-3588.
6. Arai F, Hirao A, Ohmura M, *et al.* Tie2/Angiopoietin-1 Signaling Regulates Hematopoietic Stem Cell Quiescence in the Bone Marrow Niche. Cell. 2004;118:149-161.
7. Kaushansky K. Hematopoietic growth factors, signaling and the chronic myeloproliferative disorders. Cytokine & Growth Factor Reviews. 2006;17:423-430.
8. Massagué J, Blain SW, Lo RS. TGF[beta] Signaling in Growth Control, Cancer, and Heritable Disorders. Cell. 2000;103:295-309.
9. Fortunel N HJ, Aoustin L, Batard P, Ducos K, Monier MN, Charpentier A, Hatzfeld A. Specific dose-response effects of TGF-beta1 on developmentally distinct hematopoietic stem/progenitor cells from human umbilical cord blood. Hematol J. 2000;1:126-135.
10. Dong M, Blobel GC. Role of transforming growth factor-alpha in hematologic malignancies. Blood. 2006;107:4589-4596.
11. Batard P, Monier MN, Fortunel N, *et al.* TGF-beta1 maintains hematopoietic immaturity by a reversible negative control of cell cycle and induces CD34 antigen up-modulation. Jour Cell Science. 2000;113:383-390.
12. Grigorakaki C, Morceau F, Chateauvieux S, Dicato M, Diederich M. Tumor necrosis factor alpha-mediated inhibition of erythropoiesis involves GATA-1/GATA-2 balance impairment and PU.1 over-expression. Biochemical Pharmacology. 2011;82:156-166.

13. Pradelles P, Frobert Y, CrÃ©minon C, *et al.* Negative regulator of pluripotent hematopoietic stem cell proliferation in human white blood cells and plasma as analysed by enzyme immunoassay. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1990;170:986-993.
14. Jackson JD, Ozerol E, Yan Y, Ewel C, Talmadge JE. Activity of Acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro (AcSDKP) on Human Hematopoietic Progenitor Cells in Short-Term and Long-Term Bone Marrow Cultures. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research*. 2000;9:489-496.
15. Guigon M BD, Lemoine F, Kobari L, Parmentier C, Mary JY, Najman A. Inhibition of human bone marrow progenitors by the synthetic tetrapeptide AcSDKP. *Exp Hematol*. 1990;18:1112-1115.
16. Liu J-M, Bignon Jrm, Ilic V, *et al.* Evidence for an association of high levels of endogenous Acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro, a potent mediator of angiogenesis, with acute myeloid leukemia development. *Leukemia & Lymphoma*. 2006;47:1915-1920.
17. Guigon M BD. Inhibitory peptides in hematopoiesis. *Exp Hematol*. 1995;2:477-481.
18. Dunlop DJ, Wright EG, Lorimore S, *et al.* Demonstration of stem cell inhibition and myeloprotective effects of SCI/rhMIP1 alpha in vivo. *Blood*. 1992;79:2221-2225.
19. Broxmeyer HE, Sherry B, Cooper S, *et al.* Comparative analysis of the human macrophage inflammatory protein family of cytokines (chemokines) on proliferation of human myeloid progenitor cells. Interacting effects involving suppression, synergistic suppression, and blocking of suppression. *Journal of Immunology*. 1993;150:3448-3458.
20. Cashman JD, Eaves AC, Eaves CJ. The tetrapeptide AcSDKP specifically blocks the cycling of primitive normal but not leukemic progenitors in long-term culture: evidence for an indirect mechanism. *Blood*. 1994;84:1534-1542.
21. Broxmeyer HE CS, Li ZH, Lu L, Song HY, Kwon BS, Warren RE, Donner DB. Myeloid progenitor cell regulatory effects of vascular endothelial cell growth factor. *Int J Hematol* 1995;62:203-215.
22. Zhu J ES. Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene*. 2002;21:3295-3313.
23. Holyoake T, Jiang X, Eaves C, Eaves A. Isolation of a Highly Quiescent Subpopulation of Primitive Leukemic Cells in Chronic Myeloid Leukemia. *Blood*. 1999;94:2056-2064.
24. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell*. 2008;132:631-644.
25. NOWELL PC HD. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst* 1960;25:85-109
26. Melo JV, Barnes DJ. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7:441-453.

27. Kantarjian HM, Deisseroth A, Kurzrock R, Estrov Z, Talpaz M. Chronic myelogenous leukemia: a concise update. *Blood*. 1993;82:691-703.
28. Calabretta B, Perrotti D. The biology of CML blast crisis. *Blood*. 2004;103:4010-4022.
29. Witte2 SWaON. The BCR-ABL Story: Bench to Bedside and Back. *Annual Review of Immunology*. 2004;22:247-306.
30. Radich JP. The Biology of CML Blast Crisis. *Blood*. 2007;2007:384-391.
31. Johansson B FT, Mitelman F. Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia. *Acta Haematol* 2002;102:76-94
32. Hermans A, Heisterkamp N, von Linden M, *et al*. Unique fusion of bcr and c-abl genes in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. *Cell*. 1987;51:33-40.
33. Chan LC, Karhi KK, Rayter SI, *et al*. A novel abl protein expressed in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukaemia positive acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 1987;325:635-637.
34. Ben-Neriah Y, Daley GQ, Mes-Masson AM, Witte ON, Baltimore D. The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. *Science*. 1986;233:212-214.
35. Li S, Ilaria RL, Jr., Million RP, Daley GQ, Van Etten RA. The P190, P210, and P230 forms of the BCR/ABL oncogene induce a similar chronic myeloid leukemia-like syndrome in mice but have different lymphoid leukemogenic activity. *J Exp Med*. 1999;189:1399-1412.
36. Shtivelman E LB, Gale RP, Canaani E. Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature*. 1985;13-19:550-554.
37. Hantschel O, Superti-Furga G. Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5:33-44.
38. B J Mayer PKJ, and D Baltimore. The noncatalytic src homology region 2 segment of abl tyrosine kinase binds to tyrosine-phosphorylated cellular proteins with high affinity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:627-631.
39. Witte JBKaON. Detection of c-abl tyrosine kinase activity in vitro permits direct comparison of normal and altered abl gene products. *Mol Cell Biol*. 1985;5:3116–3123.
40. Hantschel O, Nagar B, Guettler S, *et al*. A Myristoyl/Phosphotyrosine Switch Regulates c-Abl. *Cell*. 2003;112:845-857.
41. B J Mayer PKJ, R A Van Etten, and D Baltimore. Point mutations in the abl SH2 domain coordinately impair phosphotyrosine binding in vitro and transforming activity in vivo. *Mol Cell Biol* 1992;12:609–618.
42. Harrison SC. Variation on an Src-like Theme. *Cell*. 2003;112:737-740.

43. Baltimore PJaD. N-terminal mutations activate the leukemogenic potential of the myristoylated form of c-abl. *EMBO J* 1989;8:449–456.
44. W M Franz PB, and J Y Wang. Deletion of an N-terminal regulatory domain of the c-abl tyrosine kinase activates its oncogenic potential. *EMBO J* 1989;8:137-147.
45. Daniela Barilál & Giulio Superti-Furga1. An intramolecular SH3-domain interaction regulates c-Abl activity. *Nature Genetics*. 1998;18:280-282.
46. Dhut S CT, Young BD. Normal c-abl gene protein--a nuclear component. *Oncogene*. 1991;6:1459-1464.
47. Welch PJ, Wang JYJ. A C-terminal protein-binding domain in the retinoblastoma protein regulates nuclear c-Abl tyrosine kinase in the cell cycle. *Cell*. 1993;75:779-790.
48. Sawyers CL, McLaughlin J, Goga A, Havlik M, Witte O. The nuclear tyrosine kinase c-abl negatively regulates cell growth. *Cell*. 1994;77:121-131.
49. Liu J, Wu Y, Ma GZ, *et al*. Inhibition of Bcr serine kinase by tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol*. 1996;16:998-1005.
50. Shafman T, Khanna KK, Kedar P, *et al*. Interaction between ATM protein and c-Abl in response to DNA damage. *Nature*. 1997;387:520-523.
51. Rajasekaran Baskaran G, and Jean Y. J. Wang. Identification of a Binding Site in c-Abl Tyrosine Kinase for the C-Terminal Repeated Domain of RNA Polymerase II. *Molecular And Cellular Biology*. 1996;16:3361-3369.
52. Yuan Z-M, Shioya H, Ishiko T, *et al*. p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature*. 1999;399:814-817.
53. Lewis JM, Baskaran R, Taagepera S, Schwartz MA, Wang JYâJ. Integrin regulation of c-Abl tyrosine kinase activity and cytoplasmic nuclear transport. *PNAS*. 1996;93:15174-15179.
54. Maru Y, Witte ON. The BCR gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon. *Cell*. 1991;67:459-468.
55. McWhirter JR, Galasso DL, Wang JY. A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Mol Cell Biol*. 1993;13:7587-7595.
56. Ma G, Lu D, Wu Y, Liu J, Arlinghaus RB. Bcr phosphorylated on tyrosine 177 binds Grb2. *Oncogene*. 1997;14:2367-2372.
57. Ron D ZM, Lewis M, Wickner RB, Hunt LT, Graziani G, Tronick SR, Aaronson SA, Eva A. A region of proto-dbl essential for its transforming activity shows sequence similarity to a yeast cell cycle gene, CDC24, and the human breakpoint cluster gene, bcr. *New Biology*. 1991;3:372-379.
58. Diekmann D, Brill S, Garrett MD, *et al*. Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21rac. *Nature*. 1991;351:400-402.

59. Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science*. 1990;247:824-830.
60. Ren S-y, Xue F, Feng J, Skorski T. Intrinsic regulation of the interactions between the SH3 domain of p85 subunit of phosphatidylinositol-3 kinase and the protein network of BCR/ABL oncogenic tyrosine kinase. *Experimental Hematology*. 2005;33:1222-1228.
61. Deininger MW, Vieira S, Mendiola R, *et al.* BCR-ABL tyrosine kinase activity regulates the expression of multiple genes implicated in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia. *Cancer Res*. 2000;60:2049-2055.
62. Bos JL. ras Oncogenes in Human Cancer: A Review. *Cancer Res*. 1989;49:4682-4689.
63. Hurley JB SM, Teplow DB, Robishaw JD, Gilman AG. Homologies between signal transducing G proteins and ras gene products. *Science*. 1984;226:860-862.
64. Pendergast AM, Quilliam LA, Cripe LD, *et al.* BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell*. 1993;75:175-185.
65. L S Steelman¹ SCP, J G Shelton¹, R A Franklin^{1,3}, F E Bertrand¹ and J A McCubrey^{1,3}. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia*. 2004;18:189-218.
66. Cilloni D, Saglio G. CML: a model for targeted therapy. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2009;22:285-294.
67. Skorski T, Bellacosa A, Nieborowska-Skorska M, *et al.* Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. *Embo J*. 1997;16:6151-6161.
68. Sawyers CL MJ, Witte ON. Genetic requirement for Ras in the transformation of fibroblasts and hematopoietic cells by the Bcr-Abl oncogene. *J Exp Med*. 1995;181:307-313.
69. Goga A, McLaughlin J, Afar DEH, Saffran DC, Witte ON. Alternative signals to RAS for hematopoietic transformation by the BCR-ABL oncogene. *Cell*. 1995;82:981-988.
70. Sattler M SR, Okuda K, Uemura N, Durstin MA, Pisick E, Xu G, Li JL, Prasad KV, Griffin JD., Source. The proto-oncogene product p120CBL and the adaptor proteins CRKL and c-CRK link c-ABL, p190BCR/ABL and p210BCR/ABL to the phosphatidylinositol-3' kinase pathway. *Oncogene*. 1996;12:839-846.
71. Ten Hoeve J, Kaartinen V, Fioretos T, *et al.* Cellular interactions of CRKL, and SH2-SH3 adaptor protein. *Cancer Res*. 1994;54:2563-2567.
72. Ten Hoeve J, Arlinghaus RB, Guo JQ, Heisterkamp N, Groffen J. Tyrosine phosphorylation of CRKL in Philadelphia+ leukemia. *Blood*. 1994;84:1731-1736.

73. Oda T, Heaney C, Hagopian JR, *et al.* Crkl is the major tyrosine-phosphorylated protein in neutrophils from patients with chronic myelogenous leukemia. *Jour Biol Chem.* 1994;269:22925-22928.
74. de Jong R, ten Hoeve J, Heisterkamp N, Groffen J. Crkl is complexed with tyrosine-phosphorylated Cbl in Ph-positive leukemia. *J Biol Chem.* 1995;270:21468-21471.
75. Bhat A, Kolibaba K, Oda T, *et al.* Interactions of CBL with BCR-ABL and CRKL in BCR-ABL-transformed Myeloid Cells. *Jour Biol Chem.* 1997;272:16170-16175.
76. Seo J-H, Wood LJ, Agarwal A, *et al.* A Specific Need for CRKL in p210BCR-ABL Induced Transformation of Mouse Hematopoietic Progenitors. *Cancer Res.* 2010;70:7325-7335.
77. Kharas MG, Fruman DA. ABL Oncogenes and Phosphoinositide 3-Kinase: Mechanism of Activation and Downstream Effectors. *Cancer Res.* 2005;65:2047-2053.
78. Tari AM, Arlinghaus R, Lopez-Berestein G. Inhibition of Grb2 and Crkl Proteins Results in Growth Inhibition of Philadelphia Chromosome Positive Leukemic Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1997;235:383-388.
79. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet.* 2006;7:606-619.
80. Nobukuni T, Joaquin M, Roccio M, *et al.* Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *PNAS.* 2005;102:14238-14243.
81. K Keeshan TGCaSLM. High Bcr-Abl expression prevents the translocation of Bax and Bad to the mitochondrion. *Leukemia.* 2002;16:1725-1734.
82. Hui RY, Gomes AR, Constantinidou D, *et al.* The Forkhead Transcription Factor FOXO3a Increases Phosphoinositide-3 Kinase/Akt Activity in Drug-Resistant Leukemic Cells through Induction of PIK3CA Expression. *Mol and Cell Biol.* 2008;28:5886-5898.
83. Cross DAE, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature.* 1995;378:785-789.
84. Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: Its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis.* 2004;9:667-676.
85. Chu S, McDonald T, Bhatia R. Role of BCR-ABL-Y177-mediated p27kip1 phosphorylation and cytoplasmic localization in enhanced proliferation of chronic myeloid leukemia progenitors. *Leukemia;*24:779-787.
86. Liang X, Wisniewski D, Strife A, *et al.* Phosphatidylinositol 3-Kinase and Src Family Kinases Are Required for Phosphorylation and Membrane Recruitment of Dok-1 in c-Kit Signaling. *J Biol Chem.* 2002;277:13732-13738.

87. Liang J, Zubovitz J, Petrocelli T, *et al.* PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med.* 2002;8:1153-1160.
88. Viglietto G, Motti ML, Bruni P, *et al.* Cytoplasmic relocation and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat Med.* 2002;8:1136-1144.
89. Zhou BP, Liao Y, Xia W, *et al.* Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol.* 2001;3:245-252.
90. Socolovsky M, Fallon AEJ, Wang S, Brugnara C, Lodish HF. Fetal Anemia and Apoptosis of Red Cell Progenitors in Stat5a^{-/-}5b^{-/-} Mice: A Direct Role for Stat5 in Bcl-XL Induction. *Cell.* 1999;98:181-191.
91. Rane SG, Reddy EP. JAKs, STATs and Src kinases in hematopoiesis. *Oncogene.* 2002;21:3334-3358.
92. Shanhai Xie HL, Tong Sun and Ralph B Arlinghaus. Jak2 is involved in c-Myc induction by Bcr-Abl. *Oncogene.* 2002;21:7137-7146.
93. Coppo P, Flamant S, Mas VD, *et al.* BCR-ABL activates STAT3 via JAK and MEK pathways in human cells. *British Journal of Haematology.* 2006;134:171-179.
94. Shashidhar S. Jatiani SCC, M.V. Ramana Reddy, Ji Hee Ha, Stacey J. Baker, Ajoy K. Samanta, Matthew J. Olnes, Loretta Pfannes, Elaine M. Sloand, Ralph B. Arlinghaus, and E. Premkumar Reddy. A Non-ATP-Competitive Dual Inhibitor of JAK2V617F and BCR-ABL T315I Kinase. *Genes Cancer.* 2010;1:331-345.
95. Ajoy K. Samanta SNC, Yan Wang, Ellen Schlette, E. Premkumar Reddy, and Ralph B. Arlinghaus. Destabilization of Bcr-Abl/Jak2 Network by a Jak2/Abl Kinase Inhibitor ON044580 Overcomes Drug Resistance in Blast Crisis Chronic Myelogenous Leukemia (CML). *Genes Cancer* 2010;1:346-359.
96. Spiekermann K, Pau M, Schwab R, *et al.* Constitutive activation of STAT3 and STAT5 is induced by leukemic fusion proteins with protein tyrosine kinase activity and is sufficient for transformation of hematopoietic precursor cells. *Experimental Hematology.* 2002;30:262-271.
97. Imada K, Leonard WJ. The Jak-STAT pathway. *Molecular Immunology.* 2000;37:1-11.
98. Kovarik TDaP. Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene.* 2000;19:2628-2637.
99. Khwaja A. The role of Janus kinases in haemopoiesis and haematological malignancy. *British Journal of Haematology.* 2006;134:366-384.
100. Gesbert F, Griffin JD. Bcr/Abl activates transcription of the Bcl-X gene through STAT5. *Blood.* 2000;96:2269-2276.

101. I Matsumura TK, H Wakao, H Tanaka, K Hashimoto, C Albanese, J Downward, R G Pestell, and Y Kanakura. Transcriptional regulation of the cyclin D1 promoter by STAT5: its involvement in cytokine-dependent growth of hematopoietic cells. *EMBO J* 1999;18:1367–1377.
102. Tammy Bowman MAB, Dominic Sinibaldi, Walker Wharton, *et al.* Stat3-mediated Myc expression is required for Src transformation and PDGF-induced mitogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:7319–7324.
103. Nieborowska-Skorska M, Wasik MA, Slupianek A, *et al.* Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)5 Activation by BCR/ABL Is Dependent on Intact Src Homology (SH)3 and SH2 Domains of BCR/ABL and Is Required for Leukemogenesis. *Vol. 189; 1999:1229-1242.*
104. Carlesso N FD, Griffin JD. Tyrosyl phosphorylation and DNA binding activity of signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins in hematopoietic cell lines transformed by Bcr/Abl. *J Exp Med* 1996 183:811-820.
105. De Groot RP, Raaijmakers JAM, Lammers J-WJ, Koenderman L. STAT5-Dependent CyclinD1 and Bcl-xL Expression in Bcr-Abl-Transformed Cells. *Molecular Cell Biology Research Communications.* 2000;3:299-305.
106. Chai SK, Nichols GL, Rothman P. Constitutive activation of JAKs and STATs in BCR-Abl-expressing cell lines and peripheral blood cells derived from leukemic patients. *J Immunol.* 1997;159:4720-4728.
107. Samanta AK, Lin H, Sun T, Kantarjian H, Arlinghaus RB. Janus kinase 2: a critical target in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res.* 2006;66:6468-6472.
108. Agata Klejman SJS, 1 Malgorzata Nieborowska-Skorska, Artur Slupianek, Matthew Wilson,1 Thomas E. Smithgall,1 and Tomasz Skorski2. The Src family kinase Hck couples BCR/ABL to STAT5 activation in myeloid leukemia cells. *EMBO J* 2002;21:5766–5774.
109. James V. Alvarez1, Frank2 DA. Genome-wide analysis of STAT target genes: Elucidating the mechanism of STAT-mediated oncogenesis. *Cell Biology & Therapy.* 2004;3:1045 - 1050.
110. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, *et al.* Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1773:1263-1284.
111. McGahon A, Bissonnette R, Schmitt M, *et al.* BCR-ABL maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death [published erratum appears in *Blood* 1994 Jun 15;83(12):3835]. *Blood.* 1994;83:1179-1187.
112. Bedi A, Zehnbauser BA, Barber JP, Sharkis SJ, Jones RJ. Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. *Blood.* 1994;83:2038-2044.

113. Cortez D, Stoica G, Pierce JH, Pendergast AM. The BCR-ABL tyrosine kinase inhibits apoptosis by activating a Ras-dependent signaling pathway. *Oncogene*. 1996;13:2589-2594.
114. Skorski T, Wlodarski P, Daheron L, *et al*. BCR/ABL-mediated leukemogenesis requires the activity of the small GTP-binding protein Rac. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:11858-11862.
115. Sánchez-García I, Martín-Zanca D. Regulation of Bcl-2 gene expression by BCR-ABL is mediated by Ras. *Journal of Molecular Biology*. 1997;267:225-228.
116. Amarante-Mendes GP, Naekyung Kim C, Liu L, *et al*. Bcr-Abl Exerts Its Antiapoptotic Effect Against Diverse Apoptotic Stimuli Through Blockage of Mitochondrial Release of Cytochrome C and Activation of Caspase-3. *Blood*. 1998;91:1700-1705.
117. Chen C, Edelstein LC, Gelinas C. The Rel/NF-kappa B Family Directly Activates Expression of the Apoptosis Inhibitor Bcl-xL. *Mol and Cell Biol*. 2000;20:2687-2695.
118. Aichberger KJ, Mayerhofer M, Krauth M-T, *et al*. Low-Level Expression of Proapoptotic Bcl-2 Interacting Mediator in Leukemic Cells in Patients with Chronic Myeloid Leukemia: Role of BCR/ABL, Characterization of Underlying Signaling Pathways, and Reexpression by Novel Pharmacologic Compounds. *Cancer Res*. 2005;65:9436-9444.
119. Kuribara R, Honda H, Matsui H, *et al*. Roles of Bim in apoptosis of normal and Bcr-Abl-expressing hematopoietic progenitors. *Mol Cell Biol*. 2004;24:6172-6183.
120. Ghaffari S, Jagani Z, Kitidis C, Lodish HF, Khosravi-Far R. Cytokines and BCR-ABL mediate suppression of TRAIL-induced apoptosis through inhibition of forkhead FOXO3a transcription factor. *PNAS*. 2003;100:6523-6528.
121. Luciano F, Jacquelin A, Colosetti P, *et al*. Phosphorylation of Bim-EL by Erk1//2 on serine 69 promotes its degradation via the proteasome pathway and regulates its proapoptotic function. *Oncogene*. 2003;22:6785-6793.
122. Baeuerle PA, Baltimore D. A 65-kD subunit of active NF-kappaB is required for inhibition of NF-kappaB by I kappaB. *Genes Dev*. 1989;3:1689-1698.
123. DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M. A cytokine-responsive I[kappa]B kinase that activates the transcription factor NF-[kappa]B. *Nature*. 1997;388:548-554.
124. Mercurio F, Zhu H, Murray BW, *et al*. IKK-1 and IKK-2: Cytokine-Activated Kinases Essential for NF-κB Activation. *Science Mag*. 1997;278:860-866.
125. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation Meets Ubiquitination: The Control of NF-KappaB Activity. *Annu Rev Immunom*. 2000;18:621-663.
126. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8:49-62.
127. Brasier A. The NF-κB regulatory network. *Cardiovascular Toxicology*. 2006;6:111-130.

128. Gilmore TD. Introduction to NF-[kappa]B: players, pathways, perspectives. *Oncogene*;25:6680-6684.
129. Gilmore TD KM, Piffat KA, White DW. Rel/NF-kappaB/IkappaB proteins and cancer. *Oncogene*. 1996;13:1367-1378.
130. P A Ganchi SCS, W C Greene, and D W Ballard. I kappa B/MAD-3 masks the nuclear localization signal of NF-kappa B p65 and requires the transactivation domain to inhibit NF-kappa B p65 DNA binding. *MolCellBiol*. 1992;3:1339-1352.
131. Henkel T, Zabel U, van Zee K, *et al*. Intramolecular masking of the nuclear location signal and dimerization domain in the precursor for the p50 NF-[kappa]B subunit. *Cell*. 1992;68:1121-1133.
132. Karin M, Lin A. NF-[kappa]B at the crossroads of life and death. *Nat Immunol*. 2002;3:221-227.
133. Baldwin AS. The NF-KappaB AND KappaB Proteins: New Discoveries and Insights. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:649-681.
134. Cilloni D, Messa F, Arruga F, *et al*. The NF-[kappa]B pathway blockade by the IKK inhibitor PS1145 can overcome Imatinib resistance. *Leukemia*. 2005;20:61-67.
135. Lounnas N, Frelin C, Gonthier N, *et al*. NF-κB inhibition triggers death of imatinib-sensitive and imatinib-resistant chronic myeloid leukemia cells including T315I Bcr-Abl mutants. *International Journal of Cancer*. 2009;125:308-317.
136. Wei Y-L, Liang Y, Xu L, Zhao X-Y. The Antiproliferation Effect of Berbamine on K562 Resistant Cells by Inhibiting NF-κB Pathway. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*. 2009;292:945-950.
137. Nawata R, Yujiri T, Nakamura Y, *et al*. MEK kinase 1 mediates the antiapoptotic effect of the Bcr-Abl oncogene through NF-[kappa]B activation. *Oncogene*;22:7774-7780.
138. Ho H-Y, Lee H-H, Lai M-Z. Overexpression of mitogen-activated protein kinase kinase reversed cAMP inhibition of NF-κB in T cells. *European Journal of Immunology*. 1997;27:222-226.
139. Mihailovic T, Marx M, Auer A, *et al*. Protein Kinase D2 Mediates Activation of Nuclear Factor Kappa B by Bcr-Abl in Bcr-Abl+ Human Myeloid Leukemia Cells. *Cancer Res*. 2004;64:8939-8944.
140. Julie Y. Reuther, 2 Gary W. Reuther,4,5 David Cortez,4,6 Ann Marie Pendergast,4 and Albert S. Baldwin, Jr.1,2,3,7. A requirement for NF-κB activation in Bcr–Abl-mediated transformation. *Genes Dev*. 1998;12:968–981.
141. Malika Hamdane. Activation of p65 NF-kappaB protein by p210BCR - ABL in a myeloid cell line (P210BCR - ABL activates p65 NF-kappaB). *Oncogene*. 1997;15:2267-2275.

142. Nidai Ozes O, Mayo LD, Gustin JA, *et al.* NF-[kappa]B activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature*. 1999;401:82-85.
143. Kirchner D, Duyster J, Ottmann O, *et al.* Mechanisms of Bcr-Abl-mediated NF-[kappa]B/Rel activation. *Experimental Hematology*. 2003;31:504-511.
144. Daniel R. Ciocca¹ and Stuart K. Calderwood³. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones*. 2005;10:86-103.
145. Ray S, Lu Y, Kaufmann SH, *et al.* Genomic mechanisms of p210BCR-ABL signaling: induction of heat shock protein 70 through the GATA response element confers resistance to paclitaxel-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 2004;279:35604-35615.
146. Garrido C, Brunet M, Didelot C, *et al.* Heat Shock Proteins 27 and 70: Anti-Apoptotic Proteins with Tumorigenic Properties. *Cell Cycle*. 2006;5:2592-2601.
147. Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, *et al.* Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol*. 2001;3:839-843.
148. Park HS, Cho SG, Kim CK, *et al.* Heat shock protein hsp72 is a negative regulator of apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol*. 2002;22:7721-7730.
149. Yeh C-H, Tseng R, Zhang Z, *et al.* Circulating heat shock protein 70 and progression in patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia Research*. 2009;33:212-217.
150. Pocaly M, Lagarde V, Etienne G, *et al.* Overexpression of the heat-shock protein 70 is associated to imatinib resistance in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2007;21:93-101.
151. David Cortez. The Bcr-Abl tyrosine kinase activates mitogenic signaling pathways and stimulates G1-to-S phase transition in hematopoietic cells. *Oncogene*. 1997;15:2333/2342.
152. Laneuville P, Sun G, Timm M, Vekemans M. Clonal evolution in a myeloid cell line transformed to interleukin-3 independent growth by retroviral transduction and expression of p210bcr/abl. *Blood*. 1992;80:1788-1797.
153. Holyoake TL, Jiang X, Jorgensen HG, *et al.* Primitive quiescent leukemic cells from patients with chronic myeloid leukemia spontaneously initiate factor-independent growth in vitro in association with up-regulation of expression of interleukin-3. *Blood*. 2001;97:720-728.
154. Jena N, Deng M, Sicinska E, Sicinski P, Daley GQ. Critical Role for Cyclin D2 in BCR/ABL-induced Proliferation of Hematopoietic Cells. Vol. 62; 2002:535-541.
155. Afar DE, McLaughlin J, Sherr CJ, Witte ON, Roussel MF. Signaling by ABL oncogenes through cyclin D1. *PNAS*. 1995;92:9540-9544.
156. Toyoshima H, Hunter T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell*. 1994;78:67-74.

157. Polyak K, Lee M-H, Erdjument-Bromage H, *et al.* Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell*. 1994;78:59-66.
158. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *GenesDev*. 1999;13:1501-1512.
159. Jonuleit T, van der Kuip H, Miething C, *et al.* Bcr-Abl kinase down-regulates cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in human and murine cell lines. *Blood*. 2000;96:1933-1939.
160. Andreu EJ, Lledo E, Poch E, *et al.* BCR-ABL Induces the Expression of Skp2 through the PI3K Pathway to Promote p27Kip1 Degradation and Proliferation of Chronic Myelogenous Leukemia Cells. *Cancer Res*. 2005;65:3264-3272.
161. Borriello A, Caldarelli I, Bencivenga D, *et al.* p57Kip2 is a downstream effector of BCR-ABL kinase inhibitors in chronic myelogenous leukemia cells. *carcinogenesis*. 2011;32:10-18.
162. Umemoto T, Yamato M, Nishida K, *et al.* p57Kip2 is expressed in quiescent mouse bone marrow side population cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005;337:14-21.
163. Gordon MY, Dowding CR, Riley GP, Goldman JM, Greaves MF. Altered adhesive interactions with marrow stroma of haematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature*. 1987;328:342-344.
164. Verfaillie CM, McCarthy JB, McGlave PB. Mechanisms underlying abnormal trafficking of malignant progenitors in chronic myelogenous leukemia. Decreased adhesion to stroma and fibronectin but increased adhesion to the basement membrane components laminin and collagen type IV. *The Journal of Clinical Investigation*. 1992;90:1232-1241.
165. Richard O H. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell*. 2002;110:673-687.
166. Guo W, Giancotti FG. Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5:816-826.
167. Bhatia R, Munthe HA, Forman SJ. Abnormal growth factor modulation of β 1-integrin-mediated adhesion in chronic myelogenous leukaemia haematopoietic progenitors. *British Journal of Haematology*. 2001;115:845-853.
168. Bhatia R, Verfaillie CM. The Effect of Interferon-alpha on Beta-1 Integrin Mediated Adhesion and Growth Regulation in Chronic Myelogenous Leukemia. *Information Healthcare*. 1998;28:241-254.
169. Bhatia R, Verfaillie CM. Inhibition of BCR-ABL Expression With Antisense Oligodeoxynucleotides Restores Integrin-Mediated Adhesion and Proliferation Inhibition in Chronic Myelogenous Leukemia Hematopoietic Progenitors. *Blood*. 1998;91:3414-3422.

170. Salgia R, Uemura N, Okuda K, *et al.* CRKL Links p210BCR/ABL with Paxillin in Chronic Myelogenous Leukemia Cells. *Jour Biol Chem.* 1995;270:29145-29150.
171. Salgia R, Pisick E, Sattler M, *et al.* p130CAS Forms a Signaling Complex with the Adapter Protein CRKL in Hematopoietic Cells Transformed by the BCR/ABL Oncogene. *Jour Biol Chem.* 1996;271:25198-25203.
172. Jiang Y, Zhao RCH, Verfaillie CM. Abnormal integrin-mediated regulation of chronic myelogenous leukemia CD34+ cell proliferation: BCR/ABL up-regulates the cyclin-dependent kinase inhibitor, p27Kip, which is relocated to the cell cytoplasm and incapable of regulating cdk2 activity. *PNAS.* 2000;97:10538-10543.
173. Sattler M, Verma S, Shrikhande G, *et al.* The BCR/ABL Tyrosine Kinase Induces Production of Reactive Oxygen Species in Hematopoietic Cells. *Jour Biol Chem.* 2000;275:24273-24278.
174. Skorski T. BCR/ABL regulates response to DNA damage: the role in resistance to genotoxic treatment and in genomic instability. *Oncogene.* 2002;21.
175. Sallmyr A, Fan J, Rassool FV. Genomic instability in myeloid malignancies: Increased reactive oxygen species (ROS), DNA double strand breaks (DSBs) and error-prone repair. *Cancer Letters.* 2008;270:1-9.
176. Nowicki MO, Falinski R, Koptyra M, *et al.* BCR/ABL oncogenic kinase promotes unfaithful repair of the reactive oxygen species-dependent DNA double-strand breaks. *Blood.* 2004;104:3746-3753.
177. Slupianek A, Nowicki MO, Koptyra M, Skorski T. BCR/ABL modifies the kinetics and fidelity of DNA double-strand breaks repair in hematopoietic cells. *DNA Repair.* 2006;5:243-250.
178. Deutsch E, Dugray A, AbdulKarim B, *et al.* BCR-ABL down-regulates the DNA repair protein DNA-PKs. *Blood.* 2001;97:2084-2090.
179. DiBiase SJ, Zeng Z-C, Chen R, *et al.* DNA-dependent Protein Kinase Stimulates an Independently Active, Nonhomologous, End-Joining Apparatus. *Cancer Res.* 2000;60:1245-1253.
180. Smith GCM, Jackson SP. The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev.* 1999;13:916-934.
181. Poplawski T, Blasiak J. BCR/ABL downregulates DNA-PKC-dependent and upregulates backup non-homologous end joining in leukemic cells. *Molecular Biology Reports;*37:2309-2315.
182. San José-Eneriz E, Agirre X, Jiménez-Velasco A, *et al.* Epigenetic down-regulation of BIM expression is associated with reduced optimal responses to imatinib treatment in chronic myeloid leukaemia. *European Journal of Cancer.* 2009;45:1877-1889.
183. Hehlmann R, Heimpel H, Hasford J, *et al.* Randomized comparison of interferon-alpha with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. The German CML Study Group . *Blood.* 1994;84:4064-4077.

184. Hehlmann R, Heimpel H, Hasford J, *et al.* Randomized comparison of busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia: prolongation of survival by hydroxyurea. The German CML Study Group. *Blood*. 1993;82:398-407.
185. Goldman JM. Chronic Myeloid Leukemia: A Historical Perspective. *Seminars in Hematology*. 2010;47:302-311.
186. Talpaz M, Kantarjian HM, McCredie K, *et al.* Hematologic Remission and Cytogenetic Improvement Induced by Recombinant Human Interferon AlphaA in Chronic Myelogenous Leukemia. *N Engl J Med*. 1986;314:1065-1069.
187. Guilhot F, Chastang C, Michallet M, *et al.* Interferon Alfa-2b Combined with Cytarabine versus Interferon Alone in Chronic Myelogenous Leukemia. *N Engl J Med*. 1997;337:223-229.
188. Druker BJ TS, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med*. 1996;2:561/566.
189. Druker BJ, Lydon NB. Lessons learned from the development of an Abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *The Journal of Clinical Investigation*. 2000;105:3-7.
190. Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, *et al.* Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res*. 1996;56:100-104.
191. Buchdunger E, Cioffi CL, Law N, *et al.* Abl Protein-Tyrosine Kinase Inhibitor STI571 Inhibits In Vitro Signal Transduction Mediated by c-Kit and Platelet-Derived Growth Factor Receptors. *Jour of Pharm and Exp Therap*. 2000;295:139-145.
192. Rix U, Hantschel O, Durnberger G, *et al.* Chemical proteomic profiles of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib and dasatinib reveal novel kinase and non-kinase targets. *Blood*. 2007;110:4055-4063.
193. Nagar B, Bornmann WG, Pellicena P, *et al.* Crystal Structures of the Kinase Domain of c-Abl in Complex with the Small Molecule Inhibitors PD173955 and Imatinib (STI-571). *Cancer Res*. 2002;62:4236-4243.
194. Deininger MWN, Goldman JM, Lydon N, Melo JV. The Tyrosine Kinase Inhibitor CGP57148B Selectively Inhibits the Growth of BCR-ABL Positive Cells. *Blood*. 1997;90:3691-3698.
195. Komatsu N, Watanabe T, Uchida M, *et al.* A Member of Forkhead Transcription Factor Is a Downstream Effector of STI571-induced Cell Cycle Arrest in BCR-ABL-expressing Cells. *Jour Biol Chem*. 2003;278:6411-6419.
196. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, *et al.* Imatinib Compared with Interferon and Low-Dose Cytarabine for Newly Diagnosed Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2003;348:994-1004.

197. Ottmann OG, Druker BJ, Sawyers CL, *et al.* A phase 2 study of imatinib in patients with relapsed or refractory Philadelphia chromosome-positive acute lymphoid leukemias. *Blood*. 2002;100:1965-1971.
198. Yanada M, Takeuchi J, Sugiura I, *et al.* High Complete Remission Rate and Promising Outcome by Combination of Imatinib and Chemotherapy for Newly Diagnosed BCR-ABL⁺ Positive Acute Lymphoblastic Leukemia: A Phase II Study by the Japan Adult Leukemia Study Group. *J Clin Onco*. 2006;24:460-466.
199. Joensuu. Treatment of inoperable gastrointestinal stromal tumor (GIST) with Imatinib (Glivec, Gleevec). *Med Klin*. 2002;15:28-30.
200. Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, *et al.* Efficacy and Safety of Imatinib Mesylate in Advanced Gastrointestinal Stromal Tumors. *N Engl J Med*. 2002;347:472-480.
201. Kantarjian HM, Giles F, Gattermann N, *et al.* Nilotinib (formerly AMN107), a highly selective BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor, is effective in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase following imatinib resistance and intolerance. *Blood*. 2007;110:3540-3546.
202. Weisberg E, Manley PW, Breitenstein W, *et al.* Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer Cell*. 2005;7:129-141.
203. O'Hare T, Walters DK, Deininger MW, Druker BJ. AMN101: tightening the grip of imatinib. *Cancer Cell*. 2005;7:117-119.
204. Walz C, Sattler M. Novel targeted therapies to overcome imatinib mesylate resistance in chronic myeloid leukemia (CML). *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2006;57:145-164.
205. Lombardo LJ, Lee FY, Chen P, *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. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2004;47:6658-6661.
206. Khoury HJ, Guilhot F, Hughes TP, Kim D-W, Cortes JE. Dasatinib treatment for Philadelphia chromosome-positive leukemias. *Cancer*. 2009;115:1381-1394.
207. O'Hare T, Walters DK, Stoffregen EP, *et al.* In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants. *Cancer Res*. 2005;65:4500-4505.
208. Shah NP, Tran C, Lee FY, *et al.* Overriding Imatinib Resistance with a Novel ABL Kinase Inhibitor. *Science*. 2004;305:399-401.
209. Quintas-Cardama A, Kantarjian H, Cortes J. Targeting ABL and SRC kinases in chronic myeloid leukemia: experience with dasatinib. *Future Oncology*. 2006;2:655-665.

210. O'Hare T, Eide CA, Deininger MW. Bcr-Abl kinase domain mutations and the unsettled problem of Bcr-AblT315I: looking into the future of controlling drug resistance in chronic myeloid leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma*. 2007;7 Suppl 3:S120-130.
211. Thomas O'Hare WCS, Xiaotian Zhu, Christopher A. Eide, *et al.*. AP24534, a Pan-BCR-ABL Inhibitor for Chronic Myeloid Leukemia, Potently Inhibits the T315I Mutant and Overcomes Mutation-Based Resistance. *Cancer Cell*. 2009;16:401–412.
212. Zhou T, Commodore L, Huang W-S, *et al.* Structural Mechanism of the Pan-BCR-ABL Inhibitor Ponatinib (AP24534): Lessons for Overcoming Kinase Inhibitor Resistance. *Chemical Biology & Drug Design*. 2011;77:1-11.
213. Cortes J TM, Bixby D, Deininger M, Shah N, Flinn IW, Mauro MJ, O'Hare T, Hu S., Kan R RV, Clarkson T, Haluska F, Kantarjian H. A Phase 1 Trial of Oral Ponatinib (AP24534) In Patients with Refractory Chronic Myelogenous Leukemia (CML) and Other Hematologic Malignancies: Emerging Safety and Clinical Response Findings. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2010;116.
214. Eiring A, Khorashad J, Morley K, Deininger M. Advances in the treatment of chronic Myeloid Leukemia. *Biomedical Central*. 2011;9:99.
215. Chan Wayne W, Wise Scott C, Kaufman Michael D, *et al.* Conformational Control Inhibition of the BCR-ABL1 Tyrosine Kinase, Including the Gatekeeper T315I Mutant, by the Switch-Control Inhibitor DCC-2036. *Cancer cell*. 2011;19:556-568.
216. Giles FJ, Cortes J, Jones D, *et al.* MK-0457, a novel kinase inhibitor, is active in patients with chronic myeloid leukemia or acute lymphocytic leukemia with the T315I BCR-ABL mutation. *Blood*. 2007;109:500-502.
217. Gontarewicz A, Balabanov S, Keller G, *et al.* Simultaneous targeting of Aurora kinases and Bcr-Abl kinase by the small molecule inhibitor PHA-739358 is effective against imatinib-resistant BCR-ABL mutations including T315I. *Blood*. 2008;111:4355-4364.
218. Adrian FJ, Ding Q, Sim T, *et al.* Allosteric inhibitors of Bcr-abl-dependent cell proliferation. *Nat Chem Biol*. 2006;2:95-102.
219. Zhang J, Adrian FJ, Jahnke W, *et al.* Targeting Bcr-Abl by combining allosteric with ATP-binding-site inhibitors. *Nature*. 2010;463:501-506.
220. Amr R Ibrahim LE, Jane F Apperley, Dragana Milojkovic, Marco Bua, Richard Szydlo, Francois-Xavier Mahon, Kasia Kozlowsk, Christos Paliompeis, Letizia Foroni, Jamshid S Khorashad, Alex Bazeos, Mathieu Molimard, Alistair Reid, Katayoun Rezvani, Gareth Gerrard, John Goldman, and David Marin Poor adherence is the main reason for loss of CCyR and imatinib failure for CML patients on long term therapy. *Blood*. 2011;116:3414.

221. Apperley JF. Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol* 2007;8:1018-1029.
222. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, *et al.* Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science*. 2001;293:876-880.
223. Weisberg E, Griffin JD. Resistance to imatinib (Glivec): update on clinical mechanisms. *Drug Resistance Updates*. 2003;6:231-238.
224. Barthe C, Cony-Makhoul P, Melo JV, Mahon JR Fo-X. Roots of Clinical Resistance to STI-571 Cancer Therapy. Vol. 293; 2001:2163.
225. Azam M, Latek RR, Daley GQ. Mechanisms of Autoinhibition and STI-571/Imatinib Resistance Revealed by Mutagenesis of BCR-ABL. *Cell*. 2003;112:831-843.
226. Preudhomme C CJ, Chomel JC, *et al.* . Recommandations du groupe FI-LMC pour la prise en charge des patients présentant des mutations du domaine tyrosine kinase de BCR-ABL dans les hémopathies malignes à chromosome Philadelphie. *Hématologie*. 2010;16:65-79.
227. Santos FPS, Ravandi F. Advances in treatment of chronic myelogenous leukemia : new treatment options with tyrosine kinase inhibitors. *Leukemia and Lymphoma*. 2009;50:16-26.
228. Mahon FX, Deininger MW, Schultheis B, *et al.* Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood*. 2000;96:1070-1079.
229. le Coutre P, Tassi E, Varella-Garcia M, *et al.* Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification. *Blood*. 2000;95:1758-1766.
230. Campbell LJ, Patsouris C, Rayeroux KC, *et al.* BCR/ABL amplification in chronic myelocytic leukemia blast crisis following imatinib mesylate administration. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2002;139:30-33.
231. Morel F, Bris M-JL, Herry A, *et al.* Double minutes containing amplified bcr-abl fusion gene in a case of chronic myeloid leukemia treated by imatinib. *European Journal of Haematology*. 2003;70:235-239.
232. Gambacorti-Passerini C, le Coutre P, Mologni L, *et al.* Inhibition of the ABL Kinase Activity Blocks the Proliferation of BCR/ABL+Leukemic Cells and Induces Apoptosis. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 1997;23:380-394.
233. Yamada O, Ozaki K, Furukawa T, *et al.* Activation of STAT5 confers imatinib resistance on leukemic cells through the transcription of TERT and MDR1. *Cellular Signalling*;23:1119-1127.
234. Galimberti S, Cervetti G, Guerrini F, *et al.* Quantitative molecular monitoring of BCR-ABL and MDR1 transcripts in patients with chronic myeloid leukemia during Imatinib treatment. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2005;162:57-62.

235. Mahon FX, Belloc F, Lagarde V, *et al.* MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood*. 2003;101:2368-2373.
236. Thomas J, Wang L, Clark RE, Pirmohamed M. Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. *Blood*. 2004;104:3739-3745.
237. Sacha T CS, Foryciarz K, Zawada M, Florek I, Cwynar D, Wator G, Balwierz W, Skotnicki AB. h-OCT1 gene expression as a predictor of major and complete molecular response to imatinib of chronic myeloid leukemia. *Przegl Lek* 2011;68:1911-1195.
238. White DL, Saunders VA, Dang P, *et al.* Most CML patients who have a suboptimal response to imatinib have low OCT-1 activity: higher doses of imatinib may overcome the negative impact of low OCT-1 activity. *Blood*. 2007;110:4064-4072.
239. Gambacorti-Passerini C, Barni R, le Coutre P, *et al.* Role of alpha1 acid glycoprotein in the in vivo resistance of human BCR-ABL(+) leukemic cells to the abl inhibitor STI571. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92:1641-1650.
240. Hirayama C, Watanabe H, Nakashima R, *et al.* Constitutive Overexpression of P-glycoprotein, Rather than Breast Cancer Resistance Protein or Organic Cation Transporter 1, Contributes to Acquisition of Imatinib-Resistance in K562 Cells. *Pharmaceutical Research*. 2008;25:827-835.
241. Larghero J, Leguay T, Mourah S, *et al.* Relationship between elevated levels of the alpha 1 acid glycoprotein in chronic myelogenous leukemia in blast crisis and pharmacological resistance to imatinib (Gleevec(R)) in vitro and in vivo. *Biochemical Pharmacology*. 2003;66:1907-1913.
242. Gambacorti-Passerini C, Zucchetti M, Russo D, *et al.* alpha Acid Glycoprotein Binds to Imatinib (STI571) and Substantially Alters Its Pharmacokinetics in Chronic Myeloid Leukemia Patients. *Clin Cancer Res*. 2003;9:625-632.
243. Donato NJ, Wu JY, Stapley J, *et al.* BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571. *Blood*. 2003;101:690-698.
244. Dai Y, Rahmani M, Corey SJ, Dent P, Grant S. A Bcr/Abl-independent, Lyn-dependent Form of Imatinib Mesylate (STI-571) Resistance Is Associated with Altered Expression of Bcl-2. *J Biol Chem*. 2004;279:34227-34239.
245. Grosso Sb, Puissant A, Dufies M, *et al.* Gene expression profiling of imatinib and PD166326-resistant CML cell lines identifies Fyn as a gene associated with resistance to BCR-ABL inhibitors. *Mol Cancer Ther*. 2009;8:1924-1933.
246. Mahon F-X, Hayette S, Lagarde V, *et al.* Evidence that Resistance to Nilotinib May Be Due to BCR-ABL, Pgp, or Src Kinase Overexpression. *Cancer Res*. 2008;68:9809-9816.

247. Ptasznik A, Nakata Y, Kalota A, Emerson SG, Gewirtz AM. Short interfering RNA (siRNA) targeting the Lyn kinase induces apoptosis in primary, and drug-resistant, BCR-ABL1(+) leukemia cells. *Nat Med*. 2004;10:1187-1189.
248. Gioia R, Leroy C, Drullion C, *et al*. Quantitative phosphoproteomics revealed interplay between Syk and Lyn in the resistance to nilotinib in chronic myeloid leukemia cells. *Blood*. 2011;118:2211-2221.
249. Pocaly M, Lagarde V, Etienne G, *et al*. Proteomic analysis of an imatinib-resistant K562 cell line highlights opposing roles of heat shock cognate 70 and heat shock 70 proteins in resistance. *Proteomics*. 2008;8:2394-2406.
250. Sreedhar AS, Csermely P. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy: A comprehensive review. *Pharmacology & Therapeutics*. 2004;101:227-257.
251. Powers MV, Jones K, Barillari C, *et al*. Targeting HSP70: The second potentially druggable heat shock protein and molecular chaperone? *Cell Cycle*. 2010;9:1542-1550.
252. Leu JIJ, Pimkina J, Frank A, Murphy ME, George DL. A Small Molecule Inhibitor of Inducible Heat Shock Protein 70. *Molecular Cell*. 2009;36:15-27.
253. Massey A, Williamson D, Browne H, *et al*. A novel, small molecule inhibitor of Hsc70/Hsp70 potentiates Hsp90 inhibitor induced apoptosis in HCT116 colon carcinoma cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*;66:535-545.
254. Guo F, Rocha K, Bali P, *et al*. Abrogation of Heat Shock Protein 70 Induction as a Strategy to Increase Antileukemia Activity of Heat Shock Protein 90 Inhibitor 17-Allylamino-Demethoxy Geldanamycin. *Cancer Res*. 2005;65:10536-10544.
255. Chakraborty PK, Mustafi SB, Ganguly S, Chatterjee M, Raha S. Resveratrol induces apoptosis in K562 (chronic myelogenous leukemia) cells by targeting a key survival protein, heat shock protein 70. *Cancer Science*. 2008;99:1109-1116.
256. Mahon F-X, Guilhot J, *et al*. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *The Lancet Oncology*. 2010;11:1029-1035.
257. Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, *et al*. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ*. 2005;12 Suppl 2:1463-1467.
258. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, *et al*. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*. 2009;16:3-11.
259. M Enari AH, and S Nagata. Apoptosis by a cytosolic extract from Fas-activated cells. *EMBO J*. 1995;14:5201-5208.

260. Williams VLLaGT. Caspase activity is required for commitment to Fas-mediated apoptosis. *EMBO J* 1997;16:3805–3812.
261. Ashkenazi A, Dixit VM. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Current Opinion in Cell Biology*. 1999;11:255-260.
262. Schinzel A, Kaufmann T, Borner C. Bcl-2 family members: intracellular targeting, membrane-insertion, and changes in subcellular localization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2004;1644:95-105.
263. Minn AJ, Velez P, Schendel SL, *et al.* Bcl-xL forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature*. 1997;385:353-357.
264. Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, *et al.* Inhibition of Bax Channel-Forming Activity by Bcl-2. *Science Mag*. 1997;277:370-372.
265. Schlesinger PH, Gross A, Yin X-M, *et al.* Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *PNAS*. 1997;94:11357-11362.
266. Antignani A, Youle RJ. How do Bax and Bak lead to permeabilization of the outer mitochondrial membrane? *Current Opinion in Cell Biology*. 2006;18:685-689.
267. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:647-656.
268. Labi V, Erlacher M, Kiessling S, Villunger A. BH3-only proteins in cell death initiation, malignant disease and anticancer therapy. *Cell Death Differ*. 2006;13:1325-1338.
269. Belloc F, Moreau-Gaudry Fo, Uhalde M, *et al.* Imatinib and Nilotinib induce apoptosis of chronic myeloid leukemia cells through a Bim-dependant pathway modulated by cytokines. *Cancer Biology & Therapy*. 2007;6:912-919.
270. Brenner D, Mak TW. Mitochondrial cell death effectors. *Current Opinion in Cell Biology*. 2009;21:871-877.
271. Sanchez-Garcia I, Gratz G. Tumorigenic activity of the BCR-ABL oncogenes is mediated by BCL2. *PNAS*. 1995;92:5287-5291.
272. Gonzalez MS, De Brasi CD, Bianchini M, *et al.* BAX/BCL-XL gene expression ratio inversely correlates with disease progression in chronic myeloid leukemia. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2010;45:192-196.
273. Zamzami N MP, Castedo M, Decaudin D, Macho A, Hirsch T. *et al.* Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med*. 1995;182:367–377.

274. Van Gurp M, Festjens N, van Loo G, Saelens X, Vandenabeele P. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003;304:487-497.
275. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Phy Rev Physiology*. 2007;87:99-163.
276. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, *et al.* Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. *Cell*. 1997;91:479-489.
277. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of Apoptotic Program in Cell-Free Extracts: Requirement for dATP and Cytochrome c. *Cell*. 1996;86:147-157.
278. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, *et al.* Identification of DIABLO, a Mammalian Protein that Promotes Apoptosis by Binding to and Antagonizing IAP Proteins. *Cell*. 2000;102:43-53.
279. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a Mitochondrial Protein that Promotes Cytochrome c-Dependent Caspase Activation by Eliminating IAP Inhibition. *Cell*. 2000;102:33-42.
280. Suzuki Y IY, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell*. 2001;8:613-621.
281. Verhagen AM, Silke J, Ekert PG, *et al.* HtrA2 Promotes Cell Death through Its Serine Protease Activity and Its Ability to Antagonize Inhibitor of Apoptosis Proteins. *Jour Biol Chem*. 2002;277:445-454.
282. Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene*;22:8543-8567.
283. Salvesen. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J* 2004;384:201-232.
284. Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *The Journal of Clinical Investigation*. 2005;115:2665-2672.
285. Thornberry NA. Caspases: key mediators of apoptosis. *Chemistry & Biology*. 1998;5:R97-R103.
286. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: Enemies Within. *Science* 1998;281:1312-1316.
287. Levkau B, Koyama H, Raines EW, *et al.* Cleavage of p21Cip1/Waf1 and p27Kip1 Mediates Apoptosis in Endothelial Cells through Activation of Cdk2: Role of a Caspase Cascade. *Molecular Cell*. 1998;1:553-563.
288. Donato NJ, Perez M. Tumor Necrosis Factor-induced Apoptosis Stimulates p53 Accumulation and p21WAF1 Proteolysis in ME-180 Cells. *Jour Biol Chem*. 1998;273:5067-5072.
289. Yongke Zhang NFaTT. Caspase-mediated cleavage of p21Waf1/Cip1 converts cancer cells from growth arrest to undergoing apoptosis. *Oncogene*. 1999;18:1131-1138.

290. Widmann C, Gibson S, Johnson GL. Caspase-dependent Cleavage of Signaling Proteins during Apoptosis. *Jour Biol Chem.* 1998;273:7141-7147.
291. Luthi AU, Martin SJ. The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ.* 2007;14:641-650.
292. Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, *et al.* Two Distinct Pathways Leading to Nuclear Apoptosis. *J exp Med.* 2000;192:571-580.
293. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature.* 2001;412:95-99.
294. Van Loo G SP, van Gurp M, Demol H, Hoorelbeke B, *et al.* Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ.* 2001;8:1136-1142.
295. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, *et al.* Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature.* 1992;356:215-221.
296. Melino G, Bernassola F, Ranalli M, *et al.* p73 Induces Apoptosis via PUMA Transactivation and Bax Mitochondrial Translocation. *Jour Biol Chem.* 2004;279:8076-8083.
297. Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis.* 2000;21:485-495.
298. Paradis E, Douillard Hln, Koutroumanis M, Goodyer C, LeBlanc Aa. Amyloid alpha Peptide of Alzheimer's Disease Downregulates Bcl-2 and Upregulates Bax Expression in Human Neurons. *J Neurosci Res.* 1996;16:7533-7539.
299. Sanjay WP. *AbetaPP*, Apoptosis and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease.* 2002;4:39-40.
300. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* 1995;267:1456-1462.
301. Walker NI HB, Gobé GC, Kerr JF. Patterns of cell death. *Methods Achiev Exp Pathol.* 1988;13:18-54.
302. Berghe TV, Vanlangenakker N, Parthoens E, *et al.* Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell Death Differ.* 2010;17:922-930.
303. Silva M, do Vale A, dos Santos N. Secondary necrosis in multicellular animals: an outcome of apoptosis with pathogenic implications. *Apoptosis.* 2008;13:463-482.
304. Vercammen D, Brouckaert G, Denecker G, *et al.* Dual Signaling of the Fas Receptor: Initiation of Both Apoptotic and Necrotic Cell Death Pathways. *J Exp Med.* 1998;188:919-930.
305. Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics;*1757:1371-1387.

306. Devin A, Cook A, Lin Y, *et al.* The Distinct Roles of TRAF2 and RIP in IKK Activation by TNF-R1: TRAF2 Recruits IKK to TNF-R1 while RIP Mediates IKK Activation. *Immunity*. 2000;12:419-429.
307. Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, *et al.* Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature*. 2005;434:652-658.
308. Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, *et al.* Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature*. 2005;434:658-662.
309. Schinzel AC, Takeuchi O, Huang Z, *et al.* Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *PNAS*. 2005;102:12005-12010.
310. Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences*. 2007;32:37-43.
311. Okada H, Mak TW. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:592-603.
312. L.Hayflick. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1965;37:614-636.
313. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*. 1990;345:458-460.
314. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*. 1997;88:593-602.
315. Braig M, Lee S, Loddenkemper C, *et al.* Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature*. 2005;436:660-665.
316. Collado M, Gil J, Efeyan A, *et al.* Tumour biology: Senescence in premalignant tumours. *Nature*. 2005;436:642-642.
317. Michaloglou C, Vredeveld LCW, Soengas MS, *et al.* BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature*. 2005;436:720-724.
318. Courtois-Cox S, Genther Williams SM, Reczek EE, *et al.* A negative feedback signaling network underlies oncogene-induced senescence. *Cancer Cell*. 2006;10:459-472.
319. Sarkisian CJ, Keister BA, Stairs DB, *et al.* Dose-dependent oncogene-induced senescence in vivo and its evasion during mammary tumorigenesis. *Nat Cell Biol*. 2007;9:493-505.
320. Adams PD. Remodeling of chromatin structure in senescent cells and its potential impact on tumor suppression and aging. *Gene*. 2007;397:84-93.

321. Narita M, Nuñez S, Heard E, *et al.* Rb-Mediated Heterochromatin Formation and Silencing of E2F Target Genes during Cellular Senescence. *Cell*. 2003;113:703-716.
322. Kocylowski MK, Halazonetis TD. SAHF, to senesce or not to senesce? *Cell Cycle*. 2011;10:741-740.
323. Banin S, Moyal L, Shieh SY, *et al.* Enhanced Phosphorylation of p53 by ATM in Response to DNA Damage. *Science*. 1998;281:1674-1677.
324. Hara E, Smith R, Parry D, *et al.* Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol and Cell Biol*. 1996;16:859-867.
325. Alcorta D, Xiong Y, Phelps D, *et al.* Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *PNAS*. 1996;93:13742-13747.
326. Goberdhan P D. What has senescence got to do with cancer? *Cancer Cell*. 2005;7:505-512.
327. Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, *et al.* Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature*. 2006;444:638-642.
328. Dolado I, Swat A, Ajenjo N, *et al.* p38[alpha] MAP Kinase as a Sensor of Reactive Oxygen Species in Tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2007;11:191-205.
329. Reinhardt HC, Aslanian AS, Lees JA, Yaffe MB. p53-Deficient Cells Rely on ATM- and ATR-Mediated Checkpoint Signaling through the p38MAPK/MK2 Pathway for Survival after DNA Damage. *Cancer Cell*. 2007;11:175-189.
330. Rai P, Young JJ, Burton DGA, *et al.* Enhanced elimination of oxidized guanine nucleotides inhibits oncogenic RAS-induced DNA damage and premature senescence. *Oncogene*. 2011;30:1489-1496.
331. Mallette FA, Gaumont-Leclerc M-F, Ferbeyre G. The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *GenesDev*. 2007;21:43-48.
332. Sun P, Yoshizuka N, New L, *et al.* PRAK Is Essential for ras-Induced Senescence and Tumor Suppression. *Cell*. 2007;128:295-308.
333. Ray S, Atkuri KR, Deb-Basu D, *et al.* MYC Can Induce DNA Breaks In vivo and In vitro Independent of Reactive Oxygen Species. *Cancer Res*. 2006;66:6598-6605.
334. Gabai VL, Yaglom JA, Waldman T, Sherman MY. Heat Shock Protein Hsp72 Controls Oncogene-Induced Senescence Pathways in Cancer Cells. *Mol Cell Biol*. 2009;29:559-569.
335. Sherman M. Major heat shock protein Hsp72 controls oncogene-induced senescence. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010;1197:152-157.
336. Di Micco R, Sulli G, Dobrev M, *et al.* Interplay between oncogene-induced DNA damage response and heterochromatin in senescence and cancer. *Nat Cell Biol*. 2007;13:292-302.

337. Zhang R, Chen W, Adams PD. Molecular Dissection of Formation of Senescence-Associated Heterochromatin Foci. *Mol and Cell Biol.* 2007;27:2343-2358.
338. Dimri GP, Lee X, Basile G, *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *PNAS.* 1995;92:9363-9367.
339. Kuilman T, Peeper DS. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nat Rev Cancer.* 2009;9:81-94.
340. Orjalo AV, Bhaumik D, Gengler BK, Scott GK, Campisi J. Cell surface-bound IL-1alpha is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network. *PNAS.* 2009;106:17031-17036.
341. Rodier F, Coppe J-P, Patil CK, *et al.* Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol.* 2009;11:973-979.
342. Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Oncogene-induced senescence: the bright and dark side of the response. *Current Opinion in Cell Biology;*22:816-827.
343. Korf B. Hutchinson Gilford Progeria Syndrome, Aging, and the Nuclear Lamina. *N Engl J Med.* 2008;358:552-555.
344. Ding SL, Shen CY. Model of human aging: recent findings on Werner's and Hutchinson-Gilford progeria syndromes. *Clin Interv Aging.* 2008;3:431-444.
345. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8:729-740.
346. Bischof O DA, Pineau P. A review of cellular senescence: friend or foe of tumorigenesis? *Med Sci (Paris).* 2009;25:153-160.
347. Gaumont-Leclerc M-F, Ferbeyre G. Les cytokines previennent les tumeurs via un mecanisme de senescence cellulaire. *Med Sci.* 2009;25:138-140.
348. Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez P-Y, Campisi J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: A link between cancer and aging. *PNAS.* 2001;98:12072-12077.
349. Parrinello S, Coppe J-P, Krtolica A, Campisi J. Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *Jour. Cell. Science.* 2005;118:485-496.
350. Badache A, Hynes NE. Interleukin 6 Inhibits Proliferation and, in Cooperation with an Epidermal Growth Factor Receptor Autocrine Loop, Increases Migration of T47D Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* 2001;61:383-391.
351. Yuan J, Kroemer G. Alternative cell death mechanisms in development and beyond. *GenesDev.* 2005;24:2592-2602.

352. Ohsumi Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2:211-216.
353. Cuervo AM, Dice JF. Age-related Decline in Chaperone-mediated Autophagy. *Jour Biol Chem.* 2000;275:31505-31513.
354. JF.Dice. Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem Sci* 1990;15:305-309.
355. Ana Maria C. Chaperone-mediated autophagy: selectivity pays off. *Trends in Endocrinology & Metabolism.* 2010;21:142-150.
356. Bandyopadhyay U, Kaushik S, Varticovski L, Cuervo AM. The Chaperone-Mediated Autophagy Receptor Organizes in Dynamic Protein Complexes at the Lysosomal Membrane. *Mol and Cell Biol.* 2008;28:5747-5763.
357. Todde V, Veenhuis M, van der Klei IJ. Autophagy: Principles and significance in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease.* 2009;1792:3-13.
358. Ylä-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E, Eskelinen E. 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy.* 2009;5:1180-1185.
359. Hayashi-Nishino M, Fujita N, Noda T, *et al.* A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat Cell Biol.* 2009;11:1433-1437.
360. Hailey DW, Rambold AS, Satpute-Krishnan P, *et al.* Mitochondria Supply Membranes for Autophagosome Biogenesis during Starvation. *Cell*;141:656-667.
361. Kundu M, Lindsten T, Yang C-Y, *et al.* Ulk1 plays a critical role in the autophagic clearance of mitochondria and ribosomes during reticulocyte maturation. *Blood.* 2008;112:1493-1502.
362. Chan EYW, Kir S, Tooze SA. siRNA Screening of the Kinome Identifies ULK1 as a Multidomain Modulator of Autophagy. *Jour Biol Chem.* 2007;282:25464-25474.
363. Chan EY. mTORC1 Phosphorylates the ULK1-mAtg13-FIP200 Autophagy Regulatory Complex. *Science.* 2009;2:pe51-.
364. Mercer CA, Kaliappan A, Dennis PB. A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. *Autophagy.* 2009;5:649-662.
365. Hosokawa N, Sasaki T, Iemura S-i, *et al.* Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13. *Autophagy.* 2009;5:973-979.
366. Itakura E, Mizushima N. p62 targeting to the autophagosome formation site requires self-oligomerization but not LC3 binding. *J Cell Biol.* 2011;192:17-27.
367. Chan EY, Longatti A, McKnight NC, Tooze SA. Kinase-inactivated ULK proteins inhibit autophagy via their conserved C-terminal domains using an Atg13-independent mechanism. *Mol Cell Biol.* 2009;29:157-171.

368. Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, *et al.* Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol.* 2000;150:1507-1513.
369. Kurt Degenhardt RM, Brian Beaudoin, Kevin Bray, Diana Anderson, Guanghua Chen, Chandreyee Mukherjee, Yufang Shi, Céline Gélinas, Yongjun Fan, Deirdre A. Nelson, Shengkan Jin, and Eileen White. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell.* 2006 10:51-64.
370. Liang XH, Jackson S, Seaman M, *et al.* Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature.* 1999;402:672-676.
371. Sinha S, Levine B. The autophagy effector Beclin 1: a novel BH3-only protein. *Oncogene*;27:S137-S148.
372. Furuya N, Yu J, Byfield M, Pattingre S, Levine B. The Evolutionarily Conserved Domain of Beclin 1 is Required for Vps34 Binding, Autophagy, and Tumor Suppressor Function. *Autophagy.* 2005;1:46-52.
373. Burman C, Ktistakis NT. Regulation of autophagy by phosphatidylinositol 3-phosphate. *FEBS Letters.* 2010;584:1302-1312.
374. Erlich S, Mizrachy L, Segev O, *et al.* Differential Interactions Between Beclin 1 and Bcl-2 Family Members. *Autophagy.* 2007;3:561-568.
375. Kuma A, Mizushima N, Ishihara N, Ohsumi Y. Formation of the 350-kDa Apg12-Apg5-Apg16 Multimeric Complex, Mediated by Apg16 Oligomerization, Is Essential for Autophagy in Yeast. *Jour Biol Chem.* 2002;277:18619-18625.
376. Maximiliano G. Gutierrez DBM, Walter Berón and María I. Colombo. Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells. *Jour Cell Science.* 2004;117:2687-2697.
377. Jager S, Bucci C, Tanida I, *et al.* Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *Jour Cell Science.* 2004;117:4837-4848.
378. Eskelinen E-L, Saftig P. Autophagy: A lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* 2009;1793:664-673.
379. Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, *et al.* Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol.* 2004;6:1221-1228.
380. Akar U, Chaves-Reyez A, Barria M, *et al.* Silencing of Bcl-2 expression by small interfering RNA induces autophagic cell death in MCF-7 breast cancer cells. *Autophagy.* 2008;4:669-679.
381. Puissant A, Auberger P. AMPK- and p62/SQSTM1-dependent autophagy mediate Resveratrol-induced cell death in chronic myelogenous leukemia. *Autophagy.* 2010;6:655-657.

382. Elgendy M, Sheridan C, Brumatti G, Martin Seamus J. Oncogenic Ras-Induced Expression of Noxa and Beclin-1 Promotes Autophagic Cell Death and Limits Clonogenic Survival. *Molecular Cell*. 2011;42:23-35.
383. Cheung ZH, Ip NY. Autophagy deregulation in neurodegenerative diseases – recent advances and future perspectives. *Journal of Neurochemistry*. 2011;118:317-325.
384. Chen Z-H, Kim HP, Sciarba FC, *et al*. Egr-1 Regulates Autophagy in Cigarette Smoke-Induced Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *PLoS ONE*. 2008;3:e3316.
385. Rosenfeldt MT, Ryan KM. The multiple roles of autophagy in cancer. *Carcinogenesis*. 2011;32:955-963.
386. Watson AS, Mortensen M, Simon AK. Autophagy in the pathogenesis of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2011;10:1719-1725.
387. Boya P, Kroemer G. Beclin 1: a BH3-only protein that fails to induce apoptosis. *Oncogene*. 2009.
388. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:741-752.
389. Pattingre S, Bauvy C, Carpentier S, *et al*. Role of JNK1-dependent Bcl-2 phosphorylation in ceramide-induced macroautophagy. *J Biol Chem*. 2008.
390. Djavaheri-Mergny M, Maiuri MC, Kroemer G. Cross talk between apoptosis and autophagy by caspase-mediated cleavage of Beclin 1. *Oncogene*. 2010;29:1717-1719.
391. Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, *et al*. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol*. 2006;8:1124-1132.
392. Yousefi S, Simon H-U. Apoptosis regulation by autophagy gene 5. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2007;63:241-244.
393. Luo S, Rubinsztein DC. Atg5 and Bcl-2 provide novel insights into the interplay between apoptosis and autophagy. *Cell Death Differ*. 2007;14:1247-1250.
394. Swerdlow S, Distelhorst CW. Bcl-2-Regulated Calcium Signals as Common Mediators of Both Apoptosis and Autophagy. *Developmental Cell*. 2007;12:178-179.
395. Codogno P, Meijer AJ. Atg5: more than an autophagy factor. *Nat Cell Biol*. 2006;8:1045-1047.
396. Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, *et al*. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*. 2008;4:151-175.
397. Zheng EBDC, Sovan Sarkar, Marie Futter, David C. Rubinsztein, and Scott O. Zeitlin. Deletion of the Huntingtin Polyglutamine Stretch Enhances Neuronal Autophagy and Longevity in Mice. *Plos Gen*. 2010;6.

398. Young ARJ, Narita M, Ferreira M, *et al.* Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev.* 2009;23:798-803.
399. Kang HT, Lee KB, Kim SY, Choi HR, Park SC. Autophagy Impairment Induces Premature Senescence in Primary Human Fibroblasts. *PLoS ONE.* 2011;6:e23367.
400. Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, *et al.* Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature.* 2009;460:392-395.
401. Kuroda J, Puthalakath H, Cragg MS, *et al.* Bim and Bad mediate imatinib-induced killing of Bcr/Abl+ leukemic cells, and resistance due to their loss is overcome by a BH3 mimetic. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:14907-14912.
402. Okada M, Adachi S, Imai T, *et al.* A novel mechanism for imatinib mesylate-induced cell death of BCR-ABL-positive human leukemic cells: caspase-independent, necrosis-like programmed cell death mediated by serine protease activity. *Blood.* 2004;103:2299-2307.
403. Kamitsuji Y, Kuroda J, Kimura S, *et al.* The Bcr-Abl kinase inhibitor INNO-406 induces autophagy and different modes of cell death execution in Bcr-Abl-positive leukemias. *Cell Death Differ.* 2008;15:1712-1722.
404. Bellodi C, Lidonnici MR, Hamilton A, *et al.* Targeting autophagy potentiates tyrosine kinase inhibitor induced cell death in Philadelphia chromosome-positive cells, including primary CML stem cells. *The Journal of Clinical Investigation.* 2009;119:1109-1123.
405. Milano V, Piao Y, LaFortune T, de Groot J. Dasatinib-induced autophagy is enhanced in combination with temozolomide in glioma. *Mol Cancer Ther.* 2009;8:394-406.
406. Kroemer G, Jaattela M. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer.* 2005;5:886-897.
407. Puissant A, Colosetti P, Robert G, *et al.* Cathepsin B release after imatinib-mediated lysosomal membrane permeabilization triggers BCR-ABL cleavage and elimination of chronic myelogenous leukemia cells. *Leukemia.* 2009;24:115-124.
408. Salomoni P, Calabretta B. Targeted therapies and autophagy: new insights from chronic myeloid leukemia. *Autophagy.* 2009;5:1050-1051.
409. Podtcheko A, Ohtsuru A, Namba H, *et al.* Inhibition of ABL tyrosine kinase potentiates radiation-induced terminal growth arrest in anaplastic thyroid cancer cells. *Radiat Res.* 2006;165:35-42.
410. Xia H-G, Zhang L, Chen G, *et al.* Control of basal autophagy by calpain1 mediated cleavage of ATG5. *Autophagy.* 2010;6:61-66.
411. Demarchi F, Cataldo F, Bertoli C, Schneider C. DNA damage response links calpain to cellular senescence. *Cell Cycle.* 2010;9:755-760.

412. Cipriano R, Kan CE, Graham J, *et al.* TGF-beta signaling engages an ATM-CHK2-p53-independent RAS-induced senescence and prevents malignant transformation in human mammary epithelial cells. *PNAS*. 2010;108:8668-8673.
413. Young ARJ, Narita M. Connecting autophagy to senescence in pathophysiology. *Current Opinion in Cell Biology*. 2011;22:234-240.
414. Frank TE BaDA. The Role of STATs in Apoptosis. *Current Molecular Medicine* 2002;2:381-392.
415. Rowland BD, Peeper DS. KLF4, p21 and context-dependent opposing forces in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:11-23.
416. Bai Y-Q, Miyake S, Iwai T, Yuasa Y. CDX2, a homeobox transcription factor, upregulates transcription of the p21/WAF1/CIP1 gene. *Oncogene*. 2003;22:7942-7949.
417. Nankivell BJ, M. D. Wavamunno, R. J. Borrow, M. Vitalone, C. L. Fung, R. D. Allen JRC, and P. J. O'Connell. . Mycophenolate mofetil is associated with altered expression of chronic renal transplant histology. *Am J Transplant* 2007;7:366-376.
418. Tressler RJ, L. J. Garvin, and D. L. Slate. . Anti-tumor activity of mycophenolate mofetil against human and mouse tumors in vivo. . *Int J Cancer*. 1994;57:568-573.
419. Takebe N, Cheng X, Fandy TE, *et al.* IMP dehydrogenase inhibitor mycophenolate mofetil induces caspase-dependent apoptosis and cell cycle inhibition in multiple myeloma cells. *Mol Cancer Ther*. 2006;5:457-466.
420. Chaigne-Delalande B, Guidicelli G, Couzi L, *et al.* The Immunosuppressor Mycophenolic Acid Kills Activated Lymphocytes by Inducing a Nonclassical Actin-Dependent Necrotic Signal. *Jour of Immunol*. 2008;181:7630-7638.
421. Gu JJ, Santiago L, Mitchell BS. Synergy between imatinib and mycophenolic acid in inducing apoptosis in cell lines expressing Bcr-Abl. *Blood*. 2005;105:3270-3277.
422. Abraham MC, Shaham S. Death without caspases, caspases without death. *Trends in Cell Biology*. 2004;14:184-193.
423. Mathiasen IS, Jaattela M. Triggering caspase-independent cell death to combat cancer. *Trends in Molecular Medicine*. 2002;8:212-220.
424. Efeyan A, Murga M, Martinez-Pastor B, *et al.* Limited Role of Murine ATM in Oncogene-Induced Senescence and p53-Dependent Tumor Suppression. *PLoS ONE*. 2009;4:e5475.
425. Iwasaki R, Ito K, Ishida T, *et al.* Catechin, green tea component, causes caspase-independent necrosis-like cell death in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Science*. 2009;100:349-356.

426. Tait SWG, Green DR. Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut. *Oncogene*. 2008;27:6452-6461.
427. Rebbaa A, Zheng X, Chou PM, Mirkin BL. Caspase inhibition switches doxorubicin-induced apoptosis to senescence. *Oncogene*. 2003;22:2805-2811.
428. Squier MK MA, Malkinson AM, Cohen JJ. Calpain activation in apoptosis. *J Cell Physiol* 1994;159:229-237.
429. Ralph A N. The calpains in aging and aging-related diseases. *Ageing Research Reviews*. 2003;2:407-418.
430. Nelyudova A, Aksenov ND, Pospelov V, Pospelova T. By Blocking Apoptosis, Bcl-2 in p38-Dependent Manner Promotes Cell Cycle Arrest and Accelerated Senescence After DNA Damage and Serum Withdrawal. *Cell Cycle*. 2007;6:2171-2177.
431. Sheng Z, Ma L, Sun JE, Zhu LJ, Green MR. BCR-ABL suppresses autophagy through ATF5-mediated regulation of mTOR transcription. *Blood*. 2011.
432. Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon H-U, Kimchi A. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death and Differentiation*. 2009;16:966-975.
433. Vicencio JM, Galluzzi L, Tajeddine N, *et al.* Senescence, Apoptosis or Autophagy? *Gerontology*. 2008;54:92-99.
434. Balzarini J, Karlsson A, Wang L, *et al.* Eicar (5-ethynyl-1-beta-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide). A novel potent inhibitor of inosinate dehydrogenase activity and guanylate biosynthesis. *Jour Biol Chem*. 1993;268:24591-24598.
435. Jain J, Almquist SJ, Shlyakhter D, Harding MW. VX-497: A novel, selective IMPDH inhibitor and immunosuppressive agent. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2001;90:625-637.
436. Allison AC, Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology*. 2000;47:85-118.
437. Chang B-D, Broude EV, Dokmanovic M, *et al.* A Senescence-like Phenotype Distinguishes Tumor Cells That Undergo Terminal Proliferation Arrest after Exposure to Anticancer Agents. *Cancer Res*. 1999;59:3761-3767.
438. Hayward RL, Macpherson JS, Cummings J, *et al.* Antisense Bcl-xl Down-Regulation Switches the Response to Topoisomerase I Inhibition from Senescence to Apoptosis in Colorectal Cancer Cells, Enhancing Global Cytotoxicity. *Clin Cancer Res*. 2003;9:2856-2865.
439. Roninson IB. Tumor Cell Senescence in Cancer Treatment. *Cancer Res*. 2003;63:2705-2715.
440. Collado M, Serrano M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer*. 2005;10:51-57.

441. Steven R. Schwarze VXF, Joshua A. Desotelle , Michelle L. Kenowski and David F. Jarrard. The Identification of Senescence-Specific Genes during the Induction of Senescence in Prostate Cancer Cells. *Neoplasia*. 2005;7:816-823.
442. Fearon ER VB. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61:759-767.
443. Lin H-K, Chen Z, Wang G, *et al*. Skp2 targeting suppresses tumorigenesis by Arf-p53-independent cellular senescence. *Nature*. 2010;464:374-379.
444. Coppe J-P, Patil CK, Rodier F, *et al*. Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *PLoS Biol*. 2008;6:e301.
445. Chang B-D, Swift ME, Shen M, *et al*. Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent. *PNAS*. 2002;99:389-394.
446. Guan FL-J-L. FIP200, an essential component of mammalian autophagy is indispensable for fetal hematopoiesis. *Autophagic Punctum*. 2011;7:229-230.
447. Mortensen M, Watson AS, Simon AK. Lack of autophagy in the hematopoietic system leads to loss of hematopoietic stem cell function and dysregulated myeloid proliferation. *Autophagy*. 2011;7:1069-1070.
448. Carrano AC, Eytan E, Hershko A, Pagano M. SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol*. 1999;1:193-199.
449. Tsvetkov LM, Yeh K-H, Lee S-J, Sun H, Zhang H. p27Kip1 ubiquitination and degradation is regulated by the SCFSkp2 complex through phosphorylated Thr187 in p27. *Current Biology*. 1999;9:661-S662.
450. Wang J, Han F, Wu J, *et al*. The role of Skp2 in hematopoietic stem cell quiescence, pool size and self-renewal. *Blood*. 2011.

ANNEXES

I. Annexe 1

Article : Quantitative phosphoproteomics revealed interplay between Syk and Lyn in the resistance to nilotinib in chronic myeloid leukemia cells. Gioia R, Leroy C, Drullion C, Lagarde V, Etienne G, Dulucq S, Lippert E, Roche S, Mahon FX, Pasquet JM. Blood. 2011. Aug 25;118(8):2211-21.

II. Annexe 2

Article soumis et en préparation

Communications orales et posters

=====

Quantitative phosphoproteomics revealed interplay between Syk and Lyn in the resistance to nilotinib in chronic myeloid leukemia cells

Romain Gioia,¹ Cédric Leroy,² Claire Drullion,¹ Valérie Lagarde,¹ Gabriel Etienne,¹ Stéphanie Dulucq,¹ Eric Lippert,¹ Serge Roche,² François-Xavier Mahon,¹ and Jean-Max Pasquet¹

¹Hématopoïèse Leucémique et Cible Thérapeutique, Inserm U1035, Université Victor Ségalen, Bordeaux, France; and ²Centre National de la Recherche Scientifique UMR5237, Centre de Recherche de Biochimie Macromoléculaire, Montpellier, France

In this study, we have addressed how Lyn kinase signaling mediates nilotinib-resistance by quantitative phosphoproteomics using Stable Isotope Labeling with Amino acid in Cell culture. We have found an increased tyrosine phosphorylation of 2 additional tyrosine kinases in nilotinib-resistant cells: the spleen tyrosine kinase Syk and the UFO family receptor tyrosine kinase Axl. This increased tyrosine phosphorylation involved an interaction of these tyrosine

kinases with Lyn. Inhibition of Syk by the inhibitors R406 or BAY 61-3606 or by RNA interference restored the capacity of nilotinib to inhibit cell proliferation. Conversely, coexpression of Lyn and Syk were required to fully induce resistance to nilotinib in drug-sensitive cells. Surprisingly, the knockdown of Syk also strongly decreased tyrosine phosphorylation of Lyn and Axl, thus uncovering interplay between Syk and Lyn. We have shown the involvement of the adaptor protein

CDCP-1 in resistance to nilotinib. Interestingly, the expression of Axl and CDCP1 were found increased both in a nilotinib-resistant cell line and in nilotinib-resistant CML patients. We conclude that an oncogenic signaling mediated by Lyn and Syk can bypass the need of Bcr-Abl in CML cells. Thus, targeting these kinases may be of therapeutic value to override imatinib or nilotinib resistance in CML. (*Blood*. 2011;118(8):2211-2221)

Introduction

Chronic myeloid leukemia (CML) is characterized by the presence of the Philadelphia (Ph) chromosome that results from a t(9;22)(q34;q11) reciprocal translocation.^{1,2} Twenty-five percent of acute lymphoblastic leukemias (ALL) in adults are also characterized by this translocation. The Ph chromosome contains a BCR-ABL hybrid gene, the molecular hallmark of CML.³ BCR-ABL encodes an oncogenic fusion protein of 190, 210 or 230 kDa, depending on the breakpoint on the BCR gene. The unifying feature of all these Bcr-Abl fusion proteins is their deregulated protein tyrosine kinase activity that is responsible for leukemogenesis in vitro and in vivo.^{4,5} Targeting the tyrosine kinase activity of Bcr-Abl is an attractive therapeutic strategy in CML or in Bcr-Abl positive ALL that has recently found success with the development of new drugs such as tyrosine kinase inhibitors (TKI). Imatinib, a Bcr-Abl TKI that competes with ATP for binding to the Abl kinase domain, is now the front-line therapy of CML in chronic phase. However, imatinib resistance is now a well-recognized problem, particularly in the advanced phase of the disease. One of the well known mechanisms of resistance in CML patients is mutations in the Bcr-Abl tyrosine kinase domain. Nilotinib and dasatinib, the second-generation tyrosine kinase inhibitors, have been developed to override this phenomenon,^{6,7} however in vitro and in vivo resistance to these 2 TKI is also observed.

We have previously generated and characterized nilotinib-resistant cells from different Ph-positive cell lines (K562, AR230, and LAMA84) showing that, in addition to Bcr-Abl and/or multidrug resistance P-glycoprotein (Pgp) overexpression, the up-regulated expression of the Src family kinase p53/56 Lyn

defines an additional mechanism of cell resistance to nilotinib.⁸ However the mechanism by which Lyn induces this cellular process is still not known. In an attempt to identify downstream effectors of Lyn involved in the resistance to nilotinib, a quantitative phosphoproteomic analysis was performed using nilotinib-sensitive and resistant cells by Stable Isotope Labeling with Amino acid in Cell culture (SILAC). This approach allowed the identification of 2 additional protein tyrosine kinases involved in this biologic process: Syk and Axl. Moreover, we have identified interplay between Syk and Lyn in the signaling process leading to tyrosine phosphorylation of Axl and the adaptor CDCP-1 and eventually to resistance to nilotinib. The results uncovered a new role for Syk and Axl in TKI resistance that could be of therapeutic value in the treatment of CML resistant to imatinib or nilotinib.

Methods

Reagents

RPMI 1640 medium, FCS, PBS, trypan blue and antibiotics were purchased from Invitrogen. Imatinib and nilotinib were kindly provided by Novartis Pharma. MTS was purchased from Promega. The Syk inhibitors piceatanol and BAY 61-3606 were purchased from Sigma-Aldrich. The Syk inhibitor R406 and the Axl inhibitor R428 were provided by Rigel Inc and are under MTA approval. The inhibitors PP1 and PP2 were purchased from Calbiochem. All siRNAs were purchased from Dharmacon.

Submitted October 18, 2010; accepted June 15, 2011. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, July 5, 2011; DOI 10.1182/blood-2010-10-313692.

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

Cell lines

The Bcr-Abl positive human erythroleukemic K562 cell line has been rendered nilotinib-resistant as previously described for imatinib, and designated K562-rn.⁹ Cells were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS, 2mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 0.1 mg/mL streptomycin (referred to in this article as 'RF-10') at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Aliquots were taken at 24 hour intervals for assessment of cell viability by Trypan blue exclusion (Sigma-Aldrich). For SILAC, K562 cells were grown in "light" medium whereas K562-rn were grown in "heavy" medium for 7 days leading to 95% of isotope incorporation as previously described.¹⁰

CD34 cells isolation

Mononuclear cells were isolated from bone marrow or blood by Ficoll gradient. CD34 positive cells were purified according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec) and purity was analyzed by flow cytometry using phycoerythrin-conjugated anti-CD34 antibody (Becton Dickinson).

Cell proliferation assays

Cell proliferation was measured using MTS tetrazolium (Cell Titer96 Aqueous; Promega). Cells were washed and plated (10⁴ cells) in quadruplicate into microtiter-plate wells in RF-10 medium plus various doses of inhibitors as indicated. Cell viability was measured every day during 4 days. After addition of 20 µL of MTS to the wells followed by a 2 hour incubation at 37°C, the 490 nm absorbance was read using a microplate autoreader (Dynex Technologies). The mean results of the 4-well set were standardized in comparison to the initial optical density at day 0. All the experiments were repeated at least 3 times.

Phosphotyrosine immunoaffinity purification and mass spectrometry analysis

SILAC (¹³C₆¹⁵N₂-Arg- and ¹³C₆¹⁵N₂-Lys as heavy labeling), phosphotyrosine immunoaffinity purification (using a mixture of 4G10 and pY100 antibodies), and tryptic digests were essentially performed as described Leroy et al.¹⁰ Briefly, cells were lysed in immunoprecipitation buffer. Heavy and light cleared lysates, 5 mg each, were mixed at a 1:1 ratio and incubated overnight at 4°C with 1 mL of anti-phosphotyrosine immunoaffinity beads. Elution was performed with 100mM phenyl phosphate (Sigma-Aldrich) and proteins were precipitated with cold acetone. The proteins were separated by 4%-15% gradient SDS-PAGE and the gel was stained with the Colloidal Brilliant Blue G (Sigma-Aldrich). Each lane was cut in 45 pieces and protein bands were in-gel digested using trypsin (sequencing grade; Promega). Mass spectrometry (MS) analysis of the samples was performed on a QSTAR pulsar-i quadrupole-time-of-flight mass spectrometer (Applied Biosystems) coupled to an Ultimate 3000 (Dionex) nanoflow system driven by Chromeleon software. MS/MS spectra were searched against the human entries of UniProt Knowledgebase Release 10.2 database (<http://www.expasy.ch>) using the Mascot v2.1 algorithm (<http://www.matrixscience.com>). Search parameters were mass accuracy 0.1 Da for MS and MS/MS data; 1 miscleavage; variable modifications: oxidized methionine, Phospho (ST), Phospho (Y), SILAC-labels: Lys-8 and Arg-10. Identification was done on the basis of at least one specific peptide. All significant hits (*P* < .05) were manually inspected. Quantification was done on at least 2 MS spectra per protein using MSQuant v1.4.1 software (<http://msquant.sourceforge.net>). All MS spectra used for quantification were manually verified.

Tyrosine kinase silencing by siRNA

To inhibit Syk protein expression, 2 × 10⁶ cells were washed 3 times in cold PBS. siRNA used was from Dharmacon smart pool (5'-GAGCAAUUU-GUCCUGAUAG-3'). Transfection was performed using the Amaxa system according to the manufacturer's instructions using the protocol T03 (Amaxa AG). Cells were seeded at 2 × 10⁵/mL in RF-10 for 24 hours after which cells were separated in 2 batches and incubated in the absence or in the presence of 20nM nilotinib. Aliquots of the culture were harvested daily for

protein expression analysis and measurement of cell viability by triplicate trypan blue exclusion counts. Experiments were performed no longer than 4 days and were repeated 3 times. Cell viability is presented as the mean of the triplicate for one experiment representative of 3.

Lentiviral Production, Titration, and Cell Transduction

Production and titration of infectious lentiviral particles were as detailed previously.¹¹ Primers for the short hairpin anti-Syk were designed as followed: forward 5'-AGCTTCCGAGCAAATTGTCCTGATAGTTC-AAGAGACTATCAGGACAATTGCTCTTTTGAAG-3', reverse 5'-TCGACTTCCAAAAGAGCAAATTGTCCTGATAGTCTCTTGAAC-ATCAGGACAATTGCTCGGA-3'. Ligation was performed in pTRIPΔU3EF1α-DsRed-WPRE-MSΔU3 vector and used in with PAX2 and VSVG vectors to transfect HEK293T cells for lentiviral production. Lentiviral particles were added to the target cells and incubated for 24 hours. Then, the cells were washed twice in PBS and grown in the presence of medium for 6 days before experimental use. Cells in which Syk had been silenced by Syk ShRNA expression were selected by cell sorting using DsRed expression as a threshold, analyzed by flow cytometry as a homogenous cell population with purity > 98%. Syk silencing was verified by Western blotting.

Ectopic tyrosine kinase expression

To coexpress Lyn and Syk proteins in a similar ratio than in K562-rn cells, we transfected K562-s cells (ie sensitive to TKI) with cDNA coding for Lyn and Syk at a 4:1 ratio. Lyn cDNA coded for the wild type form or the constitutively activated mutant (Y508) as described.¹⁰ Syk cDNA was kindly provided by Dr P. Coopman as the wild-type, the kinase dead form (K402R), and the constitutively activated form (Y130E).¹² K562 cells (2 × 10⁶) were washed 3 times in cold PBS. Transfection was performed using the Amaxa system according to the manufacturer's instructions using the protocol T03 (Amaxa AG). Cells were seeded at 2 × 10⁵/mL in RF-10 for 24 hours after which cells were separated in 2 batches and incubated in the absence or in the presence of 20nM nilotinib. Aliquots of the culture were harvested daily for protein expression analysis and measurement of cell viability by triplicate trypan blue exclusion counts. Experiments were performed no longer than 4 days and were repeated 3 times. Results are presented as 1 experiment representative of 3.

Flow cytometry

For detection of apoptosis, 10⁵ cells were incubated for 15 minutes in 500 µL of PBS with 2mM Ca²⁺, 2 µL of annexin V-FITC or APC before flow cytometry analysis on FacsCalibur. Five thousand events were acquired for statistical analysis. Results are expressed as the percent of annexin V positive cells in comparison to control (untreated cells). Annexin V-FITC or APC-conjugated were purchased from Beckman Coulter.

For the detection of Axl and Syk phosphorylation, 10⁵ cells were incubated for 10 minutes in 500 µL of PBS-paraformaldehyde (4% wt/vol) and 10 minutes in PBS-Triton (1% wt/vol). After saturation for 30 minutes in PBS-BSA (2% wt/vol), cells were incubated for 1 hour with control rabbit IgG or specific antibody (anti-Axl or anti-p-Syk_{S25/S26}, 3 µg/mL). After 1 wash, cells were incubated with Alexa 488-conjugated anti-rabbit antibody for 1 hour. After the last wash, cells were analyzed by flow cytometry.

Western blot analysis

Protein lysates were prepared according to Pocaly et al.¹³ Protein concentration was measured by the BCA Protein Assay (Pierce) and the lysates were stored at -80°C. Approximately 25 µg of protein were resolved on 10% SDS-PAGE gels, transferred onto PVDF membranes (Bio-Rad) by semi-dry electrophoretic transfer, probed with individual antibodies, and visualized by the ECL system (Perkin Elmer). For immunoprecipitation, 400 µg of protein lysates were precleared with 30 µL of 50% slurry protein A-sepharose by incubation for 1 hour at 4°C. After centrifugation, the supernatant was incubated with 2 µg of antibody overnight and then incubated for 1 hour with 30 µL of protein A-sepharose. After 3 washes

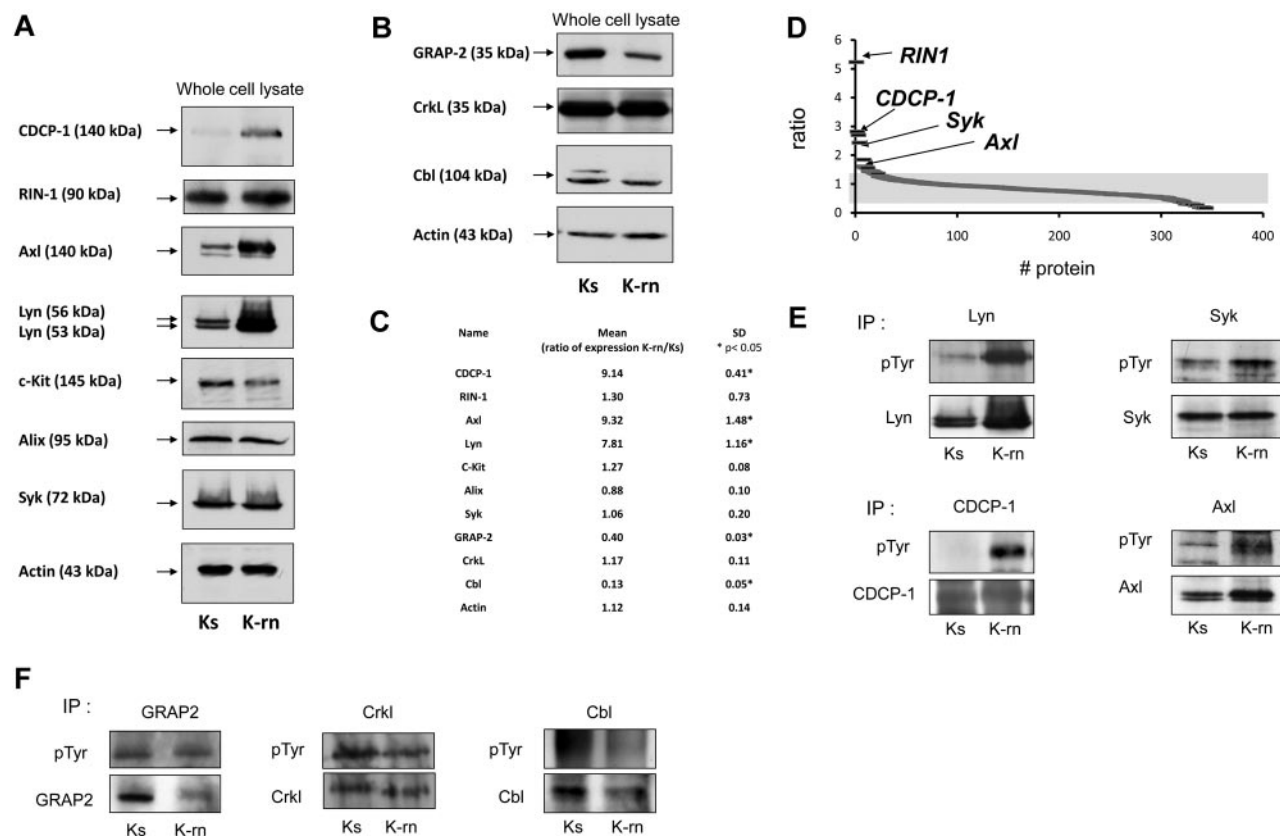


Figure 1. Validation of SILAC results by Western-blotting. Proteins identified by SILAC were detected in nilotinib-sensitive Ks or nilotinib-resistant K-rn cell lysates. After transfer, specific proteins were individually detected for proteins over detected in K-rn (A) or down detected (B). After stripping, membranes were probed for actin as loading control. Proteins detected are indicated by an arrow on the left. Quantification of protein expression was performed by densitometry (C). Protein expression level was normalized using actin as loading control. Results are expressed as the mean fold increase expression for each protein by calculating the ratio of the K-rn cells to their sensitive counterpart Ks from at least 3 independent experiments. Significance was calculated by Mann Whitney test and indicated by an asterisk. Proteins identified by mass spectrometry and scored by SILAC were graphically represented as the ratio between the heavy and light isotope (D). Indicated proteins were immunoprecipitated from Ks or K-rn cell lysates. Tyrosine phosphorylated proteins were detected followed by the specific detection of immunoprecipitated proteins over detected in K-rn (E) or down detected (F). Results shown are from one independent experiment representative of 3.

with lysis buffer, the pellet of protein A-sepharose was solubilized with SDS loading buffer and samples were resolved by SDS-PAGE.

Quantification by Q RT-PCR in sensitive and resistant cells

Seven CML patients in chronic phase ($n = 2$) or in accelerated phase ($n = 5$; 2 males, 5 females) with Ph chromosome and BCR-ABL-positive CML were investigated after failure of imatinib or nilotinib. The duration of therapy was 3 to 36 months and all patients were analyzed before nilotinib and at the time of failure. Resistance was defined by progression or absence of hematologic and cytogenetic response. Total RNA was extracted from cell lines or primary CML cells, and Q RT-PCR performed using MX3005P from Stratagene according to the manufacturer's instructions. Primers used for CDCP1 were forward: 5'-TGGTT CCACCCAGAAATGT-3' and reverse: 5'-GATGATGCACAGACGTTTATAGATGA-3', as previously described.¹⁴ For Axl these were forward: 5'-GTTTGGAGCTGTGATG-GAAGGC-3' and reverse: 5'-CGCTTCACTCAGGAAATCTCC-3'. With a 10-fold serial dilution series for cDNA, the assay was found to be linear over at least 5 orders of magnitude (slope, -3.414 ; intercept, 35.81). Quantification of relative expression was performed using *GUS* as endogenous control, as previously described.¹⁵ Analysis was done by comparative Ct method giving the amount of target normalized to the endogenous reference and relative to the same pool of mononuclear cells as the calibrator.

Statistical analysis

A Mann Whitney test was used to calculate differences between means; differences were considered significant when $P < .05$.

Results

Tyrosine kinase signaling in nilotinib resistant cells by quantitative phosphoproteomics

Comparing the tyrosine phosphorylations of K562 sensitive to TKI (Ks) with K562 resistant to nilotinib (K-rn) by quantitative phosphoproteomics showed that K-rn cells overexpressed the tyrosine kinase Lyn (Figure 1A) with a 7.8-fold increase ($n = 6$, $P < .05$) compared with Ks. We then investigated Lyn substrates in nilotinib resistant cells using a SILAC approach in which K-rn cells were labeled with "heavy" $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ -Arg- and $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2$ -Lys-containing medium, whereas K-s cells were cultured in "light" normal conditions. Cell lysates were next combined, and phosphotyrosine-containing proteins were purified using antiphosphotyrosine antibodies. Proteins were separated by SDS-PAGE, digested with trypsin, and subjected to liquid chromatography-tandem Mass Spectrometry. Quantification was made from the relative intensities of Arg/Lys labeled tryptic peptides. With this approach, we identified 344 proteins, 9 of which exhibiting a significant increased and 91 reduced tyrosine phosphorylation, in Lyn overexpressing cells (supplemental Table 1, available on the Blood Web site; see the Supplemental Materials link at the top of the online article). As expected, Bcr-Abl was identified in this screen with a quantification ratio of 1. This data confirmed that resistance to

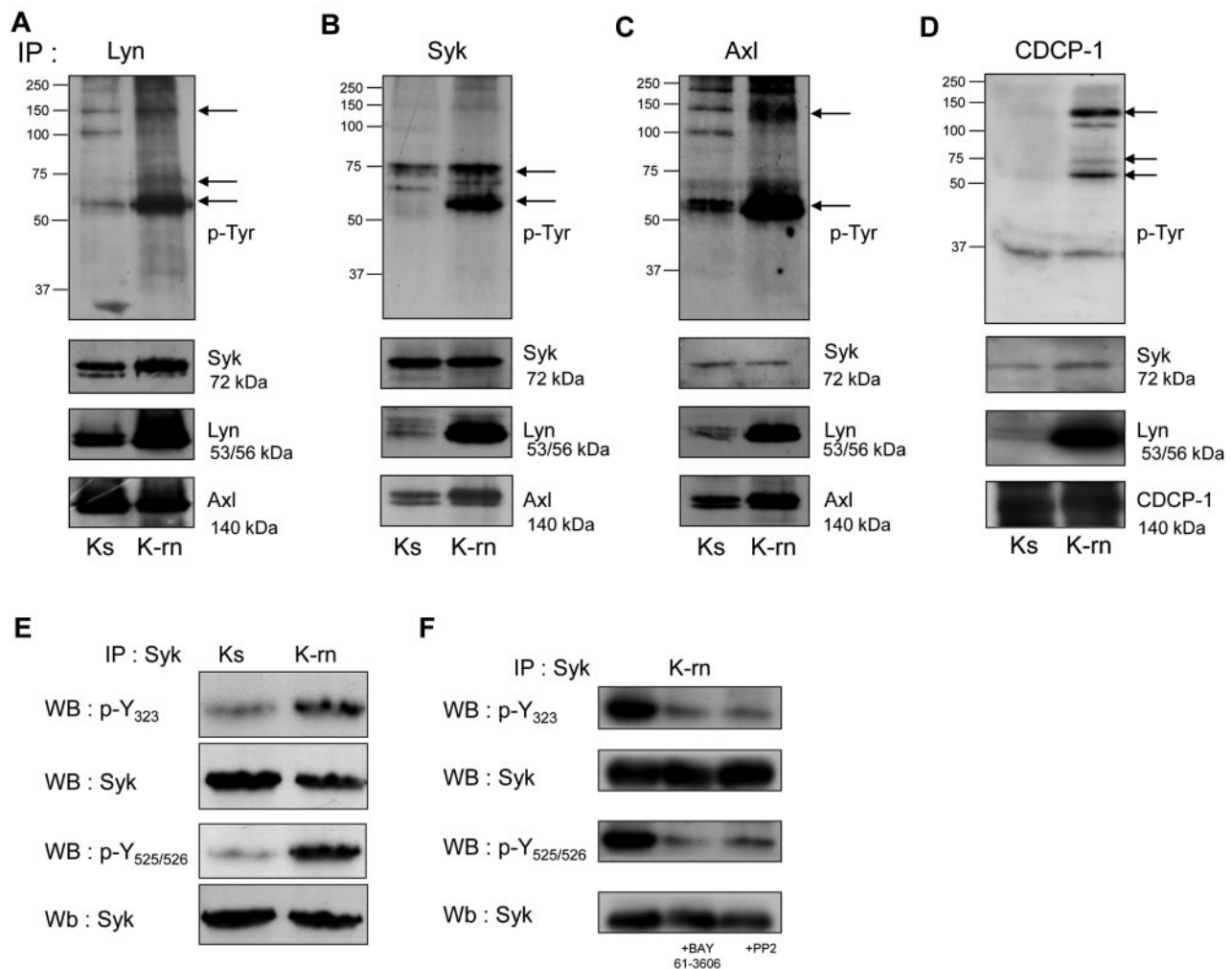


Figure 2. Detection of tyrosine phosphorylated proteins associated with the kinases Lyn, Syk and Axl. Proteins (A: Lyn; B: Syk and C: Axl; D: CDCP-1) were immunoprecipitated from Ks and K-rn cell lysates and subjected to phosphotyrosine Western blotting using a mix of 4G10 and pY-100 antibodies (top panels). Differentially tyrosine phosphorylated proteins are indicated by arrows on the right. After stripping, membranes were cut and blotted against Syk (top), Lyn (middle), Axl (bottom panels). Results are from one experiment representative of 5. (E) Syk was immunoprecipitated from Ks and K-rn cell lysates. Immunoprecipitates were subjected to Western blotting using phosphospecific antibodies against residues Y₃₂₃ and Y_{525/526}, and reblotted for whole Syk. (F) Syk was immunoprecipitated from K-rn cell lysates from untreated, BAY 61-3606-treated (2 μ M 2 hours) and PP2-treated (20 μ M 2 hours) K-rn cells. Immunoprecipitates were subjected to Western blotting using phosphospecific antibodies as described in panel E.

nilotinib was not because of a change in expression of Bcr-Abl in addition to the absence of mutation in the kinase domain as already published.⁸ Surprisingly, Lyn was not obtained with our analysis, indicating that our MS methodology is not extensive in this case. Nevertheless, Western blot analyses confirmed that Lyn was still up-regulated in K-rn cells (Figure 1A and supplemental Figure 1).

We next focused on tyrosine phosphorylated proteins involved in signaling showing a clear over (ratio > 1.5) or under (ratio < 0.66) phosphorylation in K-rn cells (supplemental Tables 2-3). With this setting, 6 proteins had increased tyrosine phosphorylation > 1.5 fold (Figure 1D): the Ras and Rab interactor 1 (RIN1); the CUB domain-containing protein 1 precursor, an adaptor protein also called CDCP-1; the programmed cell death 6-interacting protein, PDCD6IP or Alix and 3 additional tyrosine kinases: the spleen tyrosine kinase Syk; the UFO receptor Axl and the stem cell factor receptor c-kit. These MS data have systematically been confirmed by Western blot showing increased tyrosine phosphorylation of Lyn, Syk, Axl and CDCP-1 in K-rn cells. Interestingly increased phosphorylation of Axl and CDCP-1 was accompanied by an increase in the expression of these proteins in

K-rn cells (mean $\pm$ SD ratio of expression: 9.3 ± 1.4 and 9.1 ± 0.4 , respectively; Figure 1A-C). We also focused on 7 proteins among the 91 whose ratio was < 0.66 (supplemental Table 1). This included proteins involved in cytoskeleton regulation, such as the tyrosine kinase Fak, Wave2, Nap1 and desmoplakin and signaling proteins such as Gab1, Cbl, CrkL and GRAP2. This data were confirmed by Western blot for some of them (Figure 1B). The decreased tyrosine phosphorylation of GRAP2 and Cbl in K-rn cells was correlated with/accompanied by a reduced expression of these proteins (Figure 1F; mean $\pm$ SD ratio of expression: 0.4 and 0.13, respectively; Figure 1C). In contrast, CrkL has a similar level of expression and phosphorylation (Figure 1F).

Syk and Axl interact with Lyn

We next investigated whether Lyn was involved in tyrosine phosphorylation of Syk and Axl. As shown in Figure 2, Lyn interacted with Syk and Axl in both cell-lines, as demonstrated by coimmunoprecipitation of these proteins. In contrast, Syk coprecipitated significantly higher amounts of Lyn and Axl in K-rn

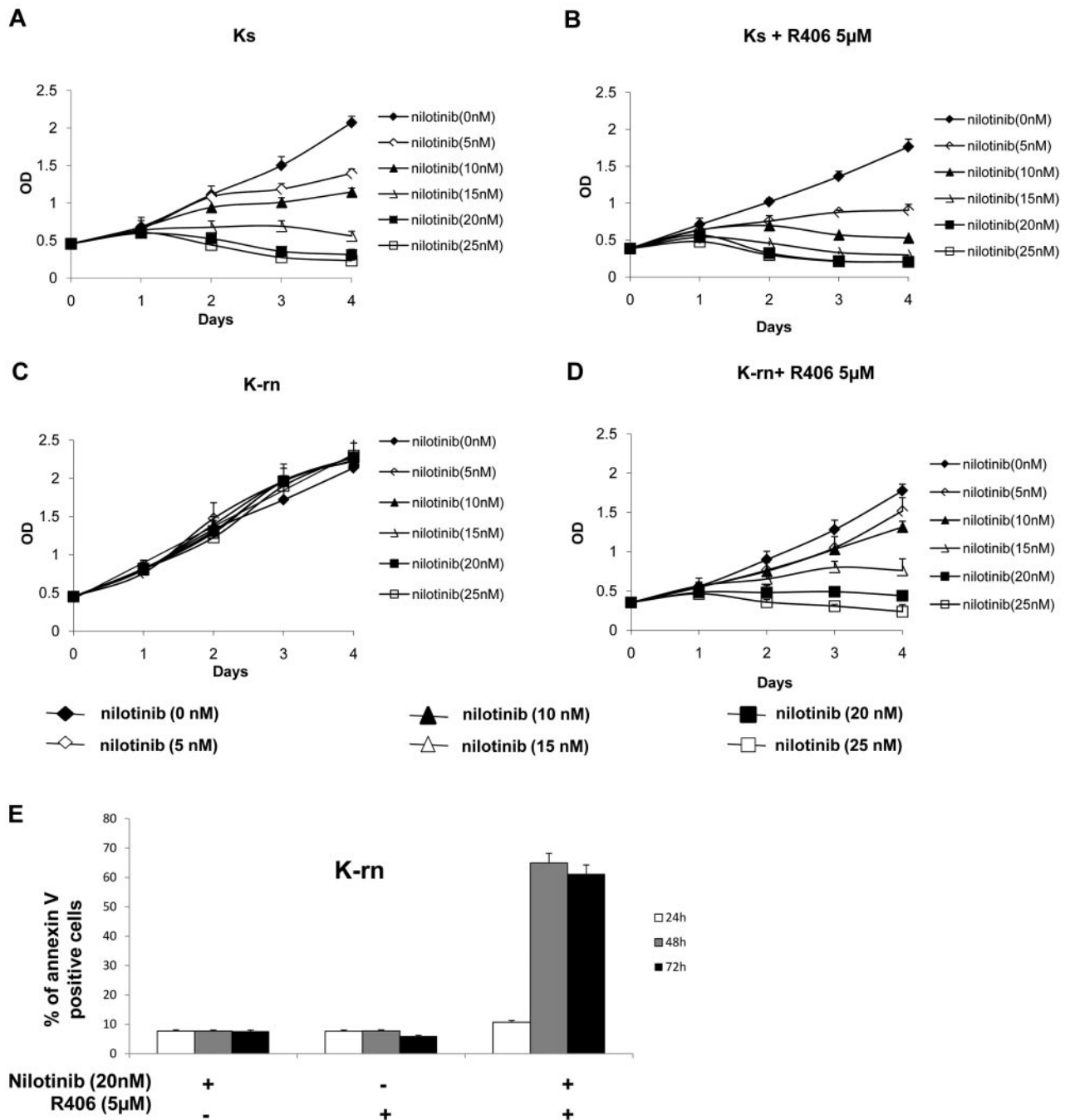


Figure 3. Inhibition of Syk tyrosine kinase activity restores nilotinib sensitivity. Proliferation of the nilotinib-sensitive (Ks) and resistant cell lines (K-rn) were tested in MTS assays in the presence of increasing concentrations of nilotinib in the absence (A,C) or the presence (B,D) of R406 (5μM). Results are expressed as the mean of the optical density (OD) of the 4-well set standardized in comparison with the starting optical density at day 0, which is directly proportional to the number of viable cells. K-rn cells were grown in the presence of nilotinib (20nM), R406 (5μM) or a combination of nilotinib plus R406. Apoptosis was detected by flow cytometry using annexin V-FITC at 24, 48, and 72 hours. Results, expressed as the percentage of annexin V positive cells, are from one experiment representative of 3 (E).

compared with Ks cells. Finally Axl also coprecipitated Lyn in K-rn cells. To further investigate the interactions between these kinases, Syk was immunoprecipitated from Lyn immunoprecipitate followed by the detection of Axl. The detection of Axl in the last immunoprecipitate confirmed the existence of a Lyn/Syk/Axl ternary complex whose tyrosine phosphorylation is increased in nilotinib resistant cells (supplemental Figure 2A).

We next asked whether Syk was constitutively activated in K-rn cells. Syk levels were not modified on nilotinib resistance induction (mean $\pm$ SD ratio of expression: 1.06 ± 0.2 ; Figure 1C). The use of phosphospecific antibodies showed an increased

Syk phosphorylation on Tyr₃₂₃, known to be involved in the interaction with Cbl and Tyr_{525/526} involved in the activation Syk (Figure 2E). This data suggested that Syk is activated during nilotinib resistance induction. We then wondered whether this activation was regulated by Lyn. As shown in Figure 2F, both the SFK inhibitor PP2 (20μM) and the Syk inhibitor BAY 61-3606 (2μM) induced a large decrease of Syk phosphorylation. Similar results were obtained with the dual Abl/Src inhibitor dasatinib which, like PP2, did not affect Syk kinase activity (supplemental Figure 2B-C). Overall, this data suggests that Lyn deregulation mediates Syk activation in K-rn cells.

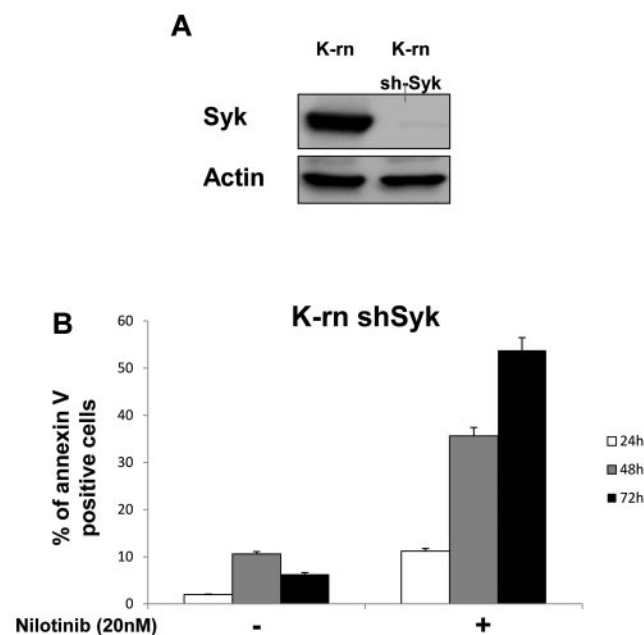


Figure 4. Silencing Syk restores nilotinib sensitivity. K-rn cells were infected by lentivirus coding for a shRNA anti-Syk, grown for 10 days, selected for DsRed expression and purified by cell sorting. Syk silencing was confirmed by Western blotting (A) and apoptosis in response to nilotinib was measured on both K-rn and K-rn ShRNA Syk cells by cytometry using annexin V-FITC (B). Results are expressed as the percentage of annexin V positive cells.

Inhibition of Syk tyrosine kinase restores nilotinib sensitivity

Having shown that Syk activity was higher in nilotinib resistant cells, we wanted to confirm that the function of Syk was instrumental in determining the resistance to nilotinib. We tested the Syk inhibitor R406 used in several diseases including chronic lymphocytic leukemia.^{16,17} R406 (5 μ M) has no significant effect on Ks and K-rn cell proliferation as assessed by 4-day MTS experiments (supplemental Figure 3A,B). Ks cells responded to increasing dose of nilotinib by a decrease of proliferation accompanied by a loss of viability (Figure 3A) whereas K-rn cells were fully resistant (Figure 3C). The incubation with 5 μ M of R406 did not significantly modify the response of Ks cells to nilotinib (Figure 3B) although a slight decrease was observed. In contrast, nilotinib sensitivity was fully restored in K-rn cells in the presence of R406 with decreased MTS viability (Figure 3D) confirmed by increased detection of apoptotic cells (Figure 3E). Similar results were obtained with 1 or 10 μ M of the Syk inhibitor; BAY 61-3606 (supplemental Figure 3C-D), thus confirming that Syk activation is crucial for nilotinib resistance in these cells.

To further address the role of Syk in Lyn-mediated resistance, its expression was inhibited by a specific siRNA in K-rn cells. In contrast to a scrambled version of the siRNA (negative control siRNA Neg), the Syk-targeted siRNA (siRNA Syk) induced a large decrease of Syk expression at after 3 days of transfection (supplemental Figure 4A). This inhibition of Syk expression was associated with an increased sensitivity to nilotinib as measured by an increased cell mortality (+ 34%; supplemental Figure 4B). The involvement of Syk was also confirmed by a Syk shRNA that was stably introduced into K-rn cells by lentiviral infection. This approach led to complete inhibition of Syk expression without disturbing cell proliferation (Figure 4A). After purification of the Syk-null cell population by sorting Ds-Red-positive cells, the K-rn-Syk shRNA cell line was tested for nilotinib sensitivity. The

inhibition of Syk expression fully restored the sensitivity to nilotinib accompanied by the apoptosis of K-rn cells (Figure 4B).

Coexpression of Lyn and Syk triggers resistance to nilotinib

To further confirm the role of Syk and Lyn in nilotinib resistance, Lyn and Syk were coexpressed in Ks cells. As described, a ratio of 4:1 Lyn to Syk was used to mimic the over expression of Lyn observed in K-rn cells. Both the wild-type (wt; Figure 5A) and the constitutively activated form of LynY508F (Figure 5B) were used in transient transfection experiments. Nilotinib induced death of Ks cells (supplemental Figure 5A-B) when cotransfected with Lyn (both wt and Y508E) and a catalytic-inactive form of Syk (SykK402R) confirming that overexpression of Lyn alone is not enough to induce nilotinib resistance. In contrast, the coexpression of Lyn (wt) with Syk (Syk wt) or constitutively activated Syk (Syk-Y130E) induced resistance to nilotinib as shown by cell proliferation (Figure 5) and cell death measurements (supplemental Figure 5A). A similar resistance to nilotinib was observed on coexpression of the constitutively activated form of Lyn (Y508) with Syk wt or Y130E (Figure 5B and supplemental Figure 5B). Interestingly, the expression of Syk alone did not change the sensitivity to nilotinib in Ks cells whereas it increases resistance in K-rn cells (supplemental Figure 5C-D). These results indicate that Syk or Lyn per se are not sufficient to ensure cell resistance to nilotinib and emphasize the interplay between Syk and Lyn in this biologic process.

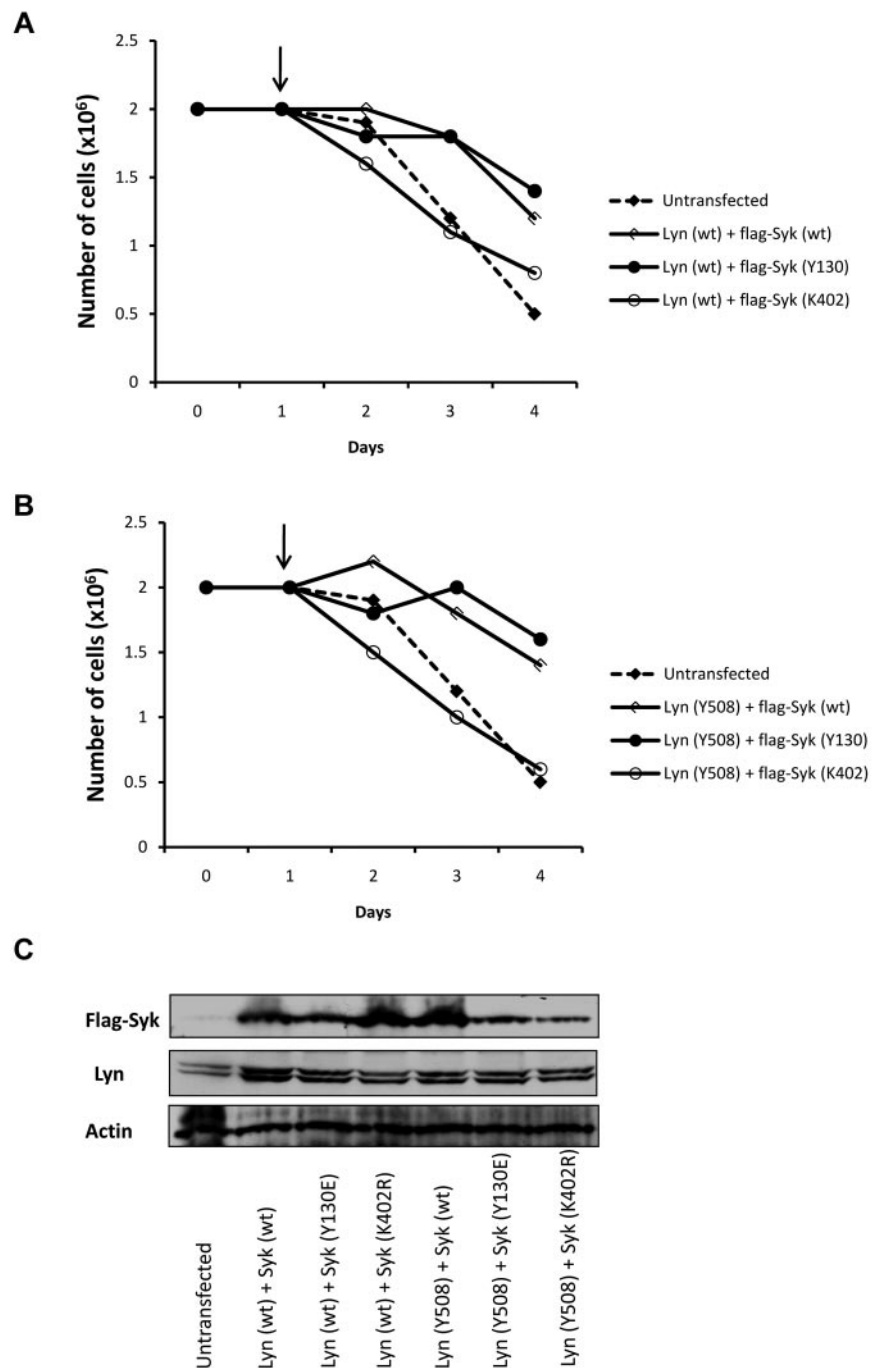
Syk regulates Lyn, Axl and CDCP-1 phosphorylation

We next searched for Syk dependent phosphorylations involved in the acquisition of cell resistance to nilotinib. We first observed a significant decrease of tyrosine phosphorylation content in K-rn sh-Syk cells (supplemental Figure 6A). Then, we addressed the impact of the absence of Syk on the tyrosine phosphorylation of Lyn, Axl and CDCP-1. The inhibition of Syk expression led to a decreased Lyn phosphorylation without altering its level of expression (Figure 6A and supplemental Figure 6A). CDCP-1 tyrosine phosphorylation was also decreased on Syk depletion (Figure 6C) and was accompanied by a reduction in the association with Lyn (Figure 6A-C). Similarly, Syk knock-down led to a decreased Axl tyrosine phosphorylation and association with Lyn without modification of its expression (Figure 6B and supplemental Figure 6A). These data suggest that Syk regulates tyrosine phosphorylation of Lyn, Axl and CDCP-1 and their interaction.

Axl and CDCP-1 are up-regulated and involved in nilotinib resistance in vitro and in vivo

Finally, we investigated the role of Axl and CDCP-1 in cell resistance to nilotinib. Axl or CDCP-1 expression was inhibited by specific siRNA in K-rn cells. The efficiency of these siRNA was shown by a large decreased protein level at day 2 (Figure 7A-B). Both the inhibition of Axl or CDCP-1 expression induced a partial recovery of cell sensitivity to nilotinib (~ 40% dead cells after 2 days of nilotinib treatment). This data suggests that Axl and CDCP-1 may be important mediators of the Syk/Lyn signaling process leading to cell resistance to nilotinib. Finally, we wished to confirm the involvement of this signaling process in vivo. Firstly, we observed that both CDCP-1 and Axl transcripts were increased by 2-fold and respective protein levels by 8- to 9-fold in K-rn cells (Figure 8A). We searched for the existence of similar molecular events in nilotinib-resistant cells from CML patients overexpressing Lyn.⁸ Messenger RNAs of Axl and CDCP-1 were increased from 2 to 180-fold in 5 nilotinib-resistant CML cells (Figure 8B).

Figure 5. Coexpression of Lyn and Syk induced nilotinib resistance in Ks cells. Ks cells were transfected with Lyn and Syk constructs with a ratio of 4:1 to mimic the over expression of Lyn in K-rn cells. Both Lyn wild type (Lyn wt panel A) and the constitutively activated Lyn (Lyn Y508 panel B) were used in combination with Syk wild type (wt), constitutively activated (Y130) and kinase dead (K402). On day 1 at the time of transfection nilotinib was added (indicated by the arrow, 20nM) and cell proliferation was quantified over a 4 days time course experiment by triplicate cell counting. Results are from 1 experiment representative of 2. (C) Samples taken at day 4 and analyzed for Lyn and Syk expression.



To confirm these results, both tyrosine $Y_{525/526}$ phosphorylation of Syk and expression of Axl were investigated in CD34 positive cells isolated from CML patient's blood samples. Detection of Syk phosphorylation and Axl expression by flow cytometry has been previously validated using Ks and K-rn cells but also pervanadate-treated CD34+ cells (supplemental Figure 7A-B). As shown in Figure 8C and D, 2 patients responding to nilotinib (CML 8 and 9) share basal phosphophorylation of Syk and expression of Axl. In contrast, patient CML 10 who is resistant to nilotinib has a high tyrosine $Y_{525/526}$ phosphorylation of Syk and Axl expression.

The detection of Lyn, Axl and CDCP-1 in CML samples confirmed these results in patients CML 9 and 10 (Figure 8D). These results were also confirmed using samples from CML patients sensitive¹¹ or resistant (12 and 13) to nilotinib (Figure 8E).

Discussion

The present work was performed to investigate the tyrosine kinase signaling involved in nilotinib resistance using a resistant Bcr-Abl positive cell line, K-rn, overexpressing the tyrosine kinase Lyn.⁸ Because the overexpression of Lyn has already been demonstrated both in imatinib and nilotinib resistant CML cells, we identified and quantified by SILAC the tyrosine phosphorylated proteins in the nilotinib-resistant cell line in comparison to the sensitive counterpart. Among the 350 proteins identified and quantified, we focused on the role of 2 tyrosine kinases overexpressed and/or hyperphosphorylated, Syk and Axl. The spleen tyrosine kinase Syk is known to participate in immune receptor signaling, lymphocyte proliferation

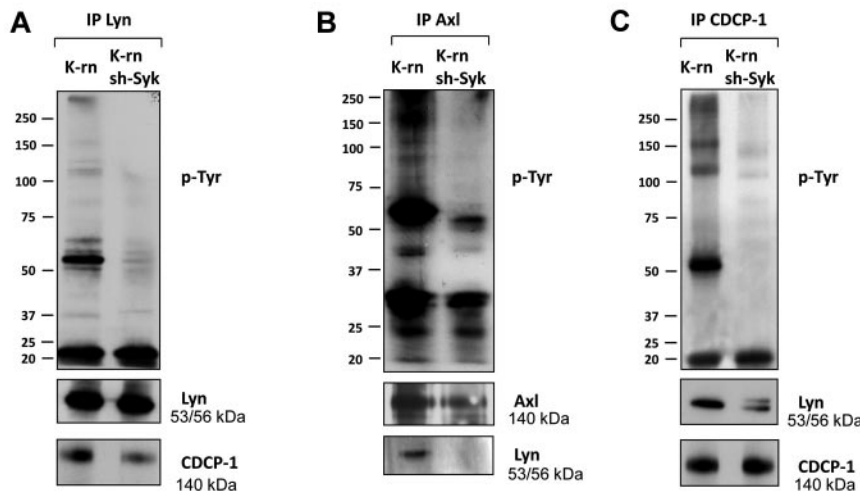


Figure 6. Inhibition of Syk expression altered phosphorylation and interaction of Lyn, Axl and CDCP-1. Lyn (A), Axl (B) and CDCP-1 (C) were immunoprecipitated from K-rn and K-rn sh-Syk cells. After transfer, membranes were probed for tyrosine phosphorylated proteins using a mix of 4G10 and pY-100 antibodies (top panels). After stripping, membranes were cut and re-probed as indicated. Results are from 1 experiment representative of at least 3.

or to have tumor suppressor roles in melanoma and breast cancer.¹⁸⁻²¹ It has also been reported overexpressed in acute myeloid leukemias suggesting a potential oncogenic role.²² We detected an increase in Syk phosphorylation in K-rn cells (with no significant difference of expression) which is in agreement to the report of an unidentified 75-kDa phosphoprotein in Lyn overexpressing imatinib resistant cells.²³ Indeed, phosphorylation of Syk on tyrosine residues Y₃₂₃ and Y_{525/526} in K-rn cells was decreased by PP2, a Src kinase inhibitor and was fully abolished by dasatinib, confirming that a PP2 and dasatinib sensitive tyrosine kinase is involved in Syk phosphorylation.

The role of Syk in nilotinib resistance was confirmed both by the inhibition of Syk kinase activity using R406 (or BAY61-3606) and by inhibition of its own expression by a shRNA. Inhibitors of Syk may be not very specific and could inhibit other kinases involved in cell proliferation. Nevertheless, our results suggest that Syk is also involved. Our results indicate a crosstalk between these 2 kinases. Their coexpression in Ks cells generated resistance to nilotinib confirming that both kinases are required. Lyn and Syk induced resistance is only observed when Syk can be activated as the kinase dead form (Syk K402) did not induce resistance in

combination with Lyn. Overall, results show that the mechanisms of resistance to nilotinib use at least a signaling involving a Syk-Lyn pathway.

The second tyrosine kinase we focused on was the UFO receptor Axl, a member of the receptor tyrosine kinase family implicated in GAS6 signaling and originally discovered in myeloid leukemia.^{24,25} Although Axl expression is increased in K-rn cells, it is similarly detected in Lyn immunoprecipitates from Ks and K-rn cells suggesting that the overexpression of Lyn did not change its interaction with Axl. This interaction could be mediated by the SH2 domains of the p85 subunit of PI3-kinase as several tyrosine residues are phosphorylated in Axl.²⁶ An in vitro interaction has also been reported between Axl and the SH2 domain of Src.²⁷ This is in agreement with the interplay existing between Src kinases and receptor tyrosine kinases suggesting a possible association and a phosphorylation of Axl by Lyn and/or Syk.²⁸ Indeed, Axl detection from Syk immunoprecipitate performed on Lyn immunoprecipitate confirmed that Lyn, Syk and Axl are present in a ternary complex in K-rn cells that is also emphasized by the absence of Lyn in Axl immunoprecipitate from ShRNA Syk cells.

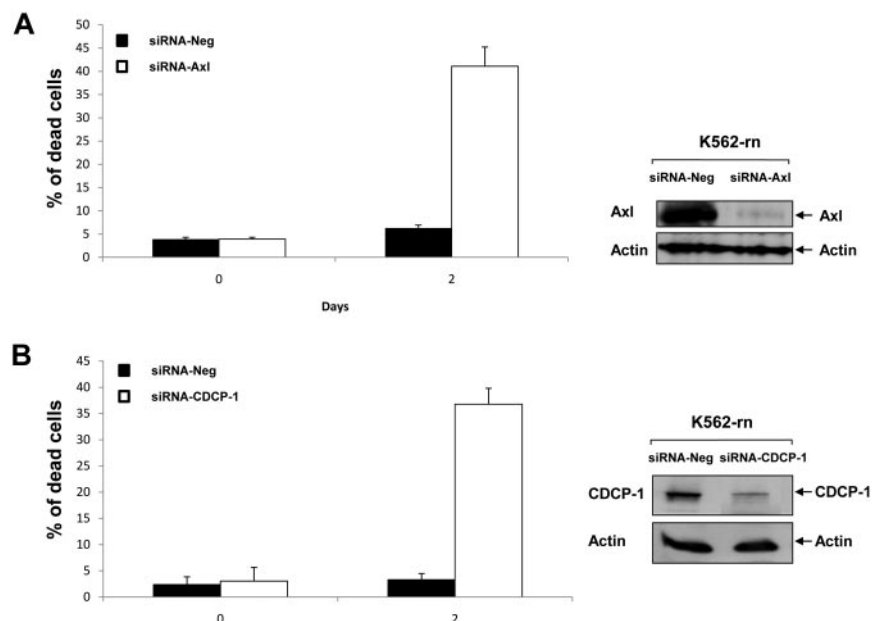


Figure 7. siRNA targeting Axl or CDCP-1 decrease nilotinib resistance. K-rn cells were transfected with 200nM of siRNA corresponding to a negative control siRNA (siRNA Neg) or targeted siRNA; siRNA Axl (A) or siRNA-CDCP-1 (B). Cells were seeded at 2×10^5 /mL in RF-10 for 24 hours after incubated in the presence of 20nM nilotinib. Aliquots of the culture were harvested at day 2 for measurement of cell death by triplicate trypan blue exclusion counts and protein expression analysis. Results are from one experiment representative of 2.

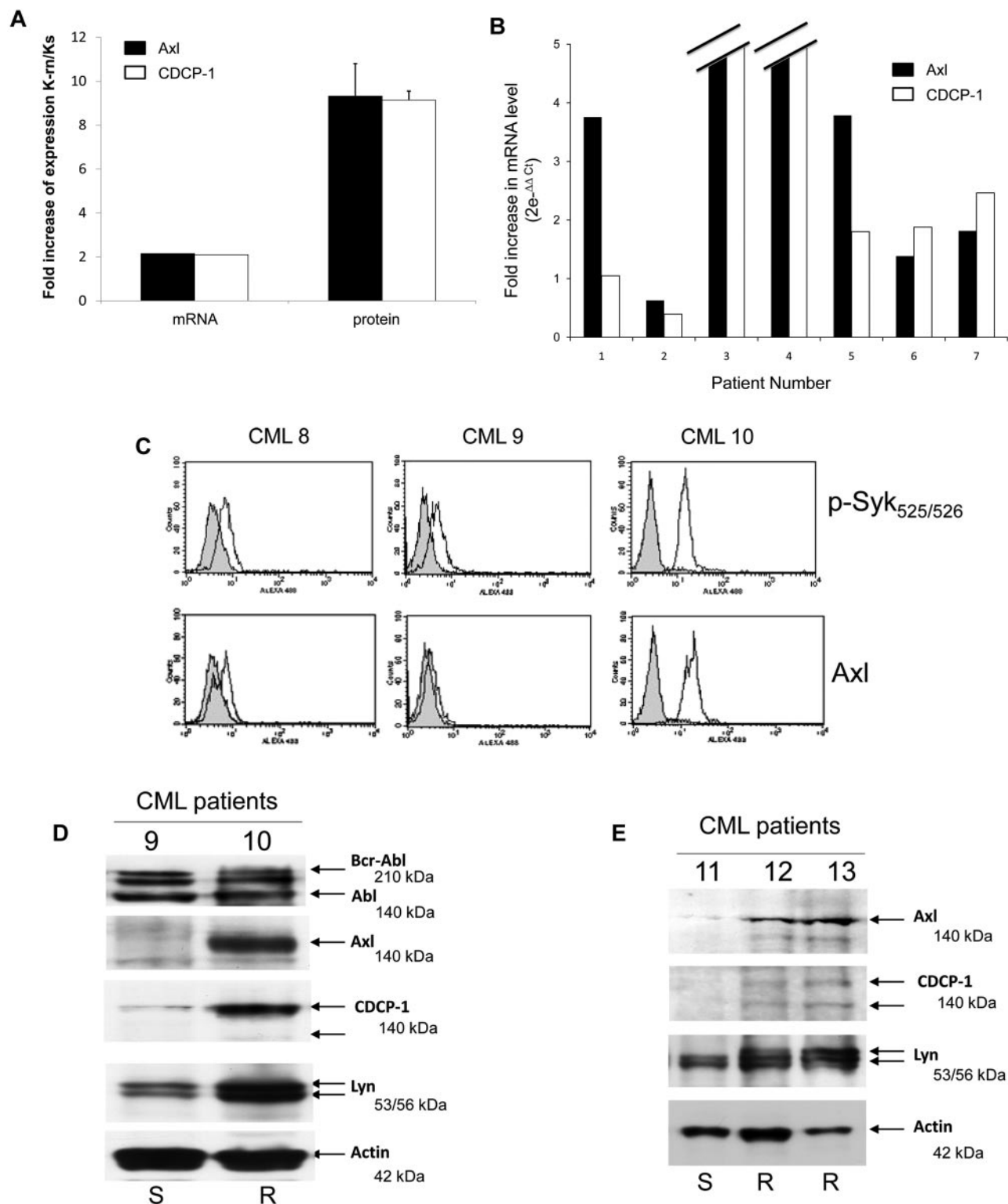


Figure 8. Axl and CDCP1 are over expressed in nilotinib resistant CML cells. (A) Total mRNA (1 μ g) from Ks and K-rn cells were reverse transcribed into cDNA and used in Q-PCR to quantify the mRNA expression of Axl (black box) and CDCP-1 (white box) between Ks and K-rn cells. In parallel, the level of protein expression was quantified by densitometry analysis of 5 separate Western-blot. Results are expressed as a fold increase expression for the mRNA by the $\Delta\Delta$ Ct method and the protein by the ratio of K-m/Ks. (B) Seven CML patients (2 males, 5 females) were investigated as previously described.⁸ All patients were analyzed at the beginning or before nilotinib treatment and under treatment at the moment of nilotinib failure in chronic phase (number 6 and 7) or in accelerated phase (number 1 to 5). Quantitative Real-time PCR to amplify Axl (black box) and CDCP-1 (white box) transcripts was carried out on the cDNA. Analysis was done by comparison of the 2 time points (before nilotinib and under treatment at the moment of failure) by the comparative $\Delta\Delta$ Ct method giving the fold increase of the amount of target normalized to the endogenous reference as $2^{-\Delta\Delta Ct}$. (C) Purified CD34 positive cells from blood samples of CML patients (8 and 9 responding to nilotinib, 10 resistant to nilotinib) were analyzed by flow cytometry as described in "Methods" for Syk phosphorylation (phosphospecific antibody p-Syk 525/526) and Axl expression. Control using non immune IgG (gray histogram) and specific antibody (white histogram) are shown. (D) Bcr-Abl, Axl, CDCP-1 and Lyn were detected by Western-blotting using protein samples from CML 9 and 10 patients. (E) CD34 positive cells from nilotinib-responding (11: S) or resistant (12 and 13: R) CML patients were isolated and solubilized in Laemli buffer. Proteins were separated by SDS-PAGE and specific proteins were detected by Western-blotting as indicated. Actin was used as a loading control.

Looking at the role of the identified kinases, a multistep mechanism may be hypothesized with Syk-Lyn as a starter and downstream signaling partners such as Axl and the adaptor CDCP-1. This was confirmed by silencing Axl and CDCP-1 expression. In addition, overexpression of Axl and CDCP-1 has also been shown in vivo. Indeed, a large increase of expression of Lyn, CDCP-1 and Axl was detected in CD34 positive cells of nilotinib-resistant CML patients. However, the initiating event leading to nilotinib resistance through these overexpressions has still to be elucidated. A dysregulated methylation may be proposed as the expression of these proteins is regulated by methylation. Indeed, incubation of K-rn cells with temozolomide, a methylating agent, decrease Axl expression and partially restore sensitivity to nilotinib (R.G., unpublished results). On the other side, the overexpression of Lyn has been associated with a decreased expression of c-Cbl suggesting it may be taken into account for the overexpression of tyrosine kinase such as Lyn or Axl.²³ This down-regulation of c-Cbl could also contribute to the hyperphosphorylation of Syk.^{29,30} These overexpressions could be linked to c-Cbl mutation itself although no c-Cbl mutation has been detected in K-rn cells (R.G., unpublished results).³¹ All these deregulated mechanisms may contribute to the difference observed between the mRNA and protein level of Axl and CDCP-1 measured in CML patient samples. This difference may also be related to a Lyn-dependent regulation of miRNA such as miRNA 181 associated with a Mcl-1 up-regulation leading to imatinib resistance.³² The characterization of miRNA regulated by Lyn overexpression in K-rn cells will provided information about their potential roles in the overexpression of Axl and CDCP-1.

Even if the Syk-Lyn dual kinase complex controls resistance, downstream elements such as Axl or CDCP-1 are playing critical roles. Inhibition of Axl or CDCP-1 expression confirmed their participation in nilotinib resistance. How Axl is involved in resistance is not yet known. It could be through an inhibitory effect on the NFκB signaling.³³ On other hand, the role of CDCP-1 in the Syk-Lyn pathway is suspected to be required for providing a multi-substrate docking-site and thus preventing nilotinib-induced cell death through a PKCδ pathway.³⁴ This role could also be played by Axl itself.²⁷ Axl being already a drug target in other cancers, it could be a pertinent kinase to target in resistant CML and this should be confirmed.^{35,36} Moreover, this will give a better understanding of how resistance in cancer may be overcome.

The role of the Syk-Lyn kinase complex with the participation of CDCP-1 and Axl is emphasized by the detection of such mechanism in CD34 positive cells from nilotinib resistant CML patients. Moreover, nilotinib resistance mediated by Lyn overexpression and hyperactivation may be overcome by Lyn expression silencing or tyrosine kinase activity inhibition confirming previous reports.^{37,38} It should be worthwhile to investigate the expression

and activation of the newly identified candidates in Lyn-mediated imatinib resistance as nilotinib resistance has always been associated with an increased expression and/or activation of Syk, Axl and CDCP-1. Although this resistance mechanism is not so frequent in CML, this study demonstrates it has occurred in vitro and in vivo. To the authors' knowledge, this is the first time that Syk and Axl kinases have been reported to play a role in CML and in nilotinib resistance. Although dual tyrosine kinase inhibitors like dasatinib or ponatinib are able to overcome Lyn-mediated resistance, one would take advantage that Syk and Axl inhibitors have been recently developed. It could be worthwhile to validate their targeting in this kind of resistance by preclinical studies to increase the panel of therapeutic tools. Because CML cells can evade the inhibitory effect of tyrosine kinase inhibitors by recruiting downstream kinases, they could be the next targets for a combined therapy of CML disease.

Acknowledgments

The authors thank Dr Elisabeth Buchdunger and Paul Manley (Novartis Pharma) for providing us nilotinib. This work was supported by la Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC) Comité de la Dordogne et des Landes, l'INCA, l'Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), la Fondation de France, l'Association Laurette Fugain, la Cancéropôle du Grand Sud-Ouest, l'Université Victor Segalen Bordeaux 2 and Inserm.

R.G. has a fellowship from INCA and ARC, and C.D. has a fellowship from LNCC. The Syk inhibitor R406 is provided by RIGEL Inc, and is controlled by material transfer agreement. Syk constructs were kindly provided by Dr P. Coopman (CNRS 5237, Montpellier, France).

Authorship

Contribution: R.G., C.L., C.D., and V.L. performed research and analyzed data; G.E., S.D., and E.L. analyzed data from CML patients; S.R. and F.-X.M. designed the research, analyzed data and wrote the paper; and J.-M.P. designed and performed the research, analyzed data and wrote the paper.

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

Correspondence: Jean-Max Pasquet, Hématopoièse Leucémique et Cibles Thérapeutiques, Inserm U1035, Université Victor Segalen, 146 rue Léo Saignat Bat TP 4^e étage, 33076 Bordeaux cedex, France; e-mail: jean-max.pasquet@u-bordeaux2.fr.

References

- Rowley JD, Testa JR. Chromosome abnormalities in malignant hematologic diseases. *Adv Cancer Res*. 1982;36(1):103-148.
- Groffen J, Heisterkamp N, Stam K. Oncogene activation by chromosomal translocation in chronic myelocytic leukemia. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986;51(Pt2):911-921.
- Melo JV. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood*. 1996;88(7):2375-2384.
- Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science*. 1990;247(4944):824-830.
- Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science*. 1990;247(4946):1079-1082.
- Burke JR. BMS-345541 is a highly selective inhibitor of I[κ]B kinase that binds at an allosteric site of the enzyme and blocks NF-κB-dependent transcription in mice. *J Biol Chem*. 2003;278(3):1450-1456.
- Weisberg E, Manley PW, Breitenstein W, et al. Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer Cell*. 2005;7(2):129-141.
- Mahon FX, Hayette S, Lagarde V, et al. Evidence that resistance to nilotinib may be due to BCR-ABL, Pgp, or Src kinase overexpression. *Cancer Res*. 2008;68(23):9809-9816.
- Mahon FX, Deininger MW, Schultheis B, et al. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood*. 2000;96(3):1070-1079.
- Leroy C, Fialin C, Sirvent A, et al. Quantitative phosphoproteomics reveals a cluster of tyrosine kinases that mediates SRC invasive activity in advanced colon carcinoma cells. *Cancer Res*. 2009;69(6):2279-2286.
- Robert-Richard E, Richard E, Malik P, Ged C, de Verneuil H, Moreau-Gaudry F. Murine Retroviral but not Human Cellular Promoters Induce In Vivo Erythroid-specific Deregulation that can be Partially Prevented by Insulators. *Mol Ther*. 2007;15(1):173-182.

12. Zyss D, Montcourrier P, Vidal B, et al. The Syk tyrosine kinase localizes to the centrosomes and negatively affects mitotic progression. *Cancer Res*. 2005;65(23):10872-10880.
13. Pocaly M, Lagarde V, Etienne G, et al. Overexpression of the heat-shock protein 70 is associated to imatinib resistance in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2007;21(1):93-101.
14. Perry SE, Robinson P, Melcher A, et al. Expression of the CUB domain containing protein 1 (CDCP1) gene in colorectal tumour cells. *FEBS Lett*. 2007;581(6):1137-1142.
15. Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia*. 2003;17(12):2318-2357.
16. Braselmann S, Taylor V, Zhao H, et al. R406, an orally available spleen tyrosine kinase inhibitor blocks Fc receptor signaling and reduces immune complex-mediated inflammation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;319(3):998-1008.
17. Friedberg JW, Sharman J, Sweetenham J, et al. Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2010;115(13):2578-2585.
18. Sada K, Takano T, Yanagi S, Yamamura H. Structure and function of Syk protein-tyrosine kinase. *J Biochem*. 2001;130(2):177-186.
19. Moroni M, Soldatenkov V, Zhang L, et al. Progressive loss of Syk and abnormal proliferation in breast cancer cells. *Cancer Res*. 2004;64(20):7346-7354.
20. Bailet O, Fenouille N, Abbe P, et al. Spleen tyrosine kinase functions as a tumor suppressor in melanoma cells by inducing senescence-like growth arrest. *Cancer Res*. 2009;69(7):2748-2756.
21. Goodman PA, Wood CM, Vassilev A, Mao C, Uckun FM. Spleen tyrosine kinase (Syk) deficiency in childhood pro-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene*. 2001;20(30):3969-3978.
22. Hahn CK, Berchuck JE, Ross KN, et al. Proteomic and genetic approaches identify Syk as an AML target. *Cancer Cell*. 2009;16(4):281-294.
23. Wu J, Meng F, Lu H, et al. Lyn regulates BCR-ABL and Gab2 tyrosine phosphorylation and c-Cbl protein stability in imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia cells. *Blood*. 2008;111(7):3821-3829.
24. O'Bryan JP, Frye RA, Cogswell PC, et al. a, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol*. 1991;11(10):5016-5031.
25. Neubauer A, Fiebler A, Graham DK, et al. Expression of a, a transforming receptor tyrosine kinase, in normal and malignant hematopoiesis. *Blood*. 1994;84(6):1931-1941.
26. Goruppi S, Ruaro E, Varnum B, Schneider C. Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway and Src for Gas6-Axl mitogenic and survival activities in NIH 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol*. 1997;17(8):4442-4453.
27. Braunger J, Schleithoff L, Schulz AS, et al. Intracellular signaling of the Ufo/Axl receptor tyrosine kinase is mediated mainly by a multi-substrate docking-site. *Oncogene*. 1997;14(22):2619-2631.
28. Bromann PA, Korkaya H, Courtneidge SA. The interplay between Src family kinases and receptor tyrosine kinases. *Oncogene*. 2004;23(48):7957-7968.
29. Paolini R, Molfetta R, Beitz LO, et al. Activation of Syk Tyrosine Kinase Is Required for c-Cbl-mediated Ubiquitination of FcεRI and Syk in RBL Cells. *J Biol Chem*. 2002;277(40):36940-36947.
30. Swaminathan G, Tsyngankov AY. The Cbl family proteins: Ring leaders in regulation of cell signaling. *J Cell Physiol*. 2006;209(1):21-43.
31. Caligiuri MA, Briesewitz R, Yu J, et al. Novel c-CBL and CBL-b ubiquitin ligase mutations in human acute myeloid leukemia. *Blood*. 2007;110(3):1022-1024.
32. Zimmerman EI, Dollins CM, Crawford M, et al. Lyn kinase-dependent regulation of miR181 and myeloid cell leukemia-1 expression: implications for drug resistance in myelogenous leukemia. *Mol Pharm*. 2010;78(5):811-817.
33. Lay J-D, Hong C-C, Huang J-S, et al. Sulfasalazine Suppresses Drug Resistance and Invasiveness of Lung Adenocarcinoma Cells Expressing AXL. *Cancer Res*. 2007;67(8):3878-3887.
34. Uekita T, Jia L, Narisawa-Saito M, Yokota J, Kiyono T, Sakai R. CDCP-1 is a novel regulator of anoikis resistance in lung adenocarcinoma. *Mol Cell Biol*. 2007;27(21):7649-7660.
35. Zhang Y-X, Knyazev PG, Cheburkin YV, et al. AXL Is a Potential Target for Therapeutic Intervention in Breast Cancer Progression. *Cancer Res*. 2008;68(6):1905-1915.
36. Liu L, Greger J, Shi H, et al. Novel Mechanism of Lapatinib Resistance in HER2-Positive Breast Tumor Cells: Activation of AXL. *Cancer Res*. 2009;69(17):6871-6878.
37. Ptasznik A, Nakata Y, Kalota A, Emerson SG, Gewirtz AM. Short interfering RNA (siRNA) targeting the Lyn kinase induces apoptosis in primary, and drug-resistant, BCR-ABL1(+) leukemia cells. *Nat Med*. 2004;10(11):1187-1189.
38. Wu J, Meng F, Kong L-Y, et al. Association Between Imatinib-Resistant BCR-ABL Mutation-Negative Leukemia and Persistent Activation of LYN Kinase. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100(13):926-939.

=====

Article publié

- **Mycophenolic acid overcomes imatinib and nilotinib resistance of chronic myeloid leukemia cells by apoptosis or a senescent-like cell cycle arrest.** Claire Drullion¹, Valérie Lagarde¹, Romain Gioia¹, Patrick Legembre², Muriel Priault³, Bruno Cardinaud¹, Eric Lippert¹, François-Xavier Mahon¹, Jean-Max Pasquet¹
Leukemia Research and Treatment. 2011

Articles en soumission

- **Imatinib-induced K562 leukemia cells senescence is potentialized by caspase inhibition and autophagy.** Claire Drullion¹, Valérie Lagarde¹, Sisareuth Tan², Romain Gioia¹, Muriel Priault³, Alain Brisson², François-Xavier Mahon¹, Jean-Max Pasquet¹.
Soumis à Cell Death and Disease

Articles en préparation

- **Overexpression of Bcr-Abl in dasatinib resistant cells : a model of study of Bcr-Abl mediated OIS.** Claire Drullion¹, Valérie Lagarde¹, Romain Gioia¹, Muriel Priault³, Eric Lippert¹, François-Xavier Mahon¹, Jean-Max Pasquet¹.

Posters

- **“Overcoming tyrosine kinase inhibitor resistance in CML : step forward on non apoptotic death”** Claire Drullion, Valérie Lagarde, Romain Gioia, Patrick Legembre, François-Xavier Mahon, Jean-Max Pasquet.
Journée IFR, Bordeaux 2009
- **“Resistance to TKI in CML: How can a cancer cell die?”** Drullion Claire, Lagarde Valérie, Gioia Romain, Legembre Patrick, Mahon François-Xavier, Pasquet Jean-max.
European Cell Death Organisation, Paris 2009

- **“ Contrecarrer la résistance aux ITK par des morts non apoptotiques” Drullion Claire**, Lagarde Valérie, Gioia Romain, Legembre Patrick, Mahon François-Xavier, Pasquet Jean-max.
Société Française Hématologie, Paris 2010
- **“Overexpression of Bcr-Abl demonstrates a hierarchical Pathway between apoptosis and senescence” Claire Drullion**, Valérie Lagarde, Romain Gioia, Fiona Jasson, François-Xavier Mahon, Jean-Max Pasquet.
European Society of Hematology, Washington 2010
- **“Cell deaths induced by TKI in CML” Claire Drullion**, Valérie Lagarde, Clémentine Bouneau, François Moreau-Gaudry, Muriel Priault, Romain Gioia, François-Xavier Mahon, Jean-Max Pasquet.
Société Française Hématologie, Paris 2011

Communications orales

- **“Overexpression of Bcr-Abl demonstrates a hierarchical Pathway between apoptosis and senescence” Claire Drullion**, Valérie Lagarde, Romain Gioia, Fiona Jasson, François-Xavier Mahon, Jean-Max Pasquet.
European Society of Hematology, Washington 2010
- **“ Autophagy, Senescence, Apoptosis of CML cells by TKI ” Claire Drullion**
Journée de la LMC, Bordeaux 2011