

UNIVERSITE PARIS DESCARTES (Paris V)
INSTITUT COCHIN

Ecole doctorale : Biologie et biotechnologie B2T
Spécialité : Hématologie

Laboratoire de rattachement : Département d'immuno-hématologie,
Inserm U1016 Hématopoïèse normale et pathologique

**Implication de la glutamine dans l'activation de
mTORC1 dans les leucémies aiguës myéloïdes et
inhibition ciblée**

Auteur : Lise WILLEMS

Thèse dirigée par : Monsieur le Professeur Didier Bouscary

Soutenue le : 25 octobre 2012

Devant le jury composé de :

Madame le Professeur Christine Chomienne

Monsieur le Dr Stéphane Manenti

Monsieur le Pr François-Xavier Mahon

Monsieur le Professeur Hervé Dombret

Monsieur Jean-François Peyron

REMERCIEMENT

Je remercie avant tout le Pr Catherine Lacombe et le Dr Patrick Mayeux qui m'ont accueillie au sein de leur équipe pendant ces quelques années et plus particulièrement Didier Bouscary, qui a dirigé mon travail de thèse et m'a soutenue tout au long de cette période, mais également :

Nathalie Jacque avec qui j'ai agréablement travaillé en binôme sur le projet L-asparaginase et qui promène sa bonne humeur de paillasse en paillasse

L'ensemble des étudiants et titulaires du groupe LAM qui ont, un jour ou l'autre, partagé notre petit bureau dépourvu de fenêtre parmi lesquels Jérôme Tamburini, Sophie Park, Alexa Green, Nicolas Chapuis, Valérie Bardet, Maître Yoda, Marie-Anne Hospital, Kévin Adam, Pierre Sujobert, Sylvain Pilorge, Stéphanie avec une attention plus particulière à Laury Poulain pour ses gels parfaits et Laure Joseph pour ses talents culinaires...

Le 7^{ème} étage du bâtiment Gustave Roussy solidaire dans l'adversité des pannes d'ascenseurs, coupure de courant, filet « anti-suicide », et autres sortes d'obstacles qui pimentent nos journées, avec un petit mot pour Frédérique Verdier toujours disponible pour répondre aux questions incessantes et avec le sourire...

L'ensemble de nos collaborateurs de Bichat, Nice et Tour

Les patients qui nous ont fait don de leur prélèvement et les cliniciens et biologistes des services d'hématologie de Cochin et de La pitié-Salpêtrière qui pensent à nous régulièrement

Les membres du jury qui, je l'espère, ne se sont pas trop ennuyés

Ma famille toujours prête à se relayer auprès des enfants quand nécessaire, et même plus...

Mes fistons qui ne m'en ont pas trop voulu, j'espère, de les avoir délaissé quelques WE pour mes cellules, mais cela seule la psychanalyse nous le dira dans quelques décennies...

Et tous ceux que j'oublie...

RESUME/MOTS CLES

Dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM), l'activation anormale de nombreuses voies de signalisation intracellulaires favorise la croissance et la survie des cellules tumorales. L'amélioration des connaissances biologiques de ces pathologies hétérogènes, dont le pronostic est réservé, devrait permettre le développement de thérapies ciblées. La kinase oncogénique mTOR est présente au sein de deux complexes, parmi lesquels mTORC1, activé constitutivement dans la majorité des blastes primaires de patients porteurs de LAM, qui contrôle la synthèse protéique, et mTORC2 activé constitutivement dans 50% des LAM. Les inhibiteurs allostériques de mTORC1 (la rapamycine et ses dérivés) n'inhibent pas la phosphorylation du répresseur traductionnel 4E-BP1, ne diminuent pas la traduction et induisent peu d'apoptose in vitro dans les LAM. Utilisés en monothérapie, leur effet est décevant. De plus ces inhibiteurs n'agissent pas sur le complexe mTORC2. J'ai étudié l'effet d'un inhibiteur catalytique de mTOR, l'AZD8055, actif sur les deux complexes. In vitro, l'AZD8055 inhibe efficacement la signalisation en aval de mTORC1 et de mTORC2, dont les sites de phosphorylation de 4E-BP1 résistants à la rapamycine, ainsi que la synthèse protéique. Il diminue la prolifération, bloque le cycle cellulaire en phase G0G1 et induit une apoptose caspase-dépendante dans les blastes primaires de LAM. Il diminue également la clonogénicité des progéniteurs leucémiques, sans affecter celle des cellules CD34+ normales. Dans un modèle murin de xéno-transplantation, l'AZD8055 inhibe la croissance tumorale et améliore la survie des souris traitées. Je me suis également intéressée à la régulation de l'activité de mTORC1 par les acides aminés. Dans les cellules de mammifères, l'activation de mTORC1 nécessite la présence de glutamine et de leucine qui agissent en coopération via deux transporteurs membranaires, SLC1A5 et SLC7A5/SLC3A2. J'ai montré que la privation en glutamine, obtenue par l'activité glutaminase de la drogue L-asparaginase ou par l'utilisation de milieux de culture spécifiques dépourvus sélectivement en acides aminés, inhibe l'activation de mTORC1 et induit de l'apoptose dans diverses lignées leucémiques et dans les blastes primaires de LAM. La L-asparaginase inhibe la synthèse protéique et ses effets fonctionnels sont liés à son activité glutaminase. J'ai pu également constater une augmentation de l'expression protéique de la glutamine synthase induite par la L-asparaginase, dont l'inhibition majore l'apoptose induite par la L-asparaginase dans certaines lignées leucémiques. J'ai également étudié l'effet de l'inhibition spécifique par un shARN inductible du transporteur SLC1A5, qui permet l'import de glutamine. L'inhibition de SLC1A5 bloque la réactivation de mTORC1 par l'association leucine/glutamine après

privation et induit de l'apoptose dans la lignée leucémique MOLM14. Cette inhibition diminue la croissance tumorale dans un modèle de xéno greffe.

Mots clés : LAM, mTOR, AZD8055, Tokinhib, L-asparaginase, glutamine

ABSTRACT

Acute myeloid leukaemias (AML) are heterogeneous diseases associated with poor prognosis. In AML, aberrant activation of many signaling pathways enhances proliferation and survival of leukemic blast cells. Understanding the mechanisms underlying survival of tumoral cells should allow the development of targeted therapies. The oncogenic kinase mTOR belongs to two distinct multimeric complexes. mTORC1 that controls protein translation, is constitutively activated in most of primary blast cells at AML diagnosis, while mTORC2 is constitutively activated in about half of AML samples. In AML, some phosphorylation events of the translational repressor 4E-BP1, are resistant to allosteric inhibitors of mTORC1 including rapamycin and its analogs. These first generation inhibitors of mTORC1 have only few effects on AML and do not induce significant apoptosis in vitro. I have tested a second generation mTOR kinase inhibitor active on both mTORC1 and mTORC2 complexes. In vitro, AZD8055 blocked mTORC1 and mTORC2 signaling, including 4E-BP1 rapamycin resistant phosphorylation events and protein synthesis. This compound decreased AML blast cells proliferation and cell cycle progression, reduced the clonogenic growth of leukemic progenitors and induced caspase-dependant apoptosis in leukemic cells but not in normal immature CD34+ cells. Finally, AZD8055 reduced tumor growth and improved survival in xenografted mouse model. In the second part of this work, I have studied the regulation of mTORC1 by amino acids in AML. In mammalian cells, activation of mTORC1 requires the presence of glutamine and leucine acting together via two membrane transporters, SLC1A5 and SLC7A5/SLC3A2. I showed that glutamine deprivation, obtained by L-asparaginase glutaminase activity or specific alpha-MEM use, inhibited mTORC1 and induced apoptosis in AML cell lines and primary AML blasts. L-asparaginase also inhibited protein synthesis and I have observed a correlation between the functional effects of L-asparaginase and its glutaminase activity. L-asparaginase induced an up-regulation of glutamine synthase (GS) protein and shRNA-induced GS inhibition increased L-asparaginase-dependant apoptosis in the MV4-11 AML cell line. I have also studied the effects of SLC1A5 inhibition with an inducible shRNA expressed in MOLM14 cells. Inhibition of this high affinity transporter for glutamine blocked mTORC1 stimulation by leucine and glutamine after deprivation and induced apoptosis in MOLM-14 cell line. SLC1A5 inhibition reduced tumor growth and improved survival in transplanted mice.

Key words: Acute myeloid leukemia, mTOR, AZD8055, Tokinhib, L-asparaginase, glutamine

Sommaire

1. Introduction	11
2. Les leucémies aiguës myéloïdes	12
2.1 Généralités.....	12
2.1.1 Epidémiologie	12
2.1.2 Classification OMS	12
2.1.3 Pronostic et traitement.....	14
2.2 Physiopathologie des LAM.....	15
2.2.1 Evènements favorisant un blocage de différenciation.....	16
a. Exemple des LAM à Core Binding Factor (CBF).....	16
b. Autres anomalies responsables d'un blocage de différenciation.....	17
2.2.2 Evènements conférant aux cellules un avantage prolifératif.....	18
a. Anomalies du récepteur FLT3.....	18
b. Anomalies du récepteur c-Kit.....	19
c. Anomalies N-Ras, K-Ras	19
2.2.3 Dérégulation des voies de signalisation dans les LAM.....	19
a. la voie PI3K/AKT	20
b. la voie mTOR.....	23
c. Autres voies de signalisation dérégulées dans les LAM.....	24
3. Voie de signalisation mTOR	25
3.1 La kinase mTOR	25
3.2 Le complexe mTORC1	26
3.2.1 Composition	26
3.2.2 Substrats et Fonctions.....	27
a. Protéines S6 kinases.....	27
b. eIF4E Binding Proteins (4E-BPs) et rôle de mTOR dans la synthèse protéique.....	29
c. Substrats impliqués dans l'autophagie.....	32
d. Autres substrats	32
3.2.3 Régulation	33
a. Récepteurs aux facteurs de croissance.....	33
b. Axe LKB1/AMPK.....	34
c. Acides aminés	35
d. Autres mécanismes de régulation.....	37
3.2.4 Rôle oncogénique	38
3.3 Le complexe mTORC2	39
3.3.1 Composition	39
3.3.2 Substrats	40
3.3.3 Régulation	40
3.3.4 Rôle oncogénique.....	41
3.4 Interactions entre les différentes voies de signalisation	42
3.4.1 Rétrocontrôle négatif de mTORC1 sur la voie PI3K	42
3.4.2 Autres interactions entre mTORC1 et mTORC2	42
3.4.3 Interactions avec d'autres voies de signalisation	43
3.5 Les inhibiteurs de mTOR	43
3.5.1 Inhibiteurs de première génération.....	43
3.5.2 Inhibiteurs de seconde génération	44
4. Glutamine et cancer.....	45
4.1 L'import de glutamine.....	47

4.1.1 Généralités.....	47
4.1.2 Le transporteur SLC1A5	48
<i>a. Données générales</i>	48
<i>b. Rôle oncogénique</i>	48
4.1.3 Autres transporteurs de glutamine impliqués en oncogénèse	49
4.2 Métabolisme de la glutamine	50
4.2.1 La glutaminolyse	50
4.2.2 Synthèse de glutamine.....	51
4.2.3 Réactions biochimiques cellulaires impliquant la glutamine et ses dérivés.....	51
4.2.4 Autres fonctions de la glutamine.....	52
<i>a. Activation de mTORC1</i>	52
<i>b. La glutamine comme substrat mitochondrial</i>	52
4.3 Mécanismes d'addiction à la glutamine	53
4.3.1 Niveau d'expression de la glutamine synthase et des glutaminases	53
4.3.2 Rôle de l'oncogène c-Myc	54
4.3.3 Autres voies impliquées	54
<i>a. La voie NFκ-B</i>	55
<i>b. La voie Raf-MEK-ERK</i>	55
<i>c. La voie Wnt/β-caténine</i>	55
4.4 Outil thérapeutique à activité glutaminase, la L-asparaginase	56
4.4.1 Généralités.....	56
4.4.2 Rôle de l'activité glutaminase de la L-asparaginase	57
<i>a. Données cliniques sur les taux d'AA sériques</i>	57
<i>b. Historique : développement d'enzymes à activité glutaminase</i>	58
4.4.3 Voies de signalisation régulées par la L-asparaginase	58
<i>a. La voie GCN</i>	59
<i>b. La voie mTORC1</i>	59
4.4.4 Glutamine synthase et résistance à la L-asparaginase.....	60
4.4.5 Données dans les LAM	61
5. Résultats	63
5.1 L'AZD8055, inhibiteur catalytique de mTOR, a un effet anti-leucémique	63
5.2 La L-asparaginase, par son activité glutaminase, a une activité pro-apoptotique dans les LAM	65
6. Discussion et perspectives.....	78
7. Annexes	81
7.1 Effets anti-leucémiques de l'AZD8055 : article	82
7.2 Effets anti-leucémiques de l'AZD8055 : figures supplémentaires	91
7.3 PI3K and mTOR signaling pathways in cancer: new data on targeted therapies. Revue	100
7.4 La L-asparaginase, par son activité glutaminase, a une activité pro-apoptotique dans les LAM : données supplémentaires.....	100
8. Références bibliographiques	115

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS

- AA: acides aminés
- AA(N)E: acides aminés (non) essentiels
- AGC: cAMP dependant protein kinase, cGMP dependant protein kinas, Protein Kinase C subfamily
- Akt: PKB, protein kinase B
- AMPK: Adenosine monophosphate-activated protein kinase
- ARNm: acide ribonucléique messenger
- ASN: asparagine
- ASNS: asparagine synthase
- BAD: Bcl-2/Bcl-X(L)-antagonist, causing cell death
- CBF: core binding factor
- Cycle TCA: cycle des acides tricarboxyliques
- DEPTOR: DEP domain containing mammalian target of rapamycin (mTOR)-interacting protein
- DNMT3A: DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A
- eIF2 α : eukaryotic translation initiation factor 2 α
- eIF4E: eukaryotic initiation factor 4E
- ERK: extracellular signal-regulated kinase
- FLT3-ITD: Fms like tyrosine kinase 3- Internal Tandem Duplication
- FOXO: forkhead box class O
- GAB: Grb2 associated kinase
- GAC: glutaminase C
- GAP: guanine triphosphate GTPase activating protein
- G β L: G protein β sub-unit like protein
- GCN: general control nonrepressed
- GDH: glutamate deshydrogénase
- GLN: glutamine
- GLS: glutaminase
- GLU: glutamate
- GS: glutamine synthase
- GSK3: glycogen synthase kinase-3
- HEAT: Huntingtin, EF3, A subunit of PP2A and TOR
- HIF-1: hypoxia inducible factor
- IDH: isocitrate deshydrogénase
- IGF1: insulin growth factor 1
- IKK: I κ B kinase
- I κ B: inhibitor of NF- κ B
- IRS: insulin receptor substrate
- kDa: kiloDalton
- LAM: leucémie aiguë myéloïde

- LAL : leucémie aiguë lymphoblastique
- L-ASE : L-asparaginase
- MAPK: mitogen activated protein kinase
- MDM2: transformed 3T3 cell double-minute 2 p53-binding protein
- MLL-PTD: Mixed Lineage Leukemia gene- Partial Tandem Duplication
- mLST8: mammalian lethal with SEC13 protein 8
- mTOR: mechanistic target of rapamycin
- NF-κB: Nuclear factor κB
- PDK1: PIP3 Dependant-Kinase
- PH: pleckstrin homology
- PIKK: phosphatidylinositol-3-kinase related kinase
- PI3K: phosphatidylinositol-3-kinase
- PKC-α : protein kinase C-α
- PRAS40: proline-rich Akt substrate of 40-kDa
- Raptor: protein observed with Rictor
- PTEN: phosphatase and tensin homologue
- p27^{kip1}: cyclin-dependant kinase inhibitor p27
- P70S6K: p70 ribosomal S6 kinase
- Raptor : regulatory associated protein of mTOR
- RBL2: Retinoblastoma-like 2
- Rheb: small G protein Ras homologue enriched in brain
- Rictor: rapamycine insensitive companion of mTOR
- rpS6: ribosomal protein S6
- RTK: récepteur tyrosine kinase
- SCF: stem cell factor
- Ser: serine
- SGK: serum-and glucocorticoid-induced protein kinase 1
- shARN: small hairpin ARN
- SHIP: SH2-domain-containing inositol-5-phosphatase
- siARN: small interference ARN
- SIN1: SAPK interacting protein
- SLC1A5: Solute carrier family 1 member 5
- SLC7A5: Solute carrier family 7 member 5
- STAT: signal transducer and activator of transcription
- S6K1: p70 ribosomal S6 kinase
- TET: *Ten*-Eleven-Translocation
- Thr: thréonine
- TSC2: tuberous sclerosis complex (tuberin)
- WT1: Wilms' tumor suppressor
- 4E-BP1: eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1

LISTE DES FIGURES

-Figure 1. Diversité des anomalies moléculaires dans les LAM.....	p15
-Figure 2. La voie de signalisation des PI3K de classe I.....	p21
-Figure 3. Structure de la sérine/thréonine kinase mechanistic Target Of Rapamycin (mTOR) et des deux complexes mTORC1 et mTORC2.....	p25
-Figure 4. Structure et fonctions de S6K1.....	p29
-Figure 5. Les principales cibles de mTORC1.....	p30
-Figure 6. Complexe 48S d'initiation de la traduction.....	p31
-Figure 7. Régulation de mTORC1 en aval des facteurs de croissance.....	p34
-Figure 8. Régulation de mTORC1 par les acides aminés.....	p37
-Figure 9. Régulation et cibles de mTORC2.....	p41
-Figure 10. Cibles des inhibiteurs catalytiques de mTOR, exemple de l'AZD8055.....	p45
-Figure 11. Différence de métabolisme entre cellules quiescentes et cellules en prolifération.....	p46
-Figure 12. Catabolisme de la glutamine.....	p52
-Figure 13. Métabolisme de la glutamine : régulation et fonctions.....	p56

1. Introduction

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sont des maladies hétérogènes, caractérisées par l'acquisition d'anomalies génétiques et épigénétiques au sein d'un compartiment de progéniteurs myéloïdes, qui favorisent leur prolifération et leur survie et induisent un blocage précoce de leur différenciation. Récemment, les nouvelles techniques de séquençage à haut débit ont permis la mise en évidence d'un nombre croissant d'anomalies moléculaires dérégulant l'expression de gènes et d'ARN non codants dans ces pathologies, expliquant la diversité à la fois de leur présentation clinico-biologique et de leur réponse thérapeutique. De ce fait, la classification WHO (World Health Organization) actuelle, qui vise à déterminer des sous-groupes de pronostics différents, repose essentiellement sur la présence d'anomalies génétiques. Toutefois, les liens entre ces anomalies génétiques et les mécanismes biologiques qui sous-tendent la croissance des cellules leucémiques ne sont pas encore clairement établis. En raison du pronostic très péjoratif de ces pathologies malgré les chimiothérapies actuelles et les techniques d'intensification avec autogreffe ou allogreffe chez les patients les plus jeunes, il demeure nécessaire de développer des thérapeutiques ciblées, dirigées spécifiquement contre le clone leucémique. Dans les LAM, la dérégulation de nombreuses voies de signalisation intracellulaires participe au développement tumoral en favorisant la croissance des cellules tumorales au détriment des cellules saines environnantes. Parmi ces voies, il est maintenant bien établi que la voie mTOR (mechanistic Target Of Rapamycine) est constitutivement activée dans les cellules leucémiques, ceci indépendamment du sous-type de LAM. Les travaux antérieurs du laboratoire dans lequel j'ai réalisé ma thèse soulignent l'importance de cette voie qui favorise la survie du clone leucémique. La kinase mTOR appartient à deux complexes différents dans leur structure et leur fonctionnalité, mTORC1 et mTORC2. Mes travaux de recherche se sont orientés autour de deux grands axes que je présenterai successivement. Tout d'abord, je me suis intéressée à l'effet anti-leucémique d'une nouvelle génération d'inhibiteurs de mTOR, qui agissent directement sur le site catalytique de la kinase et sont donc capables d'inhiber son activité au sein des différents complexes dans lesquels elle intervient. J'ai ainsi testé l'effet de l'AZD8055 dans les LAM. D'autre part, il est connu que l'activation de mTORC1 dépend de la concentration intracellulaire en acides aminés, principalement en leucine et en glutamine. J'ai donc testé l'effet dû à l'inhibition du transporteur de la glutamine, SLC1A5, impliqué dans le contrôle de mTORC1 par les acides aminés dans les cellules de mammifères, ainsi que celui de la L-

asparaginase, qui dégrade l'asparagine et la glutamine dans le milieu extracellulaire, par ses activités d'asparaginase et de glutaminase respectivement, dans les LAM.

2. Les leucémies aiguës myéloïdes

2.1 Généralités

2.1.1 Epidémiologie

Les leucémies aiguës myéloïdes sont des pathologies acquises, définies par la prolifération clonale d'un progéniteur myéloïde immature bloqué dans sa différenciation (blaste). Elles représentent 70% des leucémies aiguës de l'adulte. La croissance et l'accumulation des cellules leucémiques dans la moelle osseuse et le sang, au détriment des cellules hématopoïétiques normales, expliquent les principaux symptômes de cette maladie (fatigue, saignement, infection, dyspnée...) en rapport avec l'insuffisance médullaire et la leucostase, présente lorsque le chiffre de leucocytes circulants excède 50G/L. Le diagnostic est établi par la ponction de moelle osseuse lorsqu'il existe un infiltrat de blastes représentant 20% ou plus des cellules nucléées.

L'incidence des LAM est de 2,3 pour 100 000 habitants avec un âge médian de 65 ans lors du diagnostic. Environ 12 000 cas par an sont diagnostiqués chez les adultes aux Etats-Unis. A l'exception des leucémies aiguës promyélocyaires, dont le traitement à base d'acide transrétinoïque a modifié considérablement le pronostic avec plus de 75% de guérison, les autres sous-types de LAM ont un pronostic réservé avec les traitements actuels (9000 morts par an aux Etats-Unis). Ainsi, bien que le taux de rémission complète obtenue après chimiothérapie standard incluant une anthracycline et de l'aracytine atteigne 70-80% chez les patients de moins de 60 ans, la majorité d'entre eux rechute et le taux de survie globale est seulement de 40-45% à 5 ans (Fernandez et al., 2009). De plus, le pronostic s'altère avec l'âge avancé. Après 60 ans, le taux de rémission complète est plus faible et la survie médiane inférieure à 1 an. Malgré les progrès croissant concernant la biologie des LAM, le pronostic réservé propre à cette tranche d'âge ne s'est pas amélioré significativement au cours des dernières décennies.

2.1.2 Classification OMS

La découverte croissante d'anomalies moléculaires redondantes, dont la valeur pronostic est plus ou moins bien établie, souligne l'hétérogénéité biologique des LAM. Ainsi, à côté des

facteurs classiques de pronostic péjoratif intrinsèques à la maladie ou liés au patient (hyperleucocytose supérieure à 30G/L, âge supérieur à 60 ans, comorbidités) ont été décrites des anomalies cytogénétiques et moléculaires dont la valeur pronostique majeure oriente la prise en charge thérapeutique. Au diagnostic, en plus des analyses cytologiques et immunophénotypiques, il est donc justifié de réaliser un examen cytogénétique sur le sang ou sur la moelle osseuse ainsi que des analyses de biologie moléculaire afin de rechercher respectivement des réarrangements chromosomiques, présents dans environ 55% des échantillons, et la présence entre autres anomalies de transcrits de fusion (*RUNX1-RUNX1T1*, *CBFβ-MYH11*, *PML-RARα*). Les techniques de biologie moléculaire permettent également de détecter des mutations acquises dans certains gènes (*FLT3*, *NPM*, *DNMT3A*, *IDH1* et *2*, *CEBPA*, *TET2*) et la surexpression de gène (*WT1*). Les résultats de ces examens sont utiles pour établir le pronostic de la LAM et servent pour certains d'entre eux au suivi de la maladie résiduelle après traitement. Ils permettent de définir les LAM selon les quatre catégories suivantes, d'après la classification OMS de 2008:

- LAM avec anomalies génétiques récurrentes:

- LAM avec t(8;21)(q22;q21); *RUNX1-RUNX1T1*
- LAM avec inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); *CBFβ-MYH11*
- Leucémie aiguë promyélocytaire avec t(15;17)(q22;12); *PML-RARα* et ses variantes
- LAM avec t(6;9)(p23;q34); *DEK-NUP214*
- LAM avec inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); *RPN1-EVII*
- LAM mégacaryoblastique avec t(1;22)(p13;q13); *RBM15-MKLI*
- Deux entités provisoires : LAM avec mutation de *NPM1* et LAM avec mutation *CEBPA*

- LAM avec myélodysplasie:

- LAM post-syndrome myélodysplasique
- LAM avec anomalies cytogénétiques associées aux SMD
- LAM avec dysplasie d'au moins 50% des éléments de deux lignées myéloïdes

- LAM secondaires à des traitements à base de chimiothérapie et/ou radiothérapie

- LAM difficilement classables

Pour ce dernier groupe, la classification FAB (French American British) basée sur le degré de différenciation des progéniteurs myéloïdes est utilisée.

2.1.3 Pronostic et traitement

La prise en charge thérapeutique des patients atteints de LAM est adaptée au niveau de risque de la maladie. Celui-ci était initialement déterminé en fonction des résultats cytogénétiques au diagnostic. Plus récemment, l'amélioration des connaissances concernant la valeur pronostique des principales anomalies moléculaires récurrentes a permis de distinguer des catégories au sein du groupe de pronostic intermédiaire (caryotype normal). On distingue donc actuellement les sous-groupes suivants :

- **Le groupe à cytogénétique dite « favorable »**, correspondant aux LAM-CBF (t(8;21) ; inv(16) ou t(16;16)) qui regroupe 25% des patients. Dans ce groupe, ont été inclus les patients avec un caryotype normal (CN-LAM) et mutation de NPM1 sans mutation FLT3-ITD associée et les CN-LAM avec mutation bi-allélique de CEBPA.

- **Le groupe à cytogénétique « intermédiaire »** qui inclue les patients à caryotype normal (45 à 60% des cas). Au sein de ce groupe, la détection de FLT3-ITD ou MLL-PTD (~30% et 8% des CN-LAM, respectivement) sont de pronostic défavorable, ainsi que la surexpression des gènes BAALC et ERG.

- **Le groupe à cytogénétique « défavorable »** regroupant les patients à caryotype complexe (10 à 15% des LAM) défini par la présence de 3 anomalies génétiques ou plus, en dehors des anomalies récurrentes selon la classification OMS 2008. Les lésions les plus courantes observées au sein de ce groupe de pronostic particulièrement défavorable sont des pertes (le plus souvent: -5/5q-, -7/7q-, -17/17p-, -18/18q-, 12p- et -16/16-), ou gains de matériel chromosomique (+8/+8q, +21/+21q, +11q, et +22q).

Toutefois, des précisions seront probablement apportées dans l'avenir à cette classification, au vu des résultats récents de la cohorte allemande, portant sur l'analyse de la valeur pronostique de 18 mutations dans les LAM de novo des sujets de moins de 60 ans, traités de façon homogène (Patel et al., 2012). Certaines mutations très fréquentes ne sont en effet actuellement pas prises en compte dans cette classification pronostique (comme par exemple les mutations de DNMT3a, retrouvées chez près d'un quart des patients, associées à un mauvais pronostic). La figure 1 illustre la diversité des anomalies moléculaires présentes dans les LAM ainsi que la fréquence de leurs associations.

Le traitement d'induction des LAM, en dehors de la leucémie aiguë promyélocytaire, repose sur la même association de chimiothérapie (aracytine et anthracycline) depuis 40 ans. Les patients en rémission complète après induction, bénéficient ensuite d'un traitement de

consolidation soit par chimiothérapie (aracytine forte dose), soit par autogreffe ou allogreffe de cellules souches hématopoïétiques selon le groupe pronostic auquel ils appartiennent (Roboz, 2011). Chez les sujets de plus de 60 ans, d'autres molécules, testées en monothérapie ou en association avec l'aracytine, apparaissent intéressantes avec un profil de toxicité acceptable dans cette population fragile (clofarabine et decitabine). En ce qui concerne les thérapies ciblées, certains inhibiteurs de FLT3 en cours d'essais cliniques (sorafenib, AC220) semblent prometteurs; le dasatinib est testé dans les LAM CBF avec mutations de KIT et l'anticorps cytotoxique anti-CD33 (gemtuzumab ozogamicin) pourrait trouver sa place dans les LAM à cytogénétiques favorables, pour ne citer que quelques exemples.

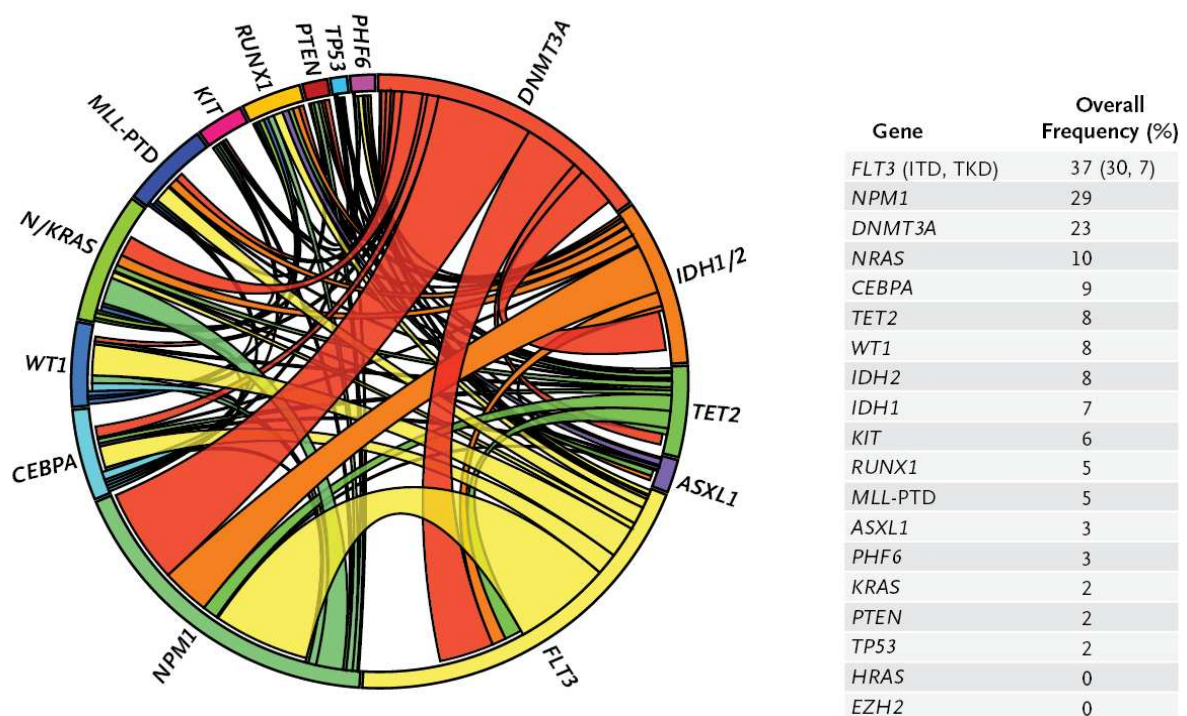


Figure 1. Diversité des anomalies moléculaires dans les LAM. Figure tirée de (Patel et al., 2012)

L'analyse mutationnelle de 18 gènes a été réalisée chez 502 patients de moins de 60 ans avec LAM de novo.

2.2 Physiopathologie des LAM

Les LAM sont caractérisées par un blocage de différenciation ainsi qu'un avantage de survie et de prolifération des cellules tumorales. Un modèle de coopération oncogénique d'au moins deux évènements successifs a été décrit afin d'expliquer le processus de leucémogénèse (Deguchi and Gilliland, 2002). Dans ce modèle, le premier évènement correspond à une anomalie génétique perturbant la fonction de facteurs de transcription, aboutissant au blocage de la différenciation observé (mutations de classe II). Le second évènement favoriserait la

prolifération et la survie cellulaire des blastes de LAM par rapport aux progéniteurs normaux (mutations de classe I) ; il peut s'agir d'anomalies moléculaires aboutissant à l'activation de voies de signalisation intracellulaires comme des mutations de protéines à activité tyrosine kinase.

Les évènements oncogéniques initiaux au potentiel transformant peuvent survenir dans un compartiment de cellules souches, mais également dans des progéniteurs myéloïdes engagés dans un processus de différenciation, auxquels ils confèrent des capacités d'auto-renouvellement. Actuellement, il n'est pas déterminé si la transformation résulte de la mise en place d'un programme commun ou de programmes très proches en aval de mutations différentes, ou alors, si chaque mutation individuelle est responsable de la mise en œuvre d'un programme spécifique, propre à la mutation en question. Cette distinction est toutefois majeure pour le développement de traitements ciblés, dans un cas susceptibles d'être efficaces quelque soit le substratum génétique, et dans l'autre cas, dont l'efficacité dépendrait de la lésion génétique initiale.

2.2.1 Evènements favorisant un blocage de différenciation

a. Exemple des LAM à Core Binding Factor (CBF)

CBF est un facteur de transcription hétérodimérique, constitué des sous-unités AML1/RUNX1/CBFA2 et CBF β , nécessaire au développement hématopoïétique normal. Parmi les gènes qu'il régule, on note l'interleukine 3, C/EBPA dont le rôle majeur dans la différenciation myéloïde est bien connu (Zhang et al., 2002), ainsi que le récepteur au MCS-F et la myéloperoxydase. CBF est dérégulé dans environ 25% des LAM. En effet, plusieurs translocations chromosomiques, parmi lesquelles t(8;21) et inv(16)/t(16;16), sont responsables de la formation de protéines de fusion (respectivement, AML1/ETO et CBF β /MYH11) qui ont un effet dominant négatif sur le complexe CBF résultant de l'allèle normal. Les souris qui expriment l'une ou l'autre de ces protéines chimériques au niveau germinale ne développent pas d'hématopoïèse définitive. Ce phénotype, léthal, est identique à celui observé lorsque les deux allèles des gènes AML1 ou CBF β sont invalidés (Castilla et al., 1996) (Okuda et al., 1996). Cet effet inhibiteur est lié au recrutement aberrant de corépresseurs comme le complexe nucléaire à activité histone désacétylase, N-CoR-mSin3. AML1/ETO peut également avoir d'autres fonctions oncogéniques en plus de son effet sur la différenciation, puisque cette protéine de fusion permettrait de déstabiliser p53 mais également de favoriser l'auto-renouvellement en activant la voie Wnt/ β caténine (Müller-

Tidow et al., 2004). Cependant, plusieurs observations suggèrent que la présence de mutations ou réarrangements impliquant CBF n'est pas suffisante au développement d'une leucémie : i/ la translocation t(8;21) est observée à une fréquence élevée in utero chez des enfants qui développeront ultérieurement une LAM, suggérant qu'il s'agit d'un mécanisme précoce suivi d'une période de latence (Wiemels et al., 2002) ; ii/ le syndrome de thrombopénie familiale avec prédisposition à la LAM (FPD/LAM), qui résulte de mutations perte de fonction du gène AML1, n'évolue pas toujours vers une LAM, et le délai d'apparition est long, suggérant la nécessité de mutations secondaires ; iii/ dans les modèles murins de leucémie CBF, l'expression de CBF β /MYH11 dans le système hématopoïétique favorise un blocage de différenciation myéloïde et prédispose l'animal à la LAM. Il faut toutefois un second évènement qui peut être favorisé par un traitement responsable de dommages à l'ADN, pour que la leucémie se développe (Castilla et al., 1999). Ainsi, chez les patients atteints de LAM avec inv(16), on note la présence fréquente de mutations exclusives de N-RAS, K-RAS, c-Kit ou FLT3 dans 70% des cas. La présence de FLT3-ITD et les mutations de c-KIT coopèrent avec l'inv(16) dans des modèles murins (Kim, Kojima, et al., 2008) (Zheng et al., 2009), de même que les transcrits TEL-PDGFR β et AML1/ETO coopèrent entre eux. Ces anomalies correspondent aux mutations de classe I qui confèrent aux cellules une indépendance aux facteurs de croissance (Müller et al., 2008).

b. Autres anomalies responsables d'un blocage de différenciation

En dehors des réarrangements impliquant CBF, d'autres anomalies peuvent induire un blocage de différenciation dans les LAM, comme les mutations ponctuelles de facteurs de transcription (CEBP/A, AML1, WT1 ou GATA1) ou les réarrangements impliquant MLL, une H3K4 histone méthyltransférase, retrouvés dans environ 4% des LAM. Le potentiel oncogénique des protéines de fusions contenant le domaine de liaison à l'ADN de MLL ainsi que son domaine répresseur associés à l'extrémité N-terminale d'une protéine partenaire comme ENL ou AF4 a été démontré par plusieurs études (Cheung and So, 2011). Les protéines partenaires de MLL permettent le recrutement aberrant de complexes à activité méthyltransférase, qui activent constitutivement la transcription des gènes cibles de MLL et favorisent ainsi la surexpression des gènes HOX, indispensables à la transformation cellulaire (Faber et al., 2009). MLL est également dérégulée par duplication partielle en tandem dans 8% des LAM, ce qui lui confère un effet gain de fonction. La physiopathologie des LAM impliquant MLL souligne l'importance de la modulation des fonctions épigénétiques dans le développement de la leucémie. Ce constat est renforcé par la découverte plus récente de

nombreuses anomalies moléculaires récurrentes impliquées dans la régulation épigénétique dans les LAM. Parmi celles-ci, on note des mutations des gènes de la méthylcytosine hydroxylase TET2 (8-12%), de la DNA méthyltransférase DNMT3A (~23%) ou de la protéine ASXL1 reliée au groupe Polycomb (3-5%). Tout comme les mutations perte de fonction de TET2, les mutations d'IDH1 et IDH2 modifient le profil de méthylation cellulaire, et cela de façon indirecte, par la production de 2-hydroxyglutarate (2-HG), qui inhibe la fonction de l'enzyme α -cétoglutarate dépendante, TET2. Ces mutations d'IDH, qui agissent par une activité néo-enzymatique, sont exclusives des mutations TET2 dans les LAM et, à leur égal, inhibent la différenciation (Figuroa et al., 2010) (Li et al. 2011).

2.2.2 Evènements conférant aux cellules un avantage prolifératif

L'hématopoïèse normale est finement régulée par les cytokines et les facteurs de croissance qui contrôlent la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire. De nombreuses voies de signalisation sont anormalement activées dans les LAM et favorisent la mise en place de processus prolifératifs et anti-apoptotiques. Ces phénomènes résultent souvent de l'activation constitutive -c'est-à-dire, ne répondant plus à une régulation fine par les signaux extracellulaires tels les facteurs de croissance- de récepteurs à activité tyrosine kinase (c-Kit, FLT3) ou de protéines de la voie Ras/MAPK.

a. Anomalies du récepteur FLT3

FLT3 est un récepteur à activité tyrosine kinase de classe III, exprimé à la surface des progéniteurs hématopoïétiques et impliqué dans les développements lymphoïde et myéloïde. Les mutations activatrices de FLT3, soit par duplication en tandem (FLT3-ITD), présentes dans environ 25% des LAM, soit par mutations ponctuelles du domaine kinase (~5% des LAM), sont les plus fréquentes des anomalies moléculaires décrites, et sont retrouvées principalement dans le groupe de LAM à cytogénétique normale. Les mutations ITD de FLT3 s'accompagnent d'un pronostic particulièrement sombre. Contrairement au FLT3 sauvage, dont l'activation est dépendante de son ligand, FLT3-ITD induit une dimérisation et une activation du récepteur indépendante de son ligand. L'expression de FLT3-ITD dans des lignées myéloïdes active constitutivement les voies de signalisation PI3K/AKT, MAPK/ERK et STAT5 et rend les cellules de la lignée cellulaire Baf-3 indépendantes de l'interleukine 3 pour leur croissance (Mizuki et al., 2000) (Brandts et al., 2005). L'expression de ces mutations dans des progéniteurs hématopoïétiques murins normaux transplantés dans la souris induit des syndromes myéloprolifératifs ou lymphoprolifératifs mais n'induit pas de LAM

(Kelly et al., 2002) (Grundler et al., 2005). Plusieurs études chez l'animal, ainsi que les données cliniques d'association d'anomalies moléculaires suggèrent des mécanismes de coopération entre les mutations de FLT3 et certaines mutations de classe II, notamment des gènes CEBP/A (Kato et al., 2011), NPM (Vassiliou et al., 2011) ainsi que des translocations plus rares comme NUP98-HOXD13 (Greenblatt et al., 2012).

b. Anomalies du récepteur c-Kit

Le gène c-Kit code pour un récepteur à activité tyrosine kinase de classe III, c-Kit ou CD117, exprimé dans environ 80% des cas de LAM, dont le ligand est le stem cell factor (SCF). Bien que les mutations activatrices de c-Kit soient présentes dans moins de 5% de l'ensemble des LAM, le groupe de LAM CBF est particulièrement riche en mutations de c-Kit (12 à 48%). Il s'agit majoritairement d'une mutation survenant dans la boucle activatrice du domaine kinase (D816V) ou plus rarement de mutations de l'exon 8, qui modifient la capacité de dimérisation du récepteur. Les effets différentiels de ces deux types de mutations dans les processus de leucémogénèse en coopération avec le transcrite AML1-ETO ont été étudiés chez la souris (Nick et al., 2012). En aval de c-Kit, les voies de signalisation PI3K/AKT et Ras/MAPK sont activées (Masson and Rönstrand, 2009).

c. Anomalies N-Ras, K-Ras

Ras est un pro-oncogène, appartenant à la famille des petites GTPases, qui existe sous trois isoformes : N-Ras, K-Ras et H-Ras. Des mutations de ces trois isoformes ont été décrites dans de nombreuses tumeurs et on rapporte 5 à 10% de mutations de N-Ras dans les LAM, qui sont plus fréquentes que les mutations de K-Ras. Les mutations de H-Ras sont, quant-à-elles, exceptionnelles dans les LAM. Dans les modèles murins d'expression de N-Ras ou K-Ras oncogéniques dans des progéniteurs myéloïdes, les animaux développent des maladies apparentées aux LMMC ou des LAM (Parikh et al., 2006). La voie de signalisation MAPK, située en aval de Ras est activée dans ces modèles ainsi que la protéine S6 ribosomale.

2.2.3 Dérégulation des voies de signalisation dans les LAM

Les anomalies moléculaires décrites précédemment de façon non exhaustive sont responsables de la dérégulation de voies de signalisation, qui favorisent le processus oncogénique. Ce rôle oncogénique repose sur la notion, encore essentiellement démontrée *ex vivo*, d'un phénomène dit « d'addiction élective » à l'activation constitutive d'une voie de signalisation dans une cellule tumorale. Une cellule normale, dans son microenvironnement,

dépend pour sa croissance et sa survie de l'activation harmonieuse et finement régulée de plusieurs voies de signalisation agissant en parallèle et/ou de façon synergique en interconnexion. Ainsi, l'inhibition très ciblée d'une de ces voies de signalisation n'induit le plus souvent pas de mort cellulaire puisque la cellule normale est capable, après une phase de stress qui peut être par exemple l'induction d'un programme d'autophagie, de compenser le déficit par l'activation parallèle d'autres voies de survie. A l'inverse, et cela a été bien étudié pour l'axe de signalisation PI3K/mTORC1, l'activation constitutive de cette voie de signalisation, issue de mutations génétiques de protéines impliquées dans cette voie, rend la cellule tumorale cible dépendante de l'activation de cette voie pour ses principales fonctions (prolifération, survie, croissance). Les mutations de récepteurs membranaires tels FLT3 (20-30%), c-Kit (7-17%) et G-CSFR, ainsi que les mutations de Ras ou la surexpression de VEGF-R, décrites dans les LAM contribuent par exemple à l'activation des voies Ras/Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR et JAK/STAT.

a. la voie PI3K/AKT

Les PI3K de classe IA, classiquement activées en aval des récepteurs à activité tyrosine kinase transmembranaires (RTK) sont constituées d'une sous-unité régulatrice de 85 kDa (p85), pré-associée à une sous-unité catalytique de 110 kDa (p110) dont il existe 3 isoformes, α , β et δ , d'expression cellulaire différente. Après stimulation d'un RTK par son facteur de croissance, la sous-unité p85 s'associe au récepteur phosphorylé sur résidu tyrosine soit directement, soit indirectement par l'intermédiaire d'adaptateurs moléculaires de la famille IRS ou GAB et permet l'activation de la sous-unité catalytique p110 (Figure 2). Celle-ci phosphoryle un résidu inositol de localisation sous-membranaire, le phosphoinositide bis-phosphate (PIP2), en phosphoinositide tris-phosphate (PIP3) qui permet le recrutement à la membrane plasmique de protéines contenant un domaine PH (Pleckstrin-homology), telles PDK1 et la sérine thréonine kinase Akt, principale cible des PI3K. La kinase PDK1 peut alors phosphoryler Akt sur la thr³⁰⁸. Cependant, pour être pleinement active, Akt doit être phosphorylée sur au moins deux résidus: la thr³⁰⁸ (par PDK1) et la ser⁴⁷³ par le complexe mTORC2. La kinase Akt contrôle l'activité de nombreux substrats parmi lesquels ont été particulièrement étudiés les facteurs de transcription de la famille Forkhead et le complexe mTORC1. Akt contrôle positivement la croissance, la prolifération, la survie cellulaire et, via l'activation de mTORC1, inhibe l'autophagie et contrôle la machinerie de synthèse protéique. Les cibles d'Akt sont multiples et incluent cinq effecteurs majeurs: 1/ les facteurs de transcription de la famille FOXO (ou FKHL1) dont la phosphorylation sur trois sites par Akt induit leur

inactivation par transfert du noyau vers le cytoplasme ; Akt bloque ainsi la transcription FOXO-dépendante des inhibiteurs du cycle cellulaire $p27^{kip1}$ et RBL2 et des protéines pro-apoptotiques Bim et Fas-L; 2/ Bad, dont la phosphorylation par Akt bloque l'interaction avec Bcl-XL, qui peut alors jouer son rôle anti-apoptotique; 3/ l'ubiquitine ligase mdm2 qui, phosphorylée par Akt, permet l'inhibition de la protéine p53 par rétention dans le cytoplasme et son envoi en dégradation par le protéasome; 4/ le complexe IKK, dont l'activité kinase est activée par Akt et responsable de l'envoi en dégradation de I κ B, inhibiteur de NF- κ B, dans certains systèmes biologiques; 5/ la protéine TSC2 (tuberin) du complexe TSC1/TSC2, dont la phosphorylation inhibitrice par Akt permet d'activer le complexe mTORC1.

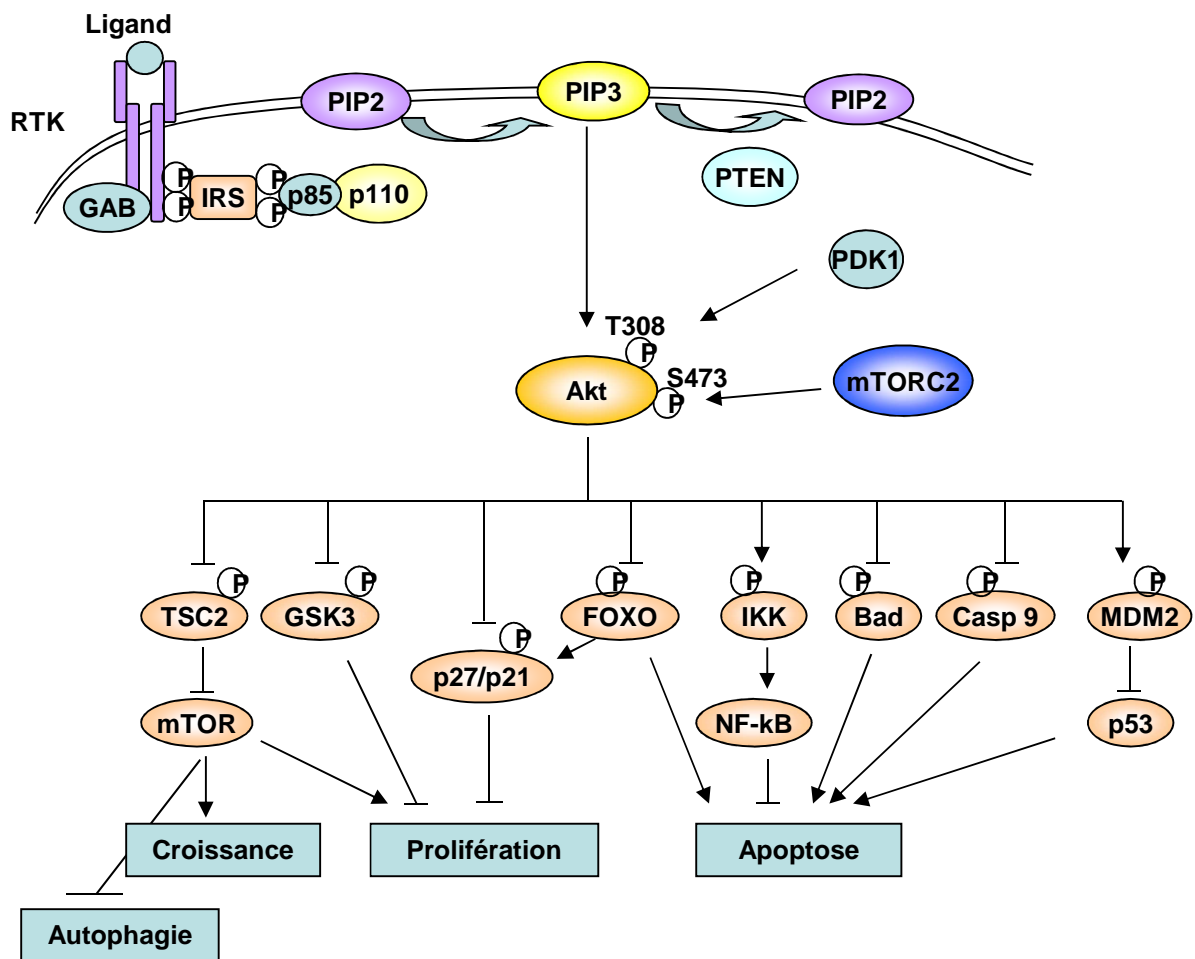


Figure 2. La voie de signalisation des PI3K de classe IA

Bad: Bcl-2/Bcl-X(L)-antagonist, causing cell death; Casp 9: caspase9; FOXO: forkhead box class O; GAB: Grb2 associated kinase; GSK3: glycogen synthase kinase-3; IKK: I κ B kinase; IRS: insulin receptor substrate; NF- κ B: Nuclear factor κ B; MDM2: transformed 3T3 cell double-minute 2 p53-binding protein; PDK1: PIP3 Dependant-Kinase; PIP2: phosphoinositide bis-phosphate; PIP3: phosphoinositide tris-phosphate; PTEN: phosphatase and tensin homologue; $p27^{kip1}$: cyclin-dependant kinase inhibitor p27; RTK: récepteur tyrosine kinase; TSC2: tuberous sclerosis complex (tuberin)

Plusieurs mécanismes régulent négativement la voie PI3K/Akt. Les lipides phosphatases PTEN et SHIP limitent la production de PIP3, en le déphosphorylant respectivement en position 3' et en position 5' de l'anneau inositol. Les phosphatases PP2A et PHRPP limitent la phosphorylation d'Akt sur la ser⁴⁷³ et sur la thr³⁰⁸ respectivement. PDK1 active également d'autres membres de la famille des kinases AGC (cAMP dependant protein kinase, cGMP dependant protein kinase, Protein Kinase C subfamily) comme SGK1 et PKC α .

La voie PI3K/Akt est activée constitutivement dans de nombreux cancers par diverses anomalies génétiques acquises. Parmi celles-ci, les deux plus fréquentes sont celles qui impliquent PTEN et la sous-unité p110 α . Le gène PTEN est délété et/ou muté sur un allèle dans plus de 30% des cancers et sa fonction peut être aussi limitée par des évènements épigénétiques ou post-traductionnels qui font de cette phosphatase, après la protéine p53, l'anti-oncogène le plus fréquemment modifié en cancérologie. Les mutations du gène codant pour la p110 α , présentes dans 15% des cancers solides, conduisent à l'activation constitutive de son activité kinase.

Dans les LAM, l'axe PI3K/Akt est fréquemment activé comme en témoigne la présence de la phosphorylation d'Akt sur la ser⁴⁷³ dans 50% à 80% des échantillons primaires (Xu et al., 2003) (Min et al. 2003) (Grandage et al., 2005). L'équipe dans laquelle j'ai effectué ma thèse a montré la présence d'une activation constitutive d'Akt -c'est-à-dire persistante malgré l'absence de cytokines dans le milieu de culture- dans 50% des échantillons primaires au diagnostic (Tamburini et al., 2007). De plus, cette activation d'Akt est retrouvée dans le compartiment de cellules CD34+, CD38-, CD123+, enrichi en cellules souches leucémiques (CSL) (Bardet et al., 2006). Cependant, la valeur pronostique de la voie PI3K/Akt est controversée et semble différente selon que l'on regarde l'une ou l'autre des phosphorylations d'Akt sur la ser⁴⁷³ ou sur la thr³⁰⁸ (Gallay et al., 2009). Les mécanismes d'activation de la voie PI3K dans les LAM sont peu connus, mais à l'inverse de nombreux cancers solides, ne dépendent pas de mutations des phosphatases SHIP et PTEN, ni de mutations d'Akt ou de la p110 δ , qui est la sous-unité préférentiellement exprimée et active dans les LAM (Park et al., 2010) (Sujobert et al., 2005). Il n'a pas été mis en évidence de corrélation entre l'activation de la voie PI3K/Akt et les mutations FLT3, c-Kit, Ras (Tamburini et al., 2007), excepté dans une étude récente pour la voie Ras (Kadia et al., 2012). Par contre, il existe une sécrétion autocrine d'IGF1 par les blastes primaires responsable de l'activation d'Akt par l'intermédiaire de l'IGF1R dans 70% des cas de LAM avec activation constitutive de la voie PI3K (Chapuis et al., 2010).

Le rôle d'Akt dans la leucémogénèse est suggéré par une étude chez la souris dans laquelle l'expression d'Akt1 constitutivement activée dans les cellules souches hématopoïétiques est responsable d'un syndrome myéloprolifératif ou d'une LAM dans 90% et 10% des cas respectivement (Kharas et al., 2010).

b. la voie mTOR

La description de la fonction et des mécanismes de régulation de la voie mTOR sera abordée en détail ultérieurement. Brièvement, mTOR est une sérine thréonine kinase très fréquemment activée dans les cancers, majoritairement en aval de la voie PI3K/Akt. Elle est présente dans la cellule au sein de deux complexes protéiques de natures et de fonctions distinctes, mTORC1 et mTORC2, qui favorisent la croissance et la prolifération cellulaire. Dans les LAM, mTORC1 est activé dans la majorité des échantillons primaires étudiés (Xu et al., 2003) (Récher et al., 2005) (Tamburini et al., 2008). Cependant, cette activation n'est pas dépendante de la voie PI3K/Akt puisque la phosphorylation des cibles de mTORC1, S6K1 et 4E-BP1, n'est pas inhibée en présence d'IC87114, un inhibiteur hautement spécifique de la sous-unité p110 δ des PI3K de classe IA, qui permet par contre l'inhibition de la phosphorylation d'Akt sur la ser⁴⁷³ (Tamburini et al., 2008). Une équipe a suggéré un rôle de la Src kinase Lyn dans l'activation de mTOR, puisque son inhibition à l'aide d'un inhibiteur chimique (le PP2) ou par siARN permet l'inhibition des cibles de mTORC1 sans inhiber Akt (Dos Santos et al., 2008). D'autres ont mis en évidence une diminution de l'expression de l'ARNm de TSC2, régulateur négatif de mTORC1, ainsi que l'hyperméthylation de son promoteur dans les LAM (Xu et al., 2009). Ainsi, mTORC1 est fréquemment activé dans les LAM, sans que les signaux conduisant à cette activation aient été clairement identifiés.

Le rôle direct de mTORC1 dans la leucémogénèse a été étudié dans des modèles murins. Lorsque mTORC1 est activé par délétion de TSC1 dans les cellules souches hématopoïétiques murines (CSH), celles-ci prolifèrent d'avantage et perdent leur capacité de repopulation à long terme (Chen et al., 2008) (Gan et al., 2008). Ce phénotype est semblable à celui observé dans un modèle de délétion de PTEN, régulateur d'amont de mTORC1, qui s'accompagne de syndromes myéloprolifératifs suivis de leucémies, phénotype qui peut être atténué par la rapamycine, inhibiteur de mTORC1 (Yilmaz et al., 2006). Dans cette étude, les auteurs soulignent une différence de comportement entre les CSH et les cellules initiateuses de leucémie (LIC), dont le pool est maintenu malgré la délétion de PTEN. Chez l'homme, la voie mTORC1 est activée dans les LIC puisque le traitement ex vivo de cellules primaires de LAM par l'association étoposide (inhibiteur de topo-isomérase, responsable de lésions de l'ADN) et

rapamycine diminue le pourcentage de prise de greffe après réinjection dans des souris NOD/SCID par rapport aux échantillons traités par étoposide seul (Xu et al., 2005). Ces résultats sont d'importance majeure, puisque cette population minoritaire de LIC, dont la caractéristique supposée serait d'être quiescente et donc peu sensible aux chimiothérapies classiques, est responsable des rechutes de LAM. In vivo, l'invalidation de Raptor (composant essentiel du complexe mTORC1) dans les cellules souches hématopoïétiques murines transformées par l'oncogène MLL-AF9 et transplantées à la souris, retarde la progression de la LAM et augmente la survie des souris (Hoshii et al., 2012). Dans ce modèle, l'inhibition de mTORC1 augmente l'apoptose des cellules de LAM différenciées contrairement aux blastes les moins différenciés dont elle diminue le potentiel leucémique, sans toutefois affecter l'auto-renouvellement.

c. Autres voies de signalisation dérégulées dans les LAM

La voie Ras/Raf/MEK/ERK favorise la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire. Elle est activée dans 50 à 83% des LAM (Ricciardi et al., 2005) et peut dépendre, soit de la présence de mutations de Ras, soit de mécanismes alternes, en aval de FLT3-ITD ou de BCR-ABL par exemple. L'inhibition des phosphorylations de la kinase ERK dans les lignées leucémiques inhibe la croissance cellulaire et induit de l'apoptose (Milella et al., 2001) et l'activation de cette voie a été corrélée à un pronostic péjoratif (Kornblau et al., 2006).

La voie JAK/STAT est activée en aval de certains récepteurs aux cytokines dépourvus d'activité tyrosine kinase intrinsèque dont la stimulation par le ligand induit la phosphorylation en trans et donc l'activation d'une protéine de la famille JAK. Les kinases JAK phosphorylent les facteurs de transcription (FT) STAT et conduisent à la formation de dimères de protéines STAT qui sont alors transférés dans le noyau cellulaire où leur liaison à l'ADN leur permet d'exercer leurs fonctions d'activateur transcriptionnel. Les mutations de JAK2 sont rares dans les LAM de novo (Steensma et al., 2006) et n'expliquent pas la fréquence des activations des FT STAT, dont STAT5, qui peuvent survenir en aval de l'activation constitutive de FLT3, responsable de la phosphorylation de JAK2, STAT3, STAT5a et b (Tse et al., 2000), mais également en aval d'une boucle d'autocrinie d'IL6 pour STAT3, activée dans 25% des LAM (Schuringa et al., 2000).

Le facteur de transcription NF- κ B est un complexe dimérique- le plus souvent constitué des sous-unités RelA/p65 et p50, mais également de p52, c-Rel et RelB- impliqué dans la réponse inflammatoire, la prolifération et l'apoptose. Son activité est modulée par les facteurs de croissance, certains oncogènes et le stress oxydatif. Son activation implique la

phosphorylation suivie de la dégradation d'I κ B, qui permet la translocation nucléaire du dimère NF- κ B. La kinase d'I κ B, IKK, est activée dans les blastes de LAM (Baumgartner et al., 2002) et une sur-activation de NF- κ B, impliquant essentiellement RelA/p65, est observée dans 75% des cas (Guzman et al., 2001). L'activation de cette voie est retrouvée dans la population CD34+ CD38- CD123+, enrichie en cellules souches leucémiques.

3. Voie de signalisation mTOR

3.1 La kinase mTOR

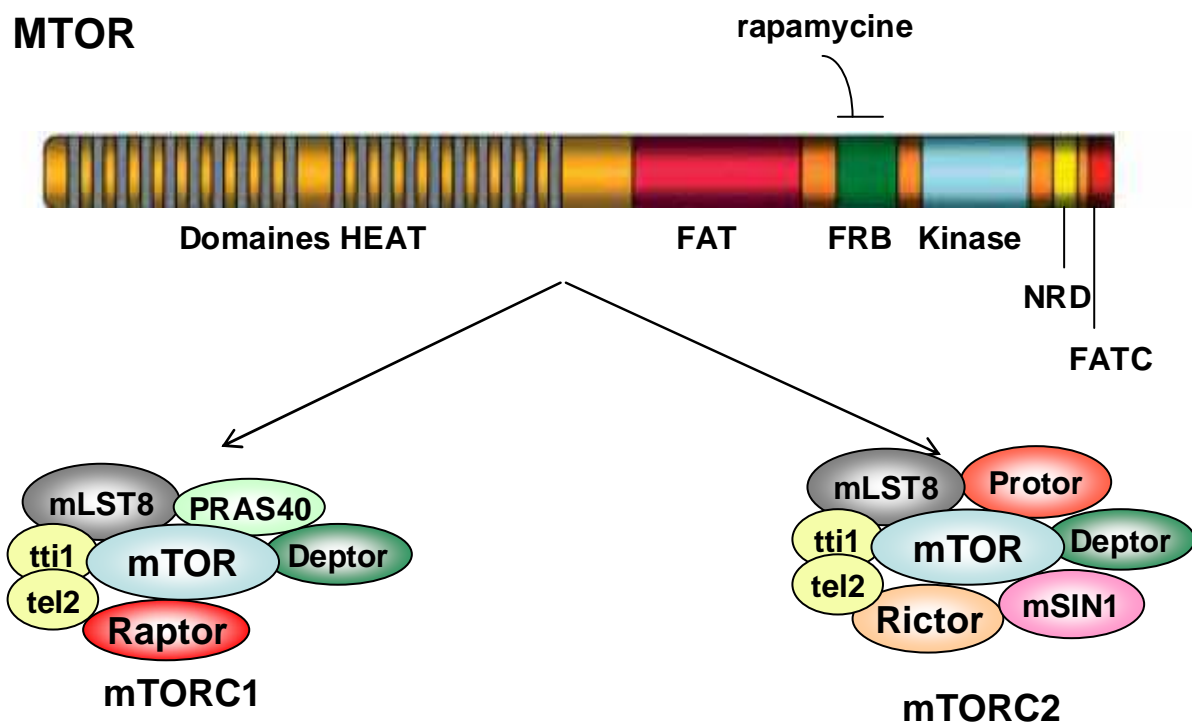


Figure 3. Structure de la sérine/thréonine kinase mechanistic Target Of Rapamycin (mTOR) et des deux complexes mTORC1 et mTORC2

DEPTOR: DEP domain containing mammalian target of rapamycin (mTOR)-interacting protein; FAT: FRAP, ATM, TTRAP; FAT-C: FAT-C-terminal; FRB: FKBP12-Rapamycine binding domain; HEAT: Huntingtin, EF3, A subunit of PP2A and TOR; mLST8: mammalian lethal with SEC13 protein 8; NRD: negative regulatory domain; PRAS40: proline-rich Akt substrate of 40-kDa; Protor: protein observed with Rictor-1; Raptor: regulatory associated protein of mTOR; Rictor: rapamycine insensitive companion of mTOR; SIN1: SAPK interacting protein

La protéine mTOR (pour mechanistic target of rapamycin) est une sérine thréonine kinase de 289 kDa, dont le gène est situé en 1p36.2, appartenant à une famille de kinases apparentées aux PI3K (PIKK). Les membres de cette famille contiennent un domaine à activité sérine/thréonine kinase à leur extrémité C-terminale, ayant une forte homologie avec le

domaine catalytique des PI3K. L'extrémité N-terminale de mTOR contient le domaine FRB (FKBP12-Rapamycine binding domain) dont l'intégrité est indispensable à l'action de la rapamycine sur mTOR. La protéine mTOR est composée de plusieurs autres domaines hautement conservés entre les espèces: les répétitions en tandem de plus de 20 motifs HEAT (Huntingtin, EF3, A subunit of PP2A and TOR) qui permettent les interactions protéine-protéine ainsi que les domaines FAT (FRAP, ATM, TTRAP) et FATC, situés de part et d'autre des domaines FRB et catalytique respectivement. L'expression de mTOR est ubiquitaire dans les cellules de mammifères, où elle s'associe à de nombreuses protéines partenaires pour former deux complexes distincts, qui favorisent la croissance et la prolifération cellulaire en interagissant de façon harmonieuse dans les cellules normales, mais dont l'activation excessive peut favoriser le développement de tumeurs. La figure 3 représente la kinase mTOR et la composition des complexes mTORC1 et mTORC2, qui contiennent en commun mTOR, mLST8 (ou Gβ1) dont la fonction n'est pas connue, deptor et les protéines de soutien (scaffold protein) tti1 et tel2.

Après activation, la kinase mTOR est phosphorylée sur plusieurs résidus incluant les thr²⁴⁴⁶, ser²⁴⁴⁸ et ser²⁴⁸¹. Les sites thr²⁴⁴⁶/ser²⁴⁴⁸ situés dans un domaine répresseur sont phosphorylés par S6K1 (Holz and Blenis, 2005). La ser²⁴⁸¹ est un site d'autophosphorylation de mTOR, qui peut être phosphorylé au sein des deux complexes mTORC1 et mTORC2 et reflète l'activité catalytique de mTOR (Soliman et al., 2010).

3.2 Le complexe mTORC1

3.2.1 Composition

Le complexe mTORC1 est caractérisé par l'association de mTOR avec Raptor (regulatory-associated protein of mTOR), indispensable à son activation, qui agit en recrutant les substrats de mTOR possédant des domaines TOS (TOR signaling) (Hara et al., 2002). Raptor est une protéine de 150 kDa qui possède 7 domaines WD (tryptophane-Aspartate) répétés. Son invalidation chez la souris conduit à une mortalité embryonnaire précoce, survenant au même stade que chez les embryons invalidés pour mTOR. Elle diminue la masse cellulaire et la prolifération des blastocytes (Guertin et al. 2006). Raptor pourrait également permettre de stabiliser le complexe mTORC1. Ce complexe a été initialement défini par sa sensibilité à la rapamycine et ses dérivés, qui après liaison au FKBP12, bloquent l'interaction entre mTOR et Raptor et inhibent la fonction de mTORC1 sans modifier son activité catalytique (Oshiro et al., 2004).

mTORC1 contient également la protéine mLST8 de 36 kDa, qui interagit avec le domaine kinase de mTOR. Son rôle dans la signalisation en aval de mTORC1 dépend des modèles testés. Sa présence n'est pas indispensable à l'activité de mTORC1 au cours du développement embryonnaire murin. Le KO mLST8 s'accompagne en effet d'une létalité embryonnaire plus tardive que les KO mTOR ou Raptor et n'empêche pas la phosphorylation des substrats de mTORC1. Par contre, l'inhibition aiguë d'expression de mLST8 par ARN interférence dans des lignées cellulaires en culture diminue la phosphorylation des cibles de mTORC1.

La protéine mTOR interagit également avec PRAS40 (proline-rich Akt substrate of 40-kDa) et deptor (DEP domain containing mammalian target of rapamycin (mTOR)-interacting protein), qui régulent négativement son activité. La phosphorylation de PRAS40 sur la thr²⁴⁶ par Akt, après stimulation par l'insuline, diminue son interaction avec Raptor au niveau du site de liaison aux substrats de mTOR. Ceci permet à S6K1 et 4E-BP1 d'interagir avec Raptor et diminue l'effet inhibiteur de PRAS40 sur mTORC1. PRAS40 peut également être phosphorylée directement par mTORC1 sur plusieurs résidus acides aminés. Ces phosphorylations s'accompagnent aussi d'une diminution de l'interaction Raptor/PRAS40 (Wiza et al., 2012). Deptor est un régulateur négatif de mTOR, identifié plus récemment, capable d'inhiber mTOR au sein des deux complexes mTORC1 et 2, avec toutefois une action préférentielle sur mTORC1 (Peterson et al., 2009). Son mode d'action est mal connu, mais il peut être régulé par mTORC1 lui-même, puisque la phosphorylation de deptor par RSK1 et S6K1 permet sa reconnaissance par l'E3 ubiquitine ligase β TrCP suivie de sa dégradation par le protéasome (Zhao et al., 2011).

3.2.2 Substrats et Fonctions

mTORC1 possède de nombreux substrats que nous ne détaillerons pas exhaustivement. Les deux substrats les mieux connus sont S6K1 et 4E-BP1.

a. Protéines S6 kinases

Les protéines S6K appartiennent à la famille des kinases AGC, qui contiennent 3 sites de phosphorylation hautement conservés entre les différents membres, l'un situé dans la boucle d'activation du domaine kinase et deux autres, à l'extrémité C-terminale, dans le domaine hydrophobe et le motif « turn ». La phosphorylation sur chacun de ces trois sites est indispensable à l'activité des S6K, bien que la séquence temporelle de ces événements soit actuellement controversée. Il semble toutefois que, comme pour Akt, la phosphorylation du

motif « turn » soit un évènement précoce et constitutif, tandis que deux modèles s'opposent quant à l'ordre de survenue des phosphorylations sur la thr²²⁹ par PDK1 (dans la boucle d'activation) et sur la thr³⁸⁹ par mTORC1 (dans le domaine hydrophobe) (Magnuson et al., 2012). Ces sites de phosphorylation correspondent à ceux de la p70S6K, l'isoforme de S6K1 la mieux étudiée. Les S6K sont en effet constituées de deux membres, S6K1 et S6K2, chacune possédant deux isoformes issues d'un épissage alternatif : p70 et p85 pour S6K1 et p54 et p56 pour S6K2. En ce qui concerne leurs fonctions, le premier et pendant longtemps le seul substrat identifié de S6K1 est la protéine S6 ribosomale (rpS6) appartenant à la sous-unité ribosomale 40S. L'hypothèse antérieure concernant son rôle dans la traduction d'ARN messagers TOP (contenant en 5' un motif oligopyrimidine adjacent à la structure CAP) codant pour des protéines ribosomales ou des facteurs d'élongation, n'est plus privilégiée. Toutefois, mTOR contrôle bien la traduction des TOP mARN, indépendamment de S6K1-rpS6, puisque cette traduction est fortement diminuée en cas d'inactivation de mTOR, alors que les inactivations de Raptor ou de Rictor n'ont qu'un effet modeste dessus (Patursky-Polischuk et al., 2009). S6K1 phosphoryle également de nombreux autres substrats, intervenant dans la synthèse protéique via la maturation des ARN messagers, l'initiation et l'élongation de la traduction dite CAP-dépendante, dans l'assemblage des protéines natives ou encore dans la survie cellulaire (figure 4). Plusieurs de ces substrats (rpS6, eIF4B, eEF2K, BAD, GSK3, CCT β) peuvent également être phosphorylés par RSK, illustrant la convergence entre les voies mTOR et ERK/MAPK. La perte de fonction de S6K chez la drosophile s'accompagne d'un sévère retard de développement et d'une létalité associée à une importante réduction de la taille de l'animal et de ses organes, soulignant le rôle de la protéine S6K dans la croissance (Montagne et al., 1999).

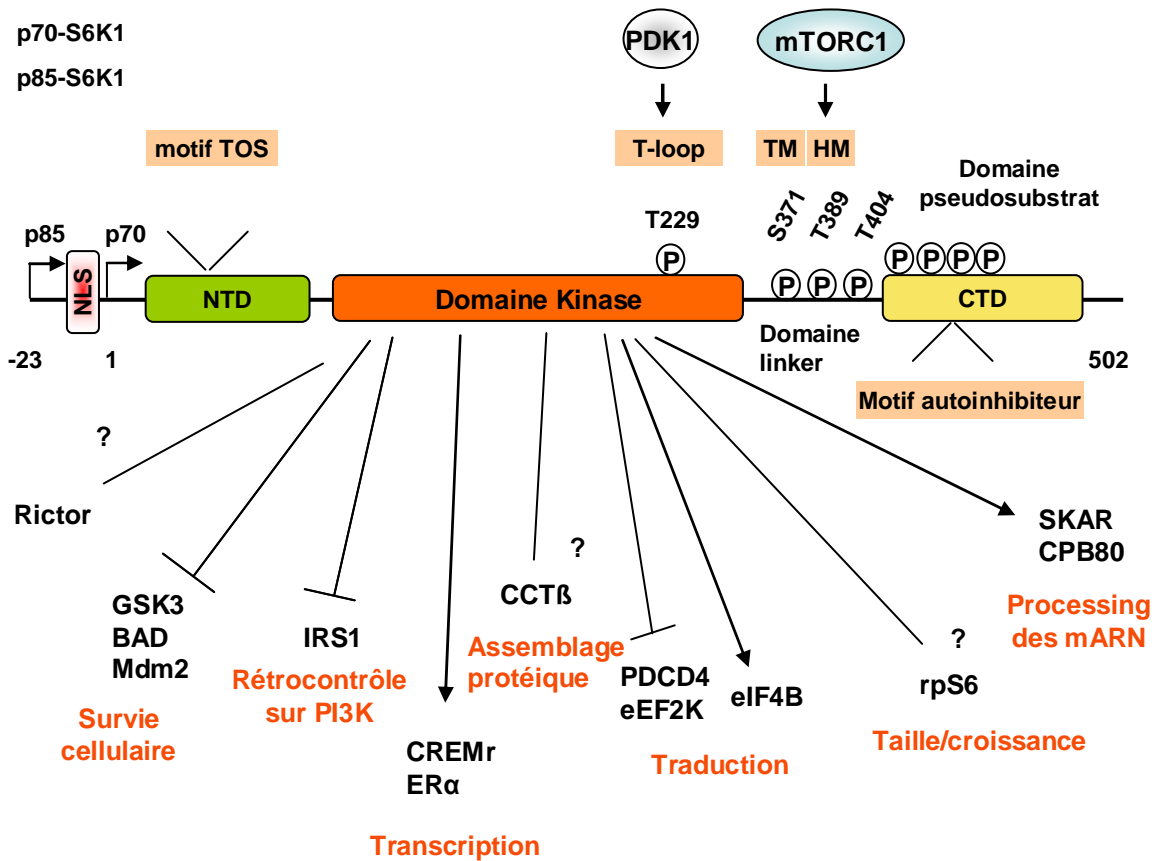


Figure 4. Structure et fonctions de S6K1 adapté de (Magnuson et al., 2012)

BAD : Bcl-2/Bcl-XL antagonist causing cell death; CCT β : chaperonin containing TCP-1 β ; CREM τ : c-AMP response element modulator τ ; CTD: C-terminal domain; eEF2K : eukaryotic elongation factor 2 kinase; ER α : oestrogen receptor α ; HM : motif hydrophobe; NTD: N-terminal domain; PDCD4 : programmed cell death 4; rpS6: ribosomal protein S6; SKAR : S6K1 Aly/REF-like substrate; T-loop : boucle d'activation; TM : turn motif; TOS : TOR signaling

b. eIF4E Binding Proteins (4E-BPs) et rôle de mTOR dans la synthèse protéique

Le second principal substrat de mTORC1 est le répresseur traductionnel 4E-BP1 (eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1). Les protéines de la famille 4E-BP contiennent 3 membres: 4E-BP1, 4E-BP2 et 4E-BP3, dont le premier est le mieux connu. 4E-BP1 est une protéine de 13 kDa, comportant un motif RAIP à son extrémité N-terminale et un motif TOS, d'interaction avec Raptor en C-terminal. 4E-BP1 est phosphorylé par mTOR de manière séquentielle sur au moins 4 résidus indispensables à son activité. Les phosphorylations sur les thr³⁷ et thr⁴⁶ situées à l'extrémité N-terminale sont sensibles aux acides aminés mais insensibles à la rapamycine et au sérum. Elles précèdent les phosphorylations sur la ser⁶⁵ et la thr⁷⁰, auxquelles elles sont nécessaires (Gingras et al., 2001). Ces deux dernières phosphorylations, situées à proximité du site de liaison à eIF4E, nécessitent la présence du domaine TOS et sont sensibles à la privation en sérum et à la rapamycine dans la plupart des

modèles (Wang et al., 2005) (Choo and Blenis, 2009). 4E-BP1 doit être phosphorylé sur l'ensemble de ces quatre sites pour se dissocier d'eIF4E et permettre la traduction (Figure 5).

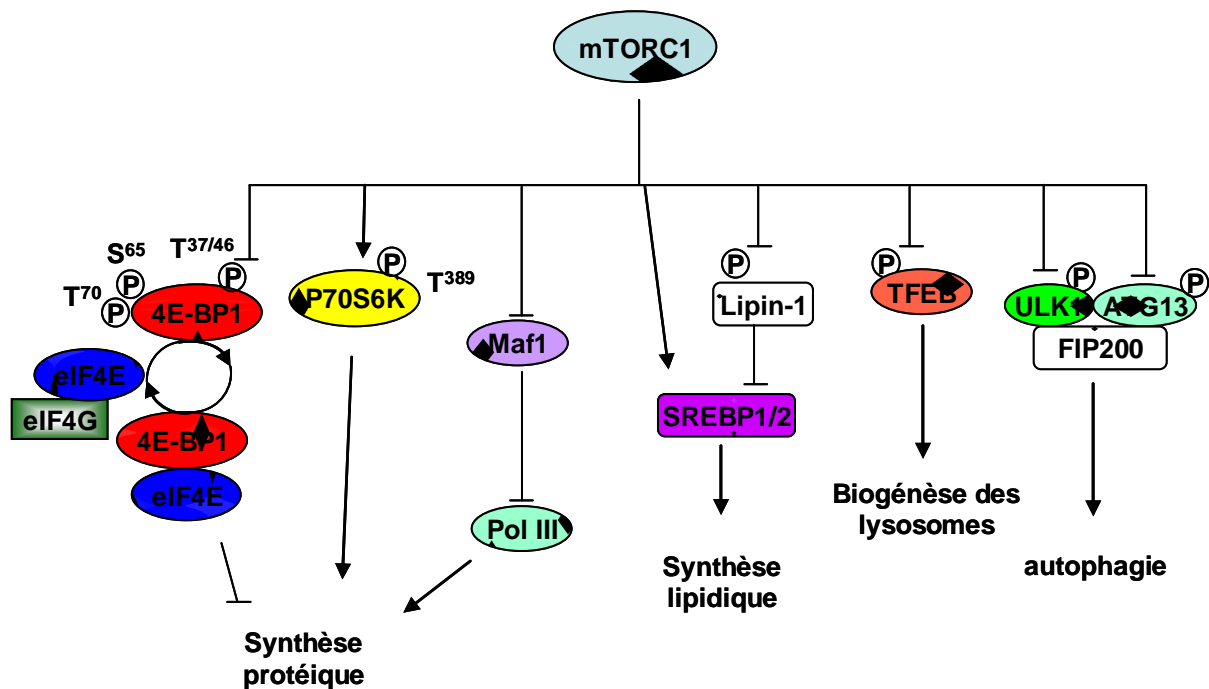


Figure 5. Les principales cibles de mTORC1

Atg13 : autophagy related gene 13; 4E, 4G : elongation initiation factors; PolIII : RNA polymerase III; SREBP1 : sterol regulatory element-binding protein 1/2; TFEB : transcription factor EB; ULK1 : unc51-like kinase 1; 4E-BP1 : 4E binding protein 1

En l'absence d'activation de mTORC1, la protéine 4E-BP1, présente sous forme hypophosphorylée interagit avec eIF4E, une protéine constitutivement associée à la structure CAP située en 5' de la majorité des ARN messagers. Cette association empêche la formation du complexe d'initiation de la traduction eIF4F, qui est une des étapes limitantes du processus de traduction (Haghighat et al., 1995). La phosphorylation de 4E-BP1 par mTORC1 libère eIF4E et permet la liaison d'eIF4E avec eIF4G, une protéine d'échafaudage. Une fois liée à eIF4E, eIF4G recrute eIF4A, une hélicase qui permet le déroulement de structures secondaires inhibitrices dans l'extrémité 5' non traduite de l'ARNm, pour former le complexe eIF4F (figure 6). EIF4G se lie également à la protéine PABP (polyadenylate binding protein) qui permet la formation d'une boucle à partir de la molécule d'ARNm, cette structure étant stabilisée par eIF4B, une protéine liée à eIF4A et PABP. La sous-unité ribosomale 40S est recrutée par ce complexe via son interaction avec eIF3, une autre protéine partenaire d'eIF4G. Un complexe ternaire (composé d'eIF2, Met-tRNA et GTP) est alors nécessaire pour mettre

en contact la première méthionine et le ribosome et s'associe à eIF1, eIF1A et eIF3 pour former le complexe 43S de pré-initiation de la traduction. Ce complexe, après reconnaissance du codon « start » d'initiation de la traduction, forme avec le ribosome le complexe 48S qui permet l'initiation de la traduction des ARN messagers Cap-dépendants (Gingras et al., 1999) (Blagden and Willis, 2011).

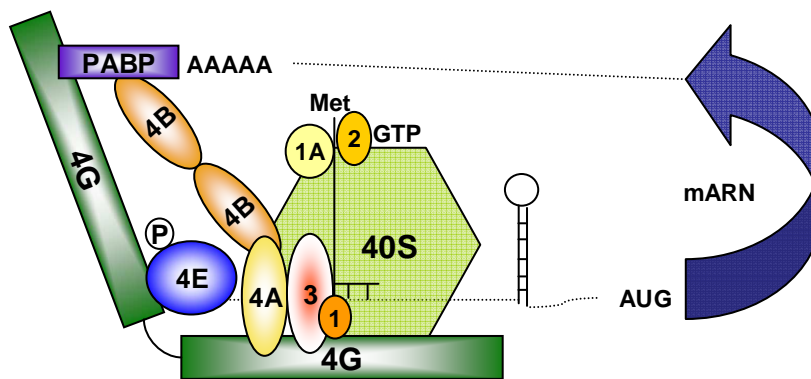


Figure 6. Complexe 48S d'initiation de la traduction. Figure adaptée de (Blagden and Willis, 2011)

AUG : codon d'initiation de la traduction de l'ARN; 40S : sous-unité ribosomale 40S; 1, 1A, 2, 3, 4A, 4B, 4E, 4G : facteurs d'initiation de la traduction eucaryote (eIF); Met : méthionine; PABP : polyadenylate binding protein

S6K1 participe également à la traduction de plusieurs manière : i/ S6K1 phosphoryle la protéine SKAR qui est impliquée dans l'épissage et l'export nucléaire des ARNm; ii/ S6K1, en phosphorylant eIF4B et PDCD4, augmente l'activité d'eIF4A; iii/ S6K1 activée par mTOR se dissocie de eIF3; iv/ S6K1 phosphoryle et inactive eEF2K, inhibiteur de eEF2 qui permet l'élongation. En contrôlant S6K et 4E-BP1, mTORC1 est donc un puissant régulateur de la synthèse protéique (Ma and Blenis, 2009).

Récemment, une étude transcriptomique effectuée sur polysomes purifiés dans des cellules MEF traitées par la rapamycine (inhibiteur allostérique de mTORC1) ou par la Torin1 (inhibiteur catalytique de mTOR) a montré un rôle important de mTOR, par l'intermédiaire de 4E-BP1, dans le contrôle de la traduction des TOP ARN, ARNm qui codent pour des protéines associées au processus de traduction comme eEF2 et la majorité des protéines ribosomales (Thoreen et al., 2012). Dans cette étude, de façon surprenante et contradictoire avec les données préexistantes, l'inhibition de mTOR, à des temps courts, ne diminue pas de façon majeure les ARNm ayant une extrémité 5' UTR (untranslated region) longue et complexe. Par contre, son effet est drastique sur l'ensemble des TOP ARN et des ARNm

ayant une structure proche de la structure TOP communément admise. Le contrôle de la traduction des ARN TOP par mTOR nécessite la présence d'eIF4G et sa régulation en aval des protéines 4E-BP1 et 2.

c. Substrats impliqués dans l'autophagie

A côté de son rôle majeur dans l'initiation de la traduction, mTORC1 contrôle également le processus d'autophagie nécessaire au recyclage des organelles vieillissantes et à l'adaptation de l'organisme aux conditions de stress nutritionnel, processus qui peut également conduire à la mort cellulaire, en cas de stimulation trop importante. L'autophagie est une voie catabolique qui permet la dégradation de macromolécules cytosoliques et de portions d'organelles après leur transport dans des vésicules spécifiques à doubles membranes, appelées autophagosomes. Ce phénomène, finement régulé, se déroule en trois phases impliquant les protéines Atg (autophagy related genes) qui s'organisent en complexes multiprotéiques : 1/ formation d'une vacuole d'autophagie (phagophore) qui séquestre de façon non spécifique des constituants du cytoplasme; 2/ élongation et maturation de l'autophagosome; 3/ fusion de l'autophagosome avec le lysosome et dégradation de son contenu en acides aminés, nucléotides et acides gras.

La première étape, dans laquelle mTORC1 intervient, nécessite la formation du complexe Atg13/Atg1 (Ulk1)/FIP200 dont le rôle précis est mal connu. mTORC1 inhibe (par phosphorylation directe d'Atg13 et ULK1) ce complexe indispensable à l'initiation de l'autophagie puisqu'il permet l'isolement du phagophore, précurseur de l'autophagosome (Corcelle et al., 2009). mTORC1 participe également indirectement au contrôle de l'autophagie via son rôle dans la biogénèse des lysosomes. En condition de privation en nutriments, l'inhibition de mTORC1 conduit à l'accumulation de TFEB (transcription factor EB) dans le noyau et à son activation qui permet l'expression de gènes impliqués dans la formation d'autophagosome et la fusion des lysosomes (Settembre et al., 2012).

d. Autres substrats

mTORC1 régule, directement ou non, plusieurs protéines impliquées dans le métabolisme lipidique dont le facteur de transcription SREBP1 (sterol regulatory element-binding protein 1/2), Lipin-1 (régulateur négatif de SREBP1) (Peterson et al., 2011) et PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) qui contrôle l'adipogénèse (Laplante and Sabatini, 2009). Parmi les autres voies intracellulaires régulées par mTORC1, nous noterons le métabolisme énergétique (mTORC1 active HIF1 α qui contrôle la transcription de nombreux gènes

impliqués dans la glycolyse) (Düvel et al. 2010). La figure 5 représente les principaux substrats de mTORC1.

3.2.3 Régulation

Parmi les nombreux signaux régulant l'activité du complexe mTORC1, il en existe cinq principaux, extra et intracellulaires, à savoir les facteurs de croissance, l'état énergétique de la cellule, la disponibilité en nutriment, l'hypoxie et le stress. Ils permettent l'adaptation de la cellule à son environnement et son statut métabolique et contrôlent de nombreux processus physiologiques dont les synthèses protéiques et lipidiques ainsi que l'autophagie.

a. Récepteurs aux facteurs de croissance

La régulation de mTORC1 par les facteurs de croissance implique le complexe TSC1/TSC2 (tuberous sclerosis complex), régulateur négatif de mTOR au repos. TSC1/TSC2 est un hétérodimère dont les deux protéines partenaires ont une fonction suppressive de tumeur et sont la cible de mutations dans la sclérose tubéreuse de Bourneville, maladie héréditaire autosomique dominante caractérisée par la formation de tumeurs bénignes multi-viscérales (Crino et al., 2006). TSC2 (tubérine) agit par l'intermédiaire d'une activité GAP (guanine triphosphate GTPase activating protein) sur Rheb, une petite protéine G de la famille Ras qui, couplée au GDP, inactive le complexe mTORC1 (Inoki et al., 2003), alors que TSC1 (hamartine) maintient la stabilité de TSC2 en empêchant sa dégradation. A côté des mutations perte de fonction affectant le domaine GAP de TSC2, les mutations faux-sens de TSC1 ou TSC2 déstabilisent et inactivent le complexe.

Lorsque la voie PI3K est stimulée par la liaison d'un ligand à son récepteur, la kinase Akt activée par PDK1 et mTORC2 phosphoryle TSC2 sur la ser⁹³⁹ et sur la thr¹⁴⁶² et supprime l'effet inhibiteur de TSC1/TSC2 sur mTORC1. La protéine Rheb couplée au GTP active alors mTORC1 (Inoki et al., 2002) (Figure 7). Akt agit également indépendamment de TSC1/TSC2 en phosphorylant PRAS40, régulateur négatif de mTORC1, qui n'interagit alors plus avec Raptor. D'autres kinases interagissent avec l'axe TSC1/TSC2 comme ERK et RSK (ribosomal S6 kinase) qui phosphorylent TSC2 sur la ser⁶⁶⁴ et la ser¹⁷⁹⁸ respectivement, plaçant la voie Ras/MAPK en amont de mTORC1 (Roux et al., 2004) (Ma et al., 2005). Les mécanismes par lesquels Akt inactive TSC1/TSC2 sont discutés et semblent impliquer la dissociation du complexe et/ou la dégradation de TSC2 plutôt qu'une diminution de son activité GAP (Huang et al., 2008). L'action activatrice de Rheb-GTP sur mTORC1 est

également mal connue bien qu'il s'agisse d'un mécanisme direct, reproductible in vitro, et qui pourrait modifier les interactions de mTOR avec FKBP38.

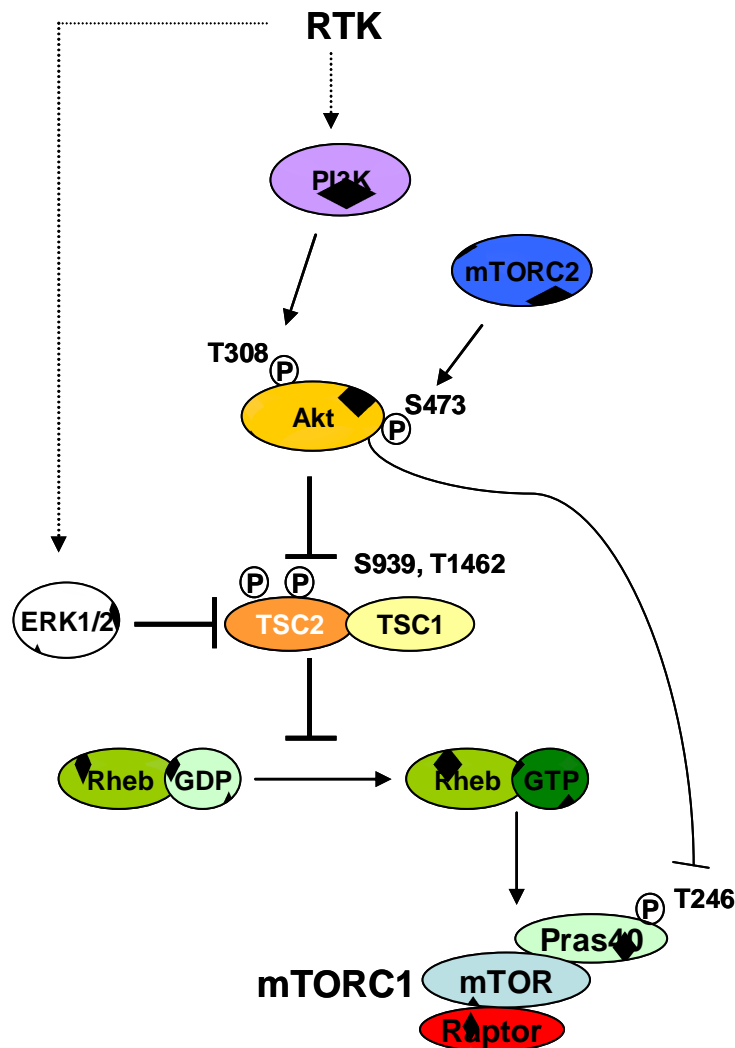


Figure 7. Régulation de mTORC1 en aval des facteurs de croissance

Après activation par les facteurs de croissance, AKT inhibe le complexe TSC1/TSC2, ce qui favorise la forme Rheb-GTP qui active mTORC1. AKT phosphoryle également directement Pras40, inhibiteur de mTORC1.

b. Axe LKB1/AMPK

Le statut énergétique de la cellule régule l'activité de mTORC1. Un rapport AMP/ATP élevé, témoin d'un stress énergétique, est capable d'activer le complexe hétéro-trimérique AMPK et de réduire drastiquement la phosphorylation des protéines rpS6 et 4E-BP1. L'activation d'AMPK nécessite sa phosphorylation sur le résidu AA thr¹⁷² de la sous-unité α par LKB1. LKB1 est une kinase anti-oncogénique dont les mutations héréditaires sont responsables du syndrome de Peutz-Jeghers caractérisé par la présence de tumeurs bénignes et une

prédisposition à certains cancers. Une fois activée, la kinase AMPK inhibe mTORC1 après phosphorylation activatrice de TSC2 sur la ser¹³⁴⁵ (Corradetti et al., 2004). L'AMPK peut également inhiber mTORC1 indépendamment de TSC1/TSC2 en phosphorylant directement Raptor sur les ser⁷²² et ser⁷⁹², ce qui favorise sa dégradation après liaison aux protéines 14-3-3 (Gwinn et al., 2008).

c. Acides aminés

La perte de fonction de TOR chez la drosophile conduit à un phénotype cellulaire identique à celui observé lors d'un appauvrissement du milieu en acides aminés (AA), c'est-à-dire, diminution de la taille nucléolaire, agrégation de vésicules lipidiques et arrêt du cycle cellulaire en G0 (H. Zhang et al. 2000). Ce constat a soulevé l'hypothèse d'un lien entre acides aminés et TOR. Celui-ci a depuis été confirmé puisque lorsque des cellules de mammifères sont cultivées pendant 1 à 2 heures dans un milieu sans acides aminés, on observe une inhibition des phosphorylations de S6K et 4E-BP1, qui ne sont plus stimulables par l'insuline. De plus, dans ce modèle, l'arginine, et surtout la leucine, dont l'action se situe au niveau intracellulaire, sont les deux acides aminés dont l'absence inhibe le plus fortement mTORC1 (Hara et al., 1998) (Avruch et al., 2009). Nicklin et al. ont récemment décrit un modèle de coopération de deux transporteurs membranaires d'acides aminés dont la présence est nécessaire à l'activation de mTORC1 après privation en acides aminés, permettant *in fine* l'entrée de leucine dans la cellule (Nicklin et al., 2009). Ce modèle souligne le rôle de la L-glutamine dont l'import cellulaire est la première étape indispensable à l'effet des acides aminés essentiels (AAE) sur mTORC1. SLC1A5 (Solute carrier family 1 member 5), également nommé ASCT2, est un transporteur de forte affinité pour la L-glutamine qui permet son entrée cellulaire. Un second transporteur nommé SLC7A5/SLC3A2 (ou LAT1), du nom des deux sous-unités qui le constituent, est un transporteur bidirectionnel qui dans un second temps permet l'échange de L-glutamine intracellulaire contre de la L-leucine extracellulaire. L'inhibition de l'un ou l'autre de ces transporteurs bloque la stimulation de mTOR par les AAE, après privation en AA dans des cellules HeLa. D'autres études suggèrent un lien entre différents transporteurs membranaires des AA et mTOR, comme LAT2 (surtout exprimé dans le rein et l'intestin grêle) dans un modèle de glomérulonéphrite à croissant chez le rat (Kurayama et al., 2011) ou encore SNAT2 dans la lignée MCF-7 de cancer du sein (Pinilla et al., 2011).

Les mécanismes d'activation de mTORC1 en aval de la leucine ne sont encore que partiellement connus. L'effet des AA sur mTOR est majoritairement indépendant de

TSC1/TSC2 puisqu'il n'est que peu modifié dans des cellules invalidées pour TSC2 (Smith et al., 2005) ou chargées en Rheb-GTP (Roccio, Bos, et Zwartkruis 2006). Toutefois, une très forte surexpression de Rheb empêche l'inhibition de mTORC1 par les AA (Long et al., 2005). En 2008, deux études ont montré le rôle d'une famille de protéines à activité GTPase, les protéines Rag, dans l'activation de mTORC1 par les AA (Kim et al., 2008) (Sancak et al., 2008). Chez les mammifères, il existe 4 membres de cette famille (Rag A à D) qui agissent en hétéro-dimères entre Rag A ou B chargés en GTP et Rag C ou D chargés en GDP. Les AA modifient la charge en GTP du complexe Rag, par des mécanismes non complètement élucidés. La leucyl-tRNA synthetase est capable, en présence de leucine, d'interagir avec RagD-GTP sur lequel elle exerce une activité GAP, favorisant ainsi la formation de l'hétéro-dimère RagB-GTP/RagD-GDP, qui peut se lier à Raptor (Han et al., 2012). Les protéines Rag ainsi chargées permettent la translocation de mTORC1 du cytoplasme à la surface du lysosome, où elles interagissent avec un complexe appelé Ragulator, qui contient MP1, p14 et p18, indispensable à l'activation de mTORC1 par les AA (Sancak et al., 2010) (Figure 8). Au niveau du lysosome, mTOR serait ainsi mis en présence de son activateur Rheb. Des travaux récents ont mis en évidence le rôle joué par une protéine membranaire lysosomale, la v-ATPase (vacuolar H⁺- adénosine triphosphatase ATPase), en aval des AA (Zoncu et al., 2011). La présence d'AA favorise l'interaction entre le Ragulator et la v-ATPase qui peut ainsi jouer un rôle activateur sur les Rag, par un mécanisme indéterminé. D'autres transporteurs d'AA, localisés à la membrane des endosomes tardifs et des lysosomes pourraient intervenir à ce niveau. Il s'agit des protéines PAT ou SLC36 (Proton assisted Amino acids Transporter) dont les membres PAT1 et PAT4, d'expression ubiquitaire, interagissent avec les Rag GTPases au niveau du lysosome et sont nécessaires à l'activation de mTORC1 par les AA (Ogmundsdóttir et al., 2012). Selon l'hypothèse actuelle, les protéines PAT et la pompe v-ATPase pourraient être sensibles à la concentration d'AA dans la lumière du lysosome et moduler en réponse l'activation de mTORC1 par les Rag GTPases. La participation d'autres kinases, dont hVPS34 (mammalian vacuolar protein sorting 34 homolog), IPMK (inositol polyphosphate monokinase) et MAP4k3 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase), qui interviendraient entre les AA et mTORC1, a été évoquée par plusieurs équipes, sans que leur rôles respectifs n'aient été clairement établis (Nobukuni et al., 2005) (Kim et al., 2011) (Yan et al., 2010).

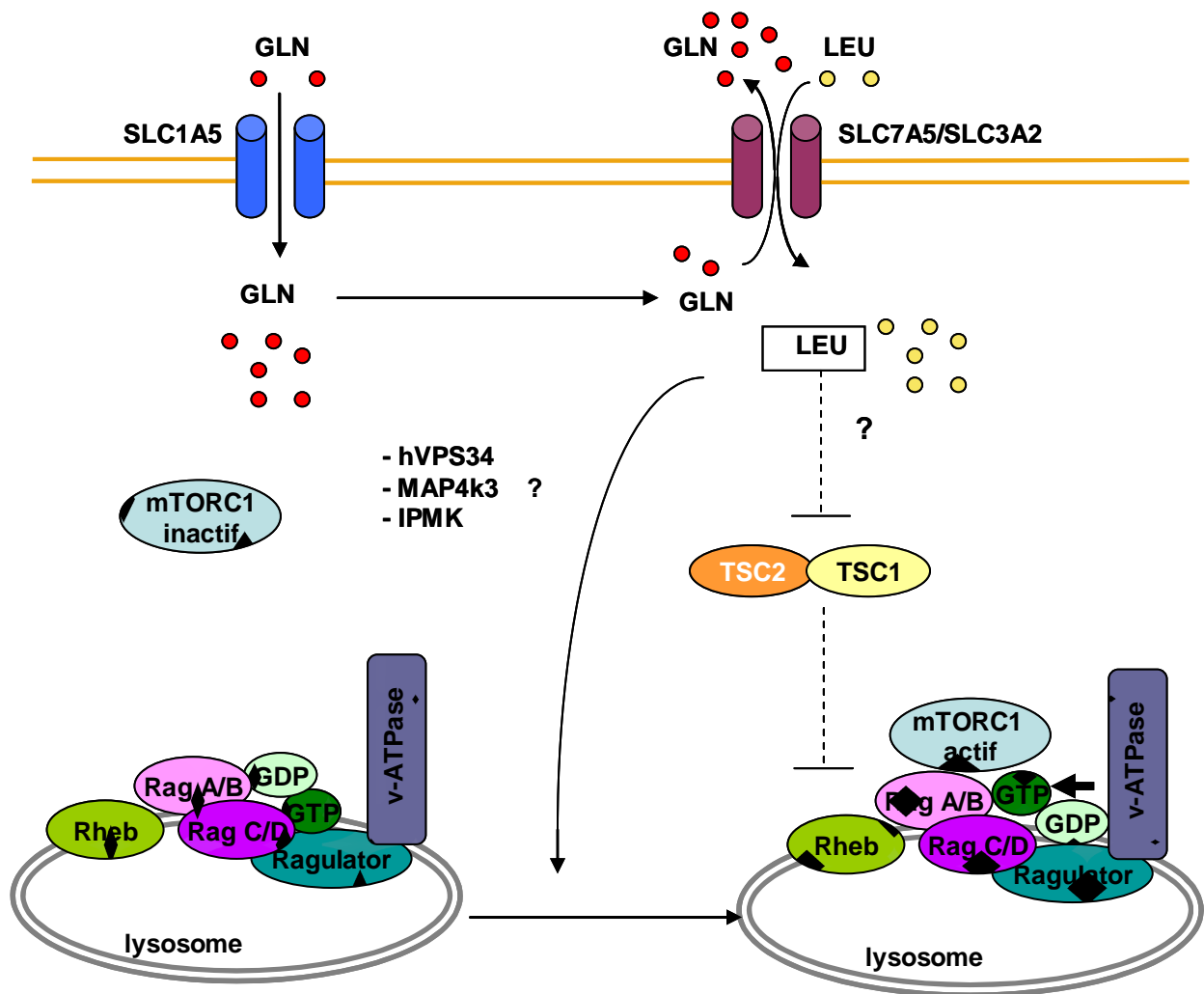


Figure 8 : Régulation de mTORC1 par les acides aminés

La coopération des transporteurs SLC1A5 et SLC7A5/3A2 permet l'augmentation de la leucine intracellulaire, en échange de l'export de glutamine. La leucine modifie indirectement la charge en GTP/GDP du complexe hétérodimérique Rag A/B-Rag C/D qui par son interaction avec Raptor permet un changement de localisation cellulaire de mTOR. Le complexe mTORC1 est ainsi localisé à la surface du lysosome où la présence de Rheb permet son activation. Le changement de localisation cellulaire de mTORC1 nécessite la coopération de nombreuses protéines, dont le complexe Ragulator et la pompe v-ATPase.

d. Autres mécanismes de régulation

D'autres mécanismes de régulation de mTORC1 ont été décrits, la plupart agissant par l'intermédiaire du nœud TSC1/TSC2. La voie Wnt/ β -caténine active mTORC1 via l'inhibition de GSK3- β , qui normalement favorise l'activité de TSC2 par phosphorylation (Inoki et al., 2006). L'hypoxie cellulaire et les dommages à l'ADN inhibent le complexe mTORC1 par des mécanismes en partie communs: ces deux facteurs de stress cellulaire activent REDD1 (regulated in development and DNA damage responses) qui à son tour active

TSC1/TSC2; ils activent également AMPK, via LKB1 pour l'hypoxie cellulaire qui induit un déficit énergétique, ou via l'activation de p53 en cas de menace de l'intégrité génomique.

3.2.4 Rôle oncogénique

Plusieurs observations permettent d'établir un lien entre la voie mTORC1 et les processus tumoraux. Tout d'abord, certains syndromes héréditaires caractérisés par une prolifération anormale de tissu et une prédisposition aux cancers résultent de la présence de mutations de gènes impliqués dans la régulation négative de cette voie. Les mutations germinales hétérozygotes de PTEN sont responsables du syndrome des hamartomes multiples, dont le syndrome de Cowden, qui s'accompagne d'un risque élevé de cancers du sein, de la thyroïde et de l'endomètre (Orloff and Eng, 2008). Les patients porteurs de mutations germinales de TSC1/2, responsables de la sclérose tubéreuse de Bourneville, présentent de nombreuses tumeurs bénignes multifocales, et bien que, chez ces patients, le taux d'incidence de carcinome rénal ne soit pas différent de celui de la population générale, ces cancers surviennent en moyenne 25 ans plus tôt que chez les sujets sains. Les mutations germinales de LKB1 sont à l'origine du syndrome héréditaire de Peutz-Jeghers.

Ensuite, la voie mTORC1 est très fréquemment activée dans les pathologies tumorales, le plus souvent en aval de la voie PI3K/Akt, elle-même cible de nombreuses anomalies moléculaires à type de mutations sporadiques, amplification d'oncogène ou délétion de régulateur négatif, touchant les gènes PTEN, Akt, PI3KCA, Ras (Engelman, 2009). mTORC1 peut également être activé indépendamment de l'axe PI3K/Akt par mutations de régulateurs situés en amont de mTOR comme les mutations de LKB1 fréquentes dans les adénocarcinomes pulmonaires sporadiques et certains cancers cervicaux (Ollila and Mäkelä, 2011), l'amplification de Rheb dans les cancers de prostate (Nardella et al., 2008) ou encore les mutations de PML (promyelocytic leukaemia), gène suppresseur de tumeur qui, dans des conditions d'hypoxie, diminue l'interaction entre mTOR et son activateur Rheb et favorise le maintien de mTOR dans le noyau (Bernardi et al., 2006).

Dans un modèle récent de souris avec délétion de TSC1 dans les hépatocytes, on observe la formation d'hépatocarcinomes chez 50% des animaux. Les tumeurs se développent avec un long délai de latence et leur histologie est hétérogène, évoquant la nécessité d'évènements transformants secondaires (Menon et al., 2012). De plus, les animaux traités par rapamycine ne développent pas de tumeurs. Les auteurs suggèrent un modèle dans lequel l'activation de mTORC1 induirait des dommages tissulaires et de l'inflammation, via notamment le stress du réticulum endoplasmique et l'inhibition d'autophagie, favorisant la survenue d'évènements

oncogéniques secondaires conduisant à la transformation cellulaire. La validité de ce modèle dans d'autres tissus n'est actuellement pas connue.

L'étendue des fonctions physiologiques contrôlées par mTOR explique son rôle favorable à la croissance, la survie et la prolifération des cellules tumorales. Toutefois, parmi les substrats de mTORC1, celui dont l'implication dans les cancers a été le mieux étudié est, sans aucun doute, le répresseur traductionnel 4E-BP1. Son rôle en aval de mTORC1 dans la prolifération a été démontré dans les lignées MEF et HEK-293 (Dowling et al., 2010) et l'axe 4E-BP1/eIF4E participe à la lymphomagenèse induite par Akt, contrairement à la protéine rpS6, cible de S6K1 (Hsieh et al., 2010). De plus, les mutants de 4E-BP1 non phosphorylables répriment la formation de tumeurs dans des modèles de cancer du sein et cancer du poumon avec mutation de PTEN et K-Ras respectivement (Blagden and Willis, 2011). EIF4E favoriserait ainsi la croissance tumorale en contrôlant la synthèse de protéines oncogéniques impliquées dans la survie, le cycle cellulaire, l'angiogenèse, le métabolisme énergétique et l'invasion tumorale. L'étendue des gènes contrôlés par mTOR a été récemment détaillée dans le cancer de la prostate (Hsieh et al., 2012). D'autres mécanismes contrôlés par mTORC1 peuvent favoriser la croissance tumorale, comme la synthèse lipidique. Le rôle de l'autophagie dans les tumeurs est quant-à-lui controversé et pourrait varier en fonction du type cellulaire et de l'environnement. En ce qui concerne le rôle de S6K1 dans la tumorigenèse, il reste incertain. Certains types de cancer, en particulier le cancer du sein, ont une surexpression de S6K1, de mauvais pronostic, due à une amplification de 17q23, qui contient le gène RPS6KB1 (Bärlund et al., 2000).

3.3 Le complexe mTORC2

3.3.1 Composition

Le complexe mTORC2 contient mLST8, deptor et mTOR, et plus spécifiquement Rictor (rapamycine insensitive companion of mTOR), mSIN1 et protor-1. Les fonctions et la régulation de ce complexe identifié plus tardivement que mTORC1, sont moins bien connues. Toutefois, il a été initialement décrit comme résistant à la rapamycine (Jacinto et al., 2004). La stabilité et l'intégrité de mTORC2 dépendent de la présence de mSIN1 et de Rictor. La protéine mLST8 est également nécessaire aux fonctions de mTORC2.

3.3.2 Substrats

mTORC2 contrôle différents membres de la famille des kinases AGC incluant les protéines Akt, SGK1 (serum-and glucocorticoid-induced protein kinase 1) et PKC- α (protein kinase C- α). En réponse aux facteurs de croissance, mTORC2 active directement Akt par phosphorylation sur la ser⁴⁷³ située dans son motif hydrophobe (Sarbassov et al., 2005). Cette phosphorylation, associée à la phosphorylation de la thr³⁰⁸ par PDK1, est nécessaire à l'activité maximale d'Akt, qui peut ainsi réguler divers processus cellulaires (croissance, prolifération, apoptose). Toutefois, certains travaux ont montré qu'en fonction de son statut de phosphorylation, Akt régule différemment ses substrats. L'inhibition de la phosphorylation d'Akt sur la ser⁴⁷³ par déplétion de mTORC2 bloque ainsi la phosphorylation de certaines cibles d'Akt comme FoxO1/3a alors que les phosphorylations de GSK3- β et de TSC2 ne sont pas modifiées (Guertin et al., 2006) (Jacinto et al., 2006). mTORC2 stabilise également Akt en le phosphorylant constitutivement sur la thr⁴⁵⁰, durant la traduction de son ARNm par le ribosome.

mTORC2 contrôle la phosphorylation de SGK1 sur la ser⁴²², après stimulation par les facteurs de croissance (García-Martínez and Alessi, 2008). SGK1 phosphoryle FoxO1/3a sur les mêmes résidus qu'Akt, mais également NDRG1. Cette kinase, surexprimée en cas de stress osmotique, est impliquée dans la régulation du transport de l'ion sodium. Parmi les autres cibles de mTORC2, on note PKC- α qui joue un rôle important dans l'organisation du cytosquelette d'actine ainsi que les protéines RhoA et Paxillin (Figure 9).

3.3.3 Régulation

La régulation de mTORC2 est loin d'être bien connue. La phosphorylation d'Akt sur la ser⁴⁷³ par mTORC2 est activée par les facteurs de croissance contrairement à la phosphorylation sur la thr⁴⁵⁰, suggérant des mécanismes régulateurs distincts. La production de PIP3 en aval des facteurs de croissance favorise le recrutement d'Akt à la membrane plasmique, or le recrutement de mTORC2 dans les rafts lipidiques est nécessaire à son activité kinase sur Akt. Le PIP3 pourrait ainsi permettre d'amener mTORC2 et son substrat Akt en contact étroit, mais il semble également capable d'activer directement mTORC2 in vitro (Gan et al., 2011). Par ailleurs, une interaction entre mTORC2 et la large sous-unité du ribosome a été mise en évidence récemment (Oh et al., 2010). Cette interaction est stimulée par la voie PI3K et favorise l'activité de mTORC2 (Zinzalla et al., 2011). Les mécanismes conduisant à cette activation restent à élucider.

Parmi les autres facteurs régulant mTORC2, on note la présence d'un axe TSC1/TSC2 fonctionnel, qui est nécessaire à son activité. Le rôle des acides aminés sur mTORC2 est controversé, certaines études ne montrant pas d'activation d'Akt par les AA (Jacinto et al., 2006) (Nobukuni et al., 2005) alors que d'autres obtiennent des résultats opposés, mais variant selon le type cellulaire et les conditions de culture (Tato et al., 2011). Enfin, les protéines partenaires de mTOR au sein du complexe mTORC2 peuvent être la cible d'évènements de phosphorylations, en particulier Rictor qui est phosphorylée par la S6K1 et par la kinase GSK3 β , modifiant son interaction avec mTOR et donc la fonctionnalité du complexe (Oh and Jacinto, 2011).

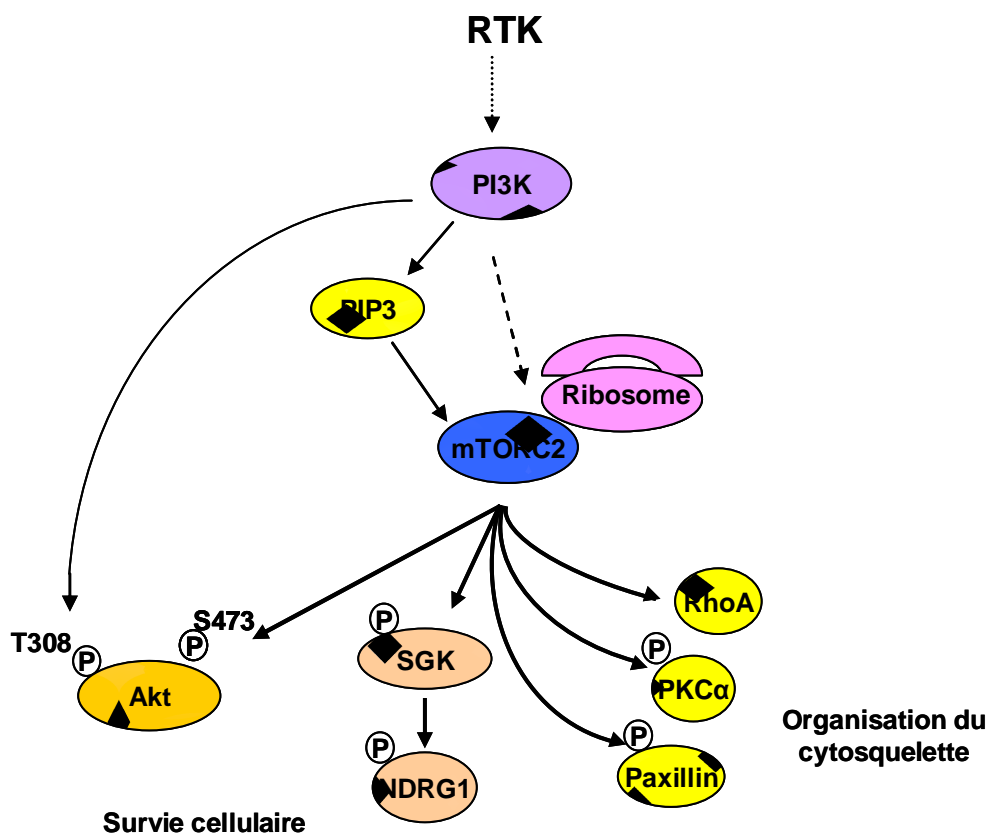


Figure 9. Régulation et cibles de mTORC2

PIP3 : phosphoinositide tris-phosphate; PKC- α : protéine kinase C- α ; RTK : récepteur tyrosine; SGK1 : serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1; NDRG1 : N-myc downstream regulated 1

3.3.4 Rôle oncogénique

Les fonctions contrôlées par mTORC2 incluant l'organisation du cytosquelette d'actine et la mobilité cellulaire, la prolifération cellulaire, l'apoptose peuvent participer au processus

tumoral. mTORC2 est hyperactivé dans de nombreux cancers (Manning and Cantley, 2007), ce constat étant récemment renforcé par son lien avec la voie PI3K située en amont, qui est elle-même très souvent dérégulée dans les cancers. Son rôle oncogénique a été démontré dans certains types de tumeurs. mTORC2 est nécessaire au développement de tumeurs prostatiques induites par délétion de PTEN chez la souris, puisque la croissance de ces tumeurs est inhibée par invalidation de Rictor (Guertin et al., 2009). Ce complexe favorise également la prolifération et la migration cellulaire dans des lignées de cancer du sein et de prostate (Hietakangas and Cohen, 2008) ainsi que dans les gliomes (Masri et al., 2007).

Les rôles respectifs de mTORC1 et de mTORC2 dans les mécanismes d'oncogénèse sont multiples et leur importance peut varier selon le type cellulaire. De plus, la présence d'interactions entre ces deux complexes ainsi que l'absence d'inhibiteur chimique spécifique de mTORC2 compliquent la compréhension de leurs rôles différentiels.

3.4 Interactions entre les différentes voies de signalisation

3.4.1 Rétrocontrôle négatif de mTORC1 sur la voie PI3K

Le complexe mTORC1 exerce un rétrocontrôle négatif sur la voie PI3K/Akt. La protéine S6K1 activée par mTORC1 phosphoryle IRS1, protéine adaptatrice nécessaire à l'activation de la voie PI3K en aval du récepteur à l'insuline, sur les ser³⁰⁹ et ser^{636/639}. IRS1 phosphorylée ne se lie plus à la PI3K, ce qui facilite sa dégradation par le protéasome (Um et al., 2004). Ce mécanisme a été confirmé dans des lignées cellulaires et dans des cellules primaires de cancers variés ainsi que dans les LAM et constitue une des limitations majeures des inhibiteurs allostériques de mTORC1, capables d'activer Akt en supprimant cette boucle de rétrocontrôle négative (O'Reilly et al., 2006) (Tamburini et al., 2008). Un autre mécanisme de régulation de la voie PI3K/Akt par mTORC1, indépendant de la S6K1, a été récemment décrit, impliquant Grb10 (Growth-receptor bound protein 10), une protéine adaptatrice se liant aux facteurs de croissance (Hsu et al., 2011) (Yu et al., 2011). mTORC1 phosphoryle directement Grb10 sur plusieurs sites et permet sa stabilisation. Grb10 peut ainsi jouer son rôle de régulateur négatif sur la signalisation en aval de facteurs de croissance.

3.4.2 Autres interactions entre mTORC1 et mTORC2

Un des principaux substrats de mTORC2 est la kinase Akt, qu'il phosphoryle sur la ser⁴⁷³. Or Akt contrôle mTORC1 par l'intermédiaire de l'axe TSC1/TSC2 et de PRAS40. Ceci place donc, en théorie, mTORC2 en amont de mTORC1 dans les modèles où l'activation de

mTORC1 est dépendante d'Akt. D'autres liens existent entre les deux complexes comme en témoignent la phosphorylation de Rictor sur la thr¹¹³⁵ par S6K1 qui s'accompagne d'un effet inhibiteur sur la phosphorylation d'Akt (Dibble et al., 2009).

3.4.3 Interactions avec d'autres voies de signalisation

L'inhibition prolongée d'une voie de signalisation conduit parfois la cellule cible à adopter un mécanisme compensateur en activant une voie alterne, qui peut varier en fonction du type de cancer et des anomalies moléculaires préexistantes. A côté de l'activation de la voie PI3K/Akt, secondaire à l'inhibition de mTORC1, la voie ERK/MAPK peut également être activée dans des conditions identiques, par l'intermédiaire de l'axe S6K1/PI3K/Ras (Carracedo et al., 2008). Dans des cellules de cancer du sein sur-exprimant le récepteur à activité tyrosine kinase HER2, l'inhibition de la voie PI3K entraîne une activation des récepteurs de la famille HER suivie d'une activation de la voie ERK/MAPK (Serra et al., 2011). Il est important de prendre en considération ces interactions entre différentes voies de signalisation oncogéniques, dont la fonction peut être en partie redondante, comme en témoigne par exemple la présence de substrats communs aux voies PI3K/Akt/mTOR et Ras/ERK/MAPK, lors de l'étude de traitements ciblés. Ces boucles de rétrocontrôle peuvent en effet être à l'origine de mécanismes de résistance au traitement.

3.5 Les inhibiteurs de mTOR

3.5.1 Inhibiteurs de première génération

Les inhibiteurs de première génération de mTOR comportent le sirolimus, également appelé rapamycine, et ses dérivés (everolimus, temsirolimus). Ils ont été découverts en 1970 sur l'île de Pâques (Rapa Nui en langage autochtone) et proviennent d'une bactérie filamenteuse, *Streptomyces hygroscopicus*. Il s'agit d'antibiotiques de la famille des macrolides aux propriétés antifongiques et immunosuppressives. La rapamycine est un inhibiteur allostérique de mTORC1, qui interagit avec mTOR, après fixation spécifique à la protéine FKBP12. Elle permet ainsi une dissociation de l'interaction mTOR/Raptor et exerce un effet inhibiteur précoce sur le complexe mTORC1 contrairement à mTORC2 (Guertin and Sabatini, 2009). Cependant, une exposition prolongée à la rapamycine permet d'inhiber également mTORC2 dans certains modèles cellulaires, en bloquant la formation du complexe (Sarbasov et al., 2006). Certains rapalogues (temsirolimus ou CCI-779 et everolimus ou RAD001) ont été approuvés pour le traitement du cancer du rein et du lymphome du manteau. Cependant, leurs

effets thérapeutiques ont été décevants dans divers essais cliniques sur d'autres tumeurs et plusieurs mécanismes de résistance ont été décrits. L'action inhibitrice de ces composés sur mTORC1 n'est que partielle puisque, selon le type cellulaire, certaines phosphorylations contrôlées par ce complexe échappent à leur effet inhibiteur, comme les phosphorylations de 4E-BP1 sur la thr^{37/46} et la ser⁶⁵ (Choo et al., 2008) (Tamburini et al., 2009). De plus, les rapalogues, en inhibant l'activité de S6K1, suppriment la boucle de rétrocontrôle négatif exercée par S6K1 sur PI3K. Ces effets peuvent expliquer la résistance de certains cancers, dont les LAM, aux rapalogues et ont justifié le développement d'inhibiteurs plus puissants de la kinase mTOR.

3.5.2 Inhibiteurs de seconde génération

Plusieurs sociétés pharmaceutiques ont développé parallèlement des inhibiteurs de mTOR de seconde génération, appelés TORKinhibs (mTOR kinase inhibitors). Parmi eux, certains agissent spécifiquement sur mTOR, tandis que d'autres ont un spectre d'action élargi aux PI3K. Cette nouvelle classe d'inhibiteurs de mTOR est définie par son mécanisme d'action. Il s'agit de petites molécules (Torin1, PP242, Ku-0063794, WAY600, AZD8055, OSI-027) qui entrent en compétition avec la fixation de l'ATP au niveau du site catalytique de la kinase et permettent son inhibition, quelles que soient les protéines partenaires auxquelles elle est associée. Ces composés inhibent donc mTOR au sein des deux complexes mTORC1 et mTORC2 avec une concentration inhibitrice médiane (IC50) de l'ordre du nanomolaire (García-Martínez et al., 2009) (Chresta et al., 2010). Ces inhibiteurs, via leur action sur mTORC2, empêchent l'activation d'Akt induite par les rapalogues et induisent une inhibition plus importante de mTORC1 puisqu'ils permettent la déphosphorylation des sites résistants à la rapamycine ainsi qu'une meilleure inhibition de la traduction (Feldman et al., 2009) (Figure 10). Une étude comparant le PI103 (inhibiteur double de mTOR et PI3K), le PP242 (inhibiteur catalytique de mTOR) et la rapamycine dans un modèle de leucémie aiguë lymphoblastique avec chromosome Philadelphie, a montré une supériorité, in vitro et chez la souris, des inhibiteurs de seconde génération de mTOR. De manière intéressante, dans cette étude l'inhibiteur double de mTOR/PI3K avait un effet immunosuppresseur plus marqué que l'inhibiteur sélectif de mTOR (Janes et al., 2010). Plusieurs de ces TORKinhibs ont montré une forte activité anti-tumorale sur un large éventail de tumeurs solides et hématologiques in vitro et sont actuellement en cours d'essais thérapeutiques de phase I/II.

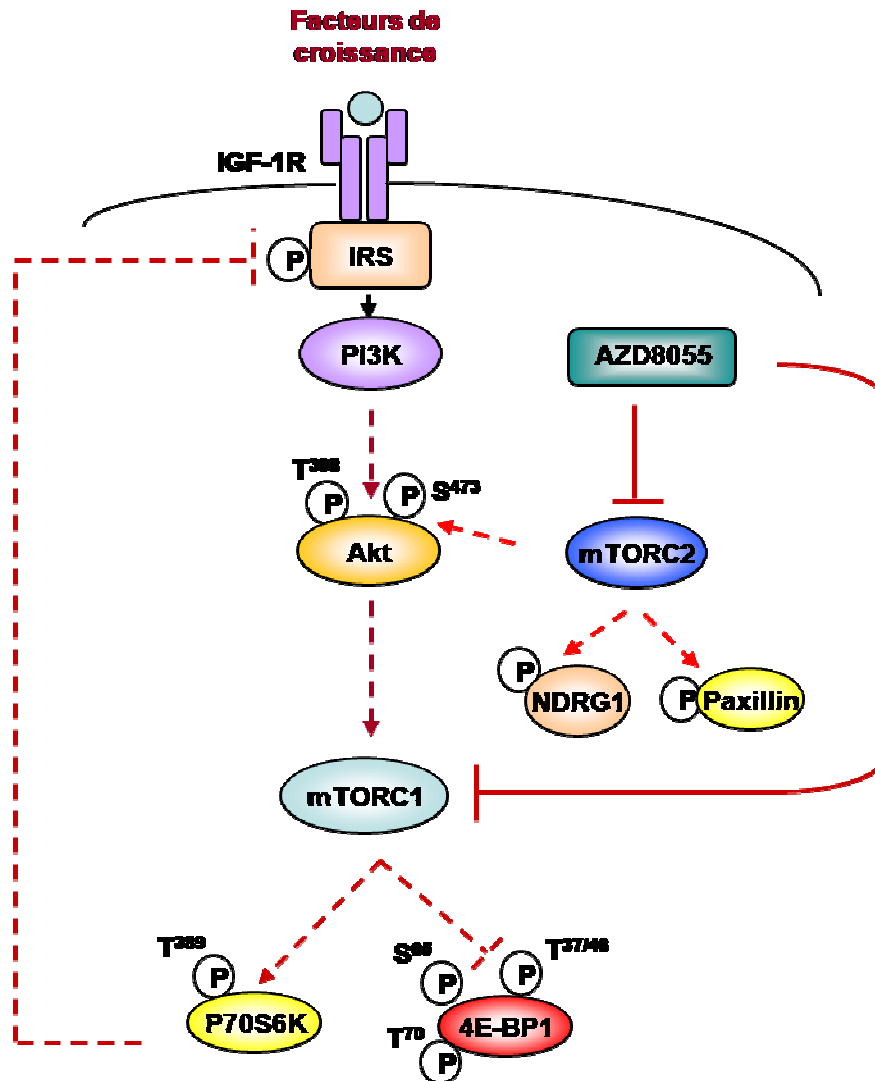


Figure 10 : Cibles des inhibiteurs catalytiques de mTOR, exemple de l'AZD8055

4. Glutamine et cancer

Les cellules normales et cancéreuses utilisent à la fois le glucose et la glutamine, le plus abondant des acides aminés présents dans le sérum, pour la production d'ATP, de substrats nécessaires à la synthèse d'acides aminés, de nucléosides et d'acides gras, mais également pour réguler le potentiel d'oxydoréduction via la synthèse de NADPH (nicotinamine adenine dinucleotide phosphate). Le glucose est donneur de carbone, d'oxygène et d'hydrogène pour les processus anaboliques et la production énergétique, tandis que la glutamine est le donneur essentiel d'azote pour la synthèse des bases purines et pyrimidines et d'acides aminés non essentiels. La dégradation de la glutamine permet également de fournir, indirectement, un intermédiaire du cycle de Krebs, l' α -cétoglutarate. L'équilibre entre ces différentes voies métaboliques est modifié dans les cellules normales en phase de prolifération et dans les

cellules tumorales, qui incorporent massivement glucose et glutamine tout en limitant l'utilisation du métabolisme oxydatif (Figure 11) (Levine and Puzio-Kuter, 2010).

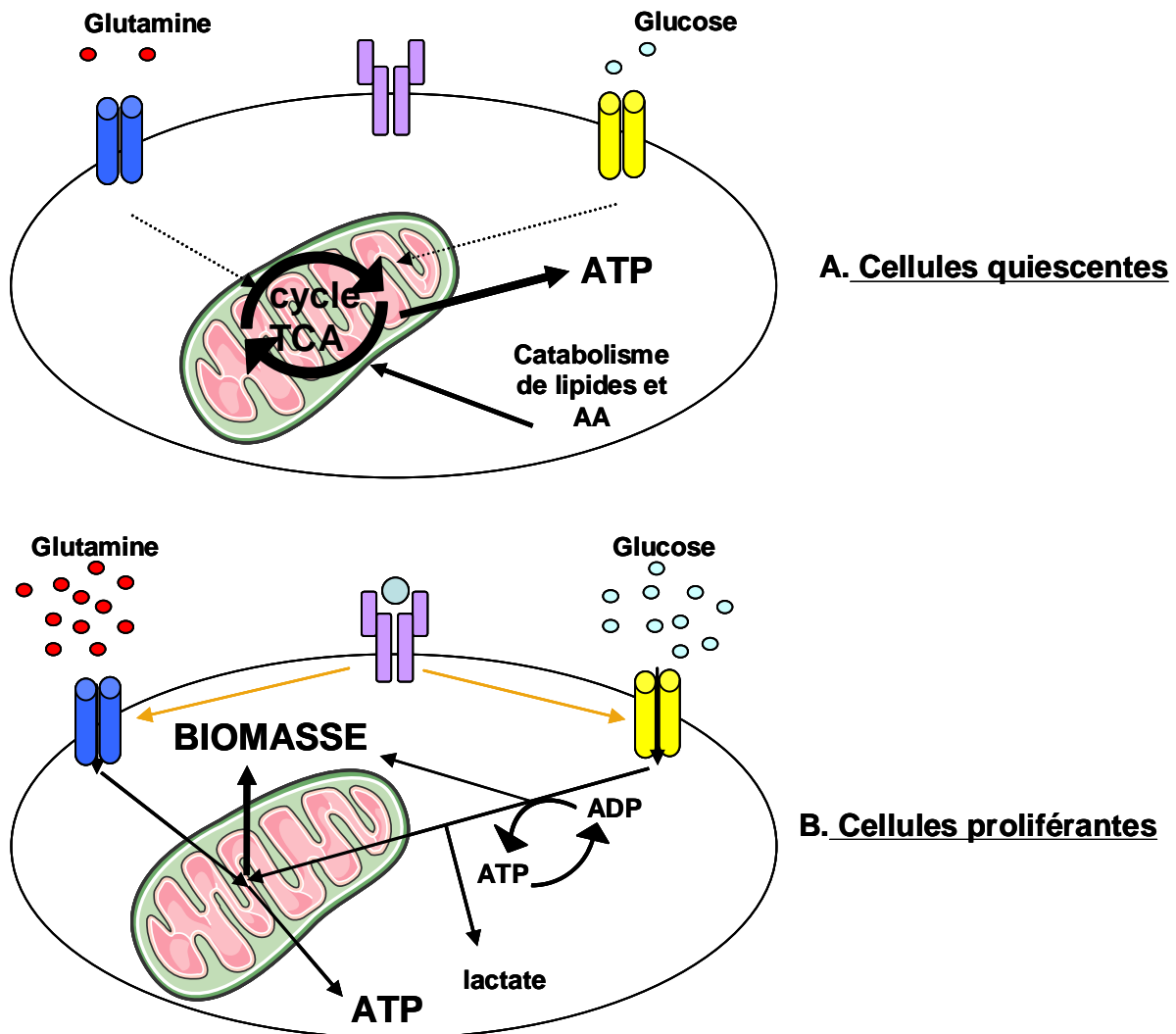


Figure 11 : Différence de métabolisme entre cellules quiescentes et cellules en prolifération, inspiré de (Ward and Thompson, 2012)

- A. En l'absence de stimulation par les facteurs de croissance, les cellules normales en phase de quiescence maintiennent leur production d'ATP en utilisant les produits de dégradation des acides aminés intracellulaires issus de l'autophagie et des lipides via le cycle TCA. L'utilisation du métabolisme oxydatif optimise la production d'ATP.
- B. Les cellules à fort taux de prolifération et les cellules tumorales augmentent leur utilisation de glutamine et glucose extracellulaires pour s'adapter à leurs besoins anaboliques. La glutamine et le glucose sont utilisés essentiellement pour synthétiser des lipides, des protéines et des acides nucléiques (biomasse). Le flux glycolytique augmenté se traduit par la production de lactate, un rendement énergétique diminué ainsi qu'une baisse du métabolisme oxydatif.

L'existence d'un métabolisme propre à la cellule tumorale a été mise en évidence en 1926 par Otto Warburg qui a constaté que les cellules cancéreuses, contrairement aux cellules normales, utilisaient préférentiellement la voie de la glycolyse pour dégrader le glucose, et ce même en condition de normoxie, alors que le rendement énergétique de cette voie (production d'ATP à partir d'une molécule de glucose) est nettement inférieur à celui de la phosphorylation oxydative utilisée par les cellules non cancéreuses. Cet effet « Warburg » s'accompagne d'une consommation accrue de glucose et d'une production de lactate, et peut être favorisé dans les cellules tumorales par diverses anomalies génétiques identifiées depuis (anomalies des voies Ras, PI3K/Akt, p53, VHL/HIF). Il pourrait permettre l'adaptation de la cellule tumorale à un microenvironnement défavorable, en moduler le pH ou encore favoriser la biosynthèse de macromolécules (Hsu and Sabatini, 2008) (Kroemer and Pouyssegur, 2008) (Mazzio et al., 2012). La glutamine, dont l'utilisation est également nettement augmentée dans les cellules tumorales, participe également aux besoins accentués de ces cellules en division.

4.1 L'import de glutamine

4.1.1 Généralités

La consommation de glutamine par des cellules en croissance *in vitro* est dix fois supérieure à celle des autres acides aminés (EAGLE, 1955). Les flux de glutamine sont contrôlés par des transporteurs situés au niveau de la membrane plasmique qui appartiennent à plusieurs familles de gènes classés en fonction de leurs substrats, de leur dépendance ionique, de leur régulation et de leurs propriétés cinétiques. Ils sont divisés en deux grands groupes déterminés par leur degré de dépendance au sodium. Un transporteur agit sur plusieurs acides aminés et inversement, chaque acide aminé est la cible de plusieurs transporteurs différents. Les transporteurs de la glutamine dépendants du sodium incluent les systèmes N, A, ASC/B^o, B^{o+} et y⁺L selon l'ancienne dénomination. Ils utilisent le potentiel énergétique du gradient de sodium transmembranaire, maintenu le plus souvent par les pompes Na⁺/K⁺ ATPase, pour importer les AA contre leur gradient de concentration. Les systèmes L, n et b^{o+} sont des transporteurs de glutamine indépendants de Na⁺. Un rôle physiologique important dans le transport de glutamine, variable selon le type cellulaire, a été déterminé pour au moins quatre transporteurs. SNAT3 (SLC38A3) permet l'import de glutamine dans les hépatocytes péri-portaux et dans les cellules tubulaires proximales du rein, et l'export de glutamine par les hépatocytes péri-veineux et les astrocytes. L'expression de SNAT1 (SLC38A1) est limitée

aux neurones, où il régule l'import de glutamine qui est ensuite convertie en glutamate, utilisé comme neurotransmetteur. B⁰AT1 (SLC6A19), isolé plus tardivement, est exprimé uniquement dans la peau, les reins et dans la bordure en brosse intestinale. ASCT2 (SLC1A5) est nécessaire à la capture de glutamine par les cellules épithéliales et les cellules tumorales en culture (McGivan and Bungard, 2007). Il n'existe que peu de données sur le transport de glutamine dans les cellules hématopoïétiques. Dans la lignée humaine de LAL-T, MOLT-4, la majorité de l'import de glutamine est dépendante du sodium (Ochiai et al., 2006).

4.1.2 Le transporteur SLC1A5

a. Données générales

Le transporteur SLC1A5, anciennement nommé ASCT2/ATB⁰ du nom de ses principaux substrats (alanine, serine, cystéine, thréonine) est le premier transporteur de glutamine à avoir été isolé dans les cellules de mammifères, en 1996 (Kekuda et al., 1996). Il s'agit d'un transporteur dépendant du sodium appartenant à la famille SLC1 (famille des transporteurs de haute affinité pour le glutamate et les acides neutres), ayant une forte affinité pour la glutamine. Il est constitué de 8 à 10 domaines transmembranaires, d'une longue extrémité hydrophobe C-terminale et de sites potentiels de phosphorylation par PKC. Son expression a été observée dans de nombreux organes (rein, poumon, pancréas, placenta, intestins, cerveau, muscle strié) (Bode, 2001). Les mécanismes de régulation de SLC1A5 sont encore mal connus, toutefois son expression dépend de la disponibilité en glutamine dans la lignée HepG2, dans laquelle la glutamine augmente l'expression de SLC1A5 en activant son promoteur (Bungard and McGivan, 2004). Les sérine/thréonine kinases de la famille PKC pourraient moduler l'expression de SLC1A5 et l'import de glutamine, quoique les résultats soient tout à fait discordants selon le type cellulaire étudié (Sidoryk-Wegrzynowicz et al., 2011). Une étude suggère un lien entre les kinases SGK et Akt et l'expression de SLC1A5 (Palmada et al., 2005).

b. Rôle oncogénique

SLC1A5 contrôle la plus grande partie de l'import de glutamine dans des lignées d'hépatome humain, de cancer du sein et de cancer du colon (Bode et al., 1995) (Collins et al., 1998). Son expression est augmentée dans les adénocarcinomes coliques (Witte et al., 2002). Des études récentes s'intéressent au rôle de ce transporteur dans la croissance tumorale, mais la plupart des données sont issues de lignées d'hépatome humain. Dans la lignée SK-Hep qui consomme

beaucoup de glutamine pour sa croissance, l'expression de SLC1A5 est nettement augmentée par rapport aux hépatocytes sains, et son inhibition à l'aide d'un ARN antisens induit de l'apoptose. La mort cellulaire induite par l'inhibition de SLC1A5 est plus rapide que celle induite par la privation en glutamine (Fuchs et al., 2004). La même équipe a montré par la suite que cet ARN antisens de SLC1A5 induit une inhibition de mTORC1 dans le modèle utilisé (Fuchs et al., 2007). Le rôle de SLC1A5 dans l'activation de mTORC1 a été depuis approfondi, comme détaillé précédemment (cf paragraphe 3.2.3.c). L'existence d'un lien entre SLC1A5 et une voie de signalisation aussi fréquemment hyperactivée dans les cancers que la voie mTORC1 renforce l'hypothèse d'un rôle oncogénique de ce transporteur de la glutamine, d'autant plus qu'il est également la cible directe de protéine oncogénique comme c-myc (Gao et al., 2009).

4.1.3 Autres transporteurs de glutamine impliqués en oncogénèse

D'autres transporteurs de la glutamine peuvent être surexprimés dans les cancers. Parmi eux, le transporteur SNAT2 (SLC38A2) est un transporteur de faible affinité pour la glutamine, exprimé de façon ubiquitaire. Son expression est augmentée par la privation en acides aminés (Hundal and Taylor, 2009). L'ARNm de SNAT2 est détecté dans la lignée MCF-7 de cancer du sein et l'inhibition prolongée de SNAT2 dans cette lignée par le méthylaminoisobutyrate (Me-AIB, composé qui agit en compétition avec les substrats du transporteur) diminue la croissance et la prolifération cellulaire (Pinilla et al., 2011). L'expression hétérologue de SNAT2 et SLC7A5 dans des ovocytes de xénope suggère que ces transporteurs agissent en coopération pour activer mTORC1, de manière similaire au couple SLC1A5/SLC7A5 dans les cellules de mammifères (Baird et al., 2009). Les effets de l'inhibition de SNAT2, par le Me-AIB ou par siARN, sur l'activation de mTORC1 sont controversés et dépendent des lignées étudiées. L'inhibition de SNAT2 dans des cellules musculaires de rat inhibe la voie mTORC1 (Evans et al., 2007), alors que son effet est opposé dans la lignée MCF-7 de cancer du sein (Pinilla et al., 2011).

Le transporteur SLC7A5 (ou LAT1) est un transporteur indépendant du Na⁺, de faible affinité pour la glutamine, dont les substrats préférentiels sont les AA avec une chaîne latérale aromatique ou branchée. SLC7A5 est surexprimé dans de nombreuses lignées de cancers incluant hépatocarcinomes, cancers du sein, cancers de l'estomac, cancers du poumon et mélanomes (Fuchs and Bode, 2005). Cependant, son rôle dans l'import de glutamine est incertain puisque celui-ci dépend essentiellement du sodium.

Enfin, une étude a constaté une augmentation de l'expression de l'ARNm de SNAT3 dans les gliomes malins primitifs (Sidoryk et al., 2004).

4.2 Métabolisme de la glutamine

4.2.1 La glutaminolyse

Dans la cellule, la glutamine peut-être, soit utilisée directement dans certaines réactions biochimiques, soit dégradée en glutamate par des enzymes, les glutaminases. Il existe quatre glutaminases mitochondriales (GA) identifiées chez les mammifères, codées par 2 gènes différents, dont les mécanismes de régulation et le rôle oncogénique ne sont pas les mêmes: la glutaminase de type 1 (GLS1 ou KGA pour kidney glutaminase A) et la glutaminase C (GAC), un variant d'épissage de KGA, ainsi que la glutaminase de type 2 (GLS2 ou LGA pour liver type GA) dont une forme courte vient d'être découverte (Martín-Rufián et al., 2012). GLS2 est exprimée essentiellement dans le foie, le cerveau et le pancréas tandis que GLS1 est exprimée surtout dans les hépatocytes embryonnaires, la plupart des tissus adultes, à l'exception du foie postnatal, et dans certains cancers (cancer du sein, cancer colorectal, LAL) (Curthoys and Watford, 1995) (Pérez-Gómez et al., 2005). Actuellement, il semble que GLS2, régulée par p53, joue un rôle anti-oncogénique en augmentant les défenses anti-oxydantes; son expression est diminuée dans les cancers hépatocellulaires et sa surexpression permettrait de diminuer la formation de colonies tumorales (Hu et al., 2010). Les mécanismes de régulation de KGA et GAC sont encore mal connus. L'expression de KGA est augmentée en réponse à c-myc, TGF- β , les Rho-GTPases via NF κ -B ou encore la voie Raf-Mek-Erk (Thangavelu et al., 2012). KGA, et surtout la GAC, semblent avoir un rôle oncogénique et pourraient constituer des cibles thérapeutiques (Cassago et al., 2012). L'inhibition de GAC diminue la prolifération et la clonogénicité de lignées de cancer du sein (Wang, Erickson, et al., 2010) et la formation de lymphomes induits par c-Myc dans un modèle murin (Le et al. 2012). L'inhibition de l'activité glutaminase diminue préférentiellement la croissance de lignées de gliomes lorsqu'elles expriment la forme mutée d'IDH1 (Seltzer et al., 2010). Dans ces lignées, la glutaminase est la première étape nécessaire à la formation du substrat d'IDH1 muté (l' α -cétoglutarate) dont une étude a montré qu'il était issu du catabolisme de la glutamine (Dang et al., 2009).

4.2.2 Synthèse de glutamine

La glutamine est synthétisée dans la cellule à partir d'acide glutamique et d'ammoniac en présence d'ATP; la réaction est catalysée par une enzyme très répandue, la glutamine synthase (GS), codée par le gène *GLUL* (glutamate-ammonia ligase). Cette réaction est impliquée dans l'élimination de l'ammoniac et du glutamate; son importance varie selon le contexte cellulaire avec une activité majeure dans les hépatocytes péri-veineux et dans les astrocytes qui recyclent le glutamate après son utilisation comme neurotransmetteur (Newsholme et al., 2003). L'expression de GS est régulée par un mécanisme transcriptionnel en réponse aux glucocorticoïdes et à la voie Wnt/ β -caténine notamment, et par un mécanisme post-traductionnel en réponse à la concentration de glutamine intracellulaire, impliquant le protéasome (Labow et al., 2001). Dans le foie, l'expression de la glutamine synthase est contrôlée directement par la voie Wnt/ β -caténine (Cadoret et al., 2002) et les mutations du gène de la β -caténine, fréquentes dans les hépatocarcinomes primitifs, sont corrélées à une surexpression de glutamine synthase (Cieply et al., 2009).

4.2.3 Réactions biochimiques cellulaires impliquant la glutamine et ses dérivés

Les cellules en croissance doivent synthétiser des acides aminés non essentiels (AANEs) et des acides nucléiques, qui sont tous deux des composés azotés. La glutamine est le donneur d'azote obligatoire dans trois étapes enzymatiques indépendantes de la synthèse des bases puriques (phosphorybosyl-pyrophosphate (PRPP) amidotransferase; phosphorybosyl-formyl-glycinamide (FGAM) synthetase et GMP synthetase) et dans deux réactions indépendantes de la synthèse des bases pyrimidiques (carbamoyl phosphate synthetase TT et CTP synthetase). Au cours de ces réactions, la glutamine donne son groupement amide et est convertie en glutamate. La glutamine est également le donneur d'azote obligatoire pour la synthèse d'asparagine à partir d'aspartate, réaction catalysée par l'asparagine synthétase (ASNS).

Le glutamate (ou acide glutamique) est le principal donneur d'azote pour la synthèse d'AANEs par l'intermédiaire des transaminases qui transfèrent son groupement amine aux α -cétoacides issus du catabolisme du glucose et de la glutamine, pour former l'alanine, la sérine, l'aspartate et l'ornithine. Les autres AANEs sont ensuite formés à partir de ces derniers ou du glutamate pour la proline. La tyrosine est le seul AANE qui n'est dérivé ni du glucose ni de la glutamine (Wise and Thompson, 2010). Le glutamate participe également à la synthèse de glutathion.

4.2.4 Autres fonctions de la glutamine

a. Activation de mTORC1

En plus de son rôle dans la synthèse d'acides aminés, la glutamine peut favoriser la synthèse protéique en activant mTORC1. Les mécanismes par lesquels la glutamine active mTORC1 sont discutés. La voie mTORC1 est activée lorsque la concentration intracellulaire d'AA est augmentée. Bien que parmi les AA contrôlant mTOR, les AA branchés et surtout la leucine aient un rôle prépondérant, la présence de glutamine permet une activation maximale de S6K1, soulignant le rôle privilégié de cet acide aminé dans le contrôle de cette voie (Hara et al., 1998) (Krause et al., 2002). Dans les cellules leucémiques de type Jurkatt, la privation en glutamine inhibe la phosphorylation de S6K1, indépendamment de la concentration en ATP et de l'état d'hydratation intracellulaire, et sans modifier la concentration intracellulaire en acides aminés branchés (Fumarola et al., 2005). L'étude de Nicklin, citée précédemment (Nicklin et al., 2009) souligne le rôle de la glutamine, nécessaire à l'entrée de leucine dans la cellule, par l'intermédiaire de la coopération entre les transporteurs SLC1A5 et SLC7A5.

b. La glutamine comme substrat mitochondrial

Le rôle du métabolisme oxydatif dans les cellules tumorales a été mis en évidence en 1971 par Kovacevic et al. qui observèrent la présence d'atomes de carbone issus de la glutamine dans le CO₂ relargué par des cellules de carcinome d'Ehrlich (Kovacević, 1971). L'oxydation de la glutamine nécessite la perte de son groupement amide au cours de sa transformation en glutamate via la glutaminase, suivie de la perte de son groupement amine lors de la conversion de glutamate en α -cétoglutarate par la glutamate déshydrogénase (GDH) qui utilise le NAD comme coenzyme (Figure 12). Ces deux réactions sont accompagnées d'une production d'ammoniac libre. L' α -cétoglutarate peut également être produit au cours des réactions de transamination qui permettent le transfert de l'amine du glutamate sur un acide α -cétonique pour former l'acide α -cétoglutarique et un acide aminé.

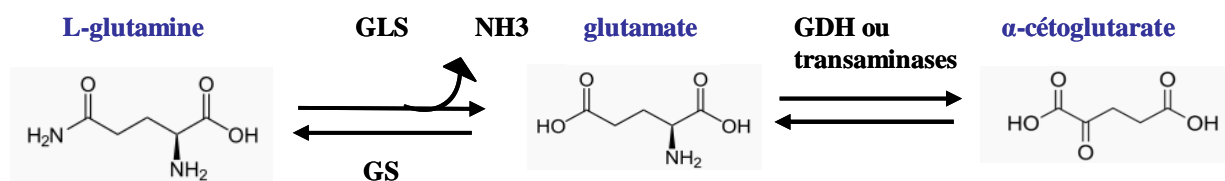


Figure 12 : Catabolisme de la glutamine

GDH : glutamate déshydrogénase ; GLS : glutaminase ; GS : glutamine synthase

L' α -cétoglutarate obtenu est un intermédiaire du cycle TCA qui peut soit constituer une source d'ATP, soit fournir des précurseurs à la synthèse de macromolécules. Ainsi, selon les conditions d'oxygénation, les cellules de glioblastome utilisent différemment l' α -cétoglutarate issu du catabolisme de la glutamine pour la synthèse de citrate, source de NADPH. En normoxie, le citrate est produit à partir d'acétyl-CoA et d'oxaloacétate, issus respectivement du glucose et de l'oxydation d' α -cétoglutarate dépendante du cycle TCA. En hypoxie, la production d'acétyl-CoA à partir du glucose, qui est transformé en lactate, diminue; les cellules utilisent alors des réactions de carboxylation qui permettent la réduction d' α -cétoglutarate en isocitrate (par IDH) puis en citrate (Wise et al., 2011). D'autres résultats obtenus à partir de données de spectroscopie par résonance magnétique au ^{13}C , également dans une lignée de glioblastome, suggèrent que les besoins cellulaires en glutamine excèdent la demande azotée nécessaire à la synthèse des acides nucléiques et des AANEs. Dans ces cellules, une partie de la glutamine est utilisée pour maintenir les réserves d'oxaloacétate et de NADPH, et participe à la production de lactate (DeBerardinis et al., 2007).

4.3 Mécanismes d'addiction à la glutamine

Certains cancers utilisent préférentiellement la glutamine, comme substrat donneur de carbone pour la biosynthèse de macromolécules, au lieu du glucose (Le et al., 2012) (Metallo et al., 2012) (Mullen et al., 2012). Ces divergences de métabolisme dépendent du type de tumeur, des anomalies moléculaires sous-jacentes et du microenvironnement non tumoral. Le niveau d'expression des différentes enzymes impliquées dans le métabolisme de la glutamine apparaît être un élément majeur dans la dépendance des cellules tumorales à la glutamine.

4.3.1 Niveau d'expression de la glutamine synthase et des glutaminases

L'expression et l'activité d'enzymes impliquées dans le métabolisme du glucose et de la glutamine, étudiées dans des modèles murins de tumeurs (foie et poumon) varient selon l'oncogène transformant (Met ou Myc). Les tumeurs hépatiques induites par Met sont associées à des mutations du gène codant pour la β -caténine, à une augmentation de glutamine synthase (GS) et à une diminution des GLS. Leurs besoins en glutamine extracellulaire sont faibles, contrairement aux tumeurs hépatiques induites par Myc dans lesquelles l'expression de GS est diminuée (Yuneva et al., 2012). L'étude de la prolifération et de la viabilité cellulaire en réponse à la privation en glutamine, dans des lignées de cancer du sein, a montré une variabilité en fonction du type cellulaire (basal ou luminal) défini à partir du profil d'expression génique. Les lignées de type basal, sensibles à la privation en glutamine, ont une

expression faible de GS et élevée de GLS1, contrairement aux lignées de type luminal (Kung et al., 2011). Des résultats similaires sont observés dans des cellules primaires de cancers du sein. Dans ce modèle, l'inhibition spécifique de la glutamine synthase supprime la relative indépendance des cellules de type luminal à la glutamine.

Les niveaux relatifs de GS et de GLS1 sont régulés par plusieurs voies de signalisation ou facteurs de transcription fréquemment dérégulés dans les tumeurs, dont les voies Wnt/ β -caténine et Raf/MEK/Erk et le facteur de transcription c-Myc (Figure 13).

4.3.2 Rôle de l'oncogène c-Myc

Le facteur de transcription Myc contrôle de nombreux gènes impliqués dans les fonctions des cellules souches, la différenciation, la croissance cellulaire et le métabolisme. Son expression est fréquemment dérégulée dans les cancers, incluant les hémopathies (Dang, 2012). Myc contrôle ainsi plusieurs enzymes impliquées dans la glycolyse, le cycle TCA, la respiration mitochondriale et la synthèse nucléotidique. Il active directement la transcription de deux transporteurs de haute affinité pour la glutamine : SLC38A5 (ou SN2) et SLC1A5 (Wise et al., 2008) et favorise l'expression de GLS1 par un mécanisme post-transcriptionnel, en inhibant l'expression du micro-ARN miR-23a/b dans des lignées de lymphome B et de cancer de la prostate (Gao et al., 2009). La privation en glutamine, et non en glucose, induit de l'apoptose dans des cellules cancéreuses transformées par l'oncogène Myc (Yuneva et al., 2007). Cette addiction à la glutamine peut varier selon le tissu cellulaire. Les travaux de Yuneva cités précédemment ont mis en évidence des différences dans le métabolisme de tumeurs induites par Myc selon l'organe cible (foie ou poumon) avec des variations dans l'expression de GS, alors que dans les deux organes, GLS1 et LDHA (lactate deshydrogénase A) sont augmentées (Yuneva et al., 2012). Dans les LAM, plusieurs mécanismes peuvent conduire à la dérégulation de Myc, incluant l'amplification de gène (peu fréquente dans ces pathologies), la trisomie du chromosome 8 ou encore la surexpression (Högstrand et al., 2012).

4.3.3 Autres voies impliquées

Plusieurs autres voies de signalisation sont impliquées dans le contrôle du métabolisme de la glutamine. Les données existantes suggèrent qu'en cas de surexpression de GLS1 en aval d'une voie oncogénique, les cellules tumorales sont fortement sensibles à l'inhibition spécifique de GLS1. Cependant, dans ces modèles, l'addiction à la glutamine n'est pas formellement démontrée.

a. La voie NFκ-B

L'activité glutaminase de type 1 est nécessaire au pouvoir transformant de différentes Rho-GTPases dans des lignées de cancer du sein, dont la prolifération est inhibée par le composé 968 qui agit spécifiquement sur GAC. NFκ-B, activé en aval des Rho-GTPases, est indispensable à l'augmentation de l'activité de GAC dans ce modèle (Wang, Erickson, et al., 2010). Le mécanisme par lequel NFκ-B augmente l'activité glutaminase a été récemment étudié dans la lignée Jurkatt, issue d'une LAL-T. La sous-unité p65 de NFκ-B se lie au promoteur de miR-23a et réprime la transcription de ce micro-RNA qui cible l'ARNm de GLS1. La surexpression de p65 augmente la prolifération des cellules leucémiques dans un milieu riche en glutamine (Rathore et al., 2012).

b. La voie Raf/MEK/ERK

L'activation de lymphocytes T naïfs augmente l'expression des transporteurs SNAT2 et l'import de glutamine, ainsi que l'expression des transaminases GOT et GPT, de GDH et de GLS. L'induction de ces enzymes et l'incorporation de glutamine sont bloquées par l'inhibition de Erk dans ce modèle (Carr et al., 2010). L'activité enzymatique de GLS1 est activée en réponse à l'EGF, via la voie de signalisation Raf/MEK/Erk (Thangavelu et al., 2012). Les mécanismes de cette activation ne sont pas connus mais nécessitent la formation d'un complexe associant Raf-1, MEK2, Erk1/2, PP2A et GLS1 dans des cellules 293T.

c. La voie Wnt/β-caténine

La voie Wnt/β-caténine joue un rôle important dans la croissance cellulaire, le développement et la différenciation des cellules souches normales. La liaison du ligand Wnt au récepteur Frizzled à la membrane plasmique, prévient la phosphorylation de la β-caténine par GSK3-β, nécessaire à sa dégradation par le protéasome. La β-caténine ainsi stabilisée est relocalisée dans le noyau où elle active la transcription de ces gènes cibles, parmi lesquels cycline D1, c-Myc et le gène Glul codant pour la GS. Une activation aberrante de la voie Wnt/β-caténine est fréquente dans de nombreux cancers dont les adénocarcinomes coliques, les carcinomes hépatocellulaires et les cancers du sein (Yao et al., 2011). Dans les LAM, cette voie est fréquemment dérégulée, notamment par l'hyperméthylation de gènes inhibiteurs de Wnt (Hou et al., 2011) et participerait à l'auto-renouvellement des cellules souches leucémiques (Wang, Krivtsov, et al., 2010). Les liens entre la voie Wnt/β-caténine et le métabolisme de la glutamine ont été étudiés exclusivement dans les cancers hépatiques. Une étude suggère une

addiction à la glutamine qui diffère selon la présence ou non de mutations de la β -caténine dans des lignées d'hépatocarcinome (Tardito et al., 2011a).

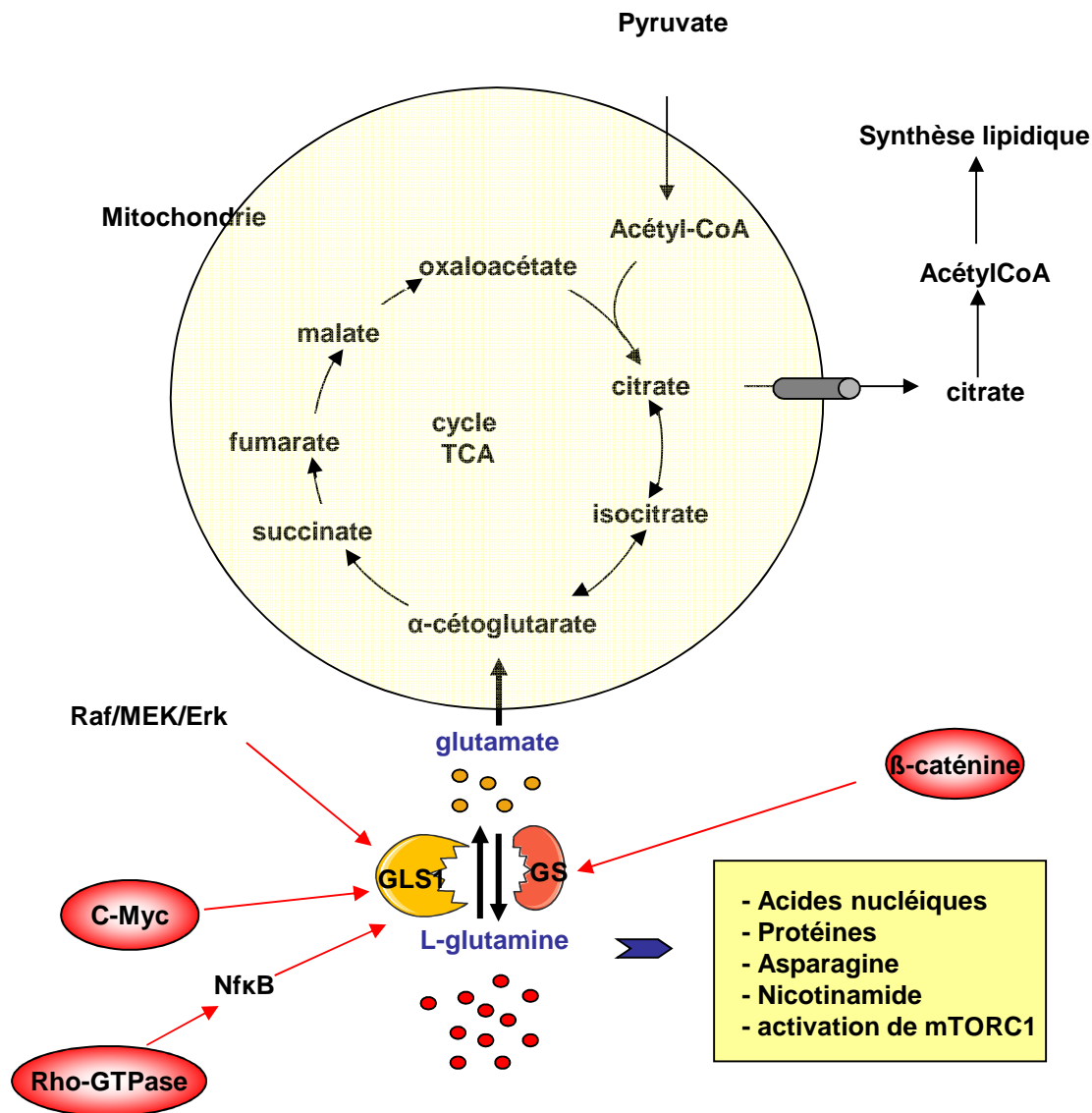


Figure 13 : Métabolisme de la glutamine : régulation et fonctions

GLS1: glutaminase 1 (KGA); GS: glutamine synthase

4.4 Outil thérapeutique à activité glutaminase, la L-asparaginase

4.4.1 Généralités

La L-asparaginase (L-ASE) est une enzyme d'origine bactérienne, utilisée depuis plus de 40 ans dans le traitement d'induction et de consolidation des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL), dont elle est un élément majeur. Utilisée seule, elle permet d'obtenir jusque 60% de rémission complète (RC), et en association avec la vincristine, la daunorubicine et les

corticoïdes, les taux de RC sont de près de 95% dans les LAL de l'enfant (Pui and Evans, 2006). Les deux formes de L-ASE utilisées en thérapeutique sont issues d'*Escherichia coli* (Kidrolase® ou Oncaspar®, forme pégylée) et d'*Erwinia chrysanthemi* (Erwinase®). La L-ASE catalyse l'hydrolyse de L-asparagine (ASN) en aspartate et ammonium. A côté de cette réaction principale, la L-ASE a également une activité glutaminase (correspondant à 3% et 10% de l'activité asparaginase pour la Kidrolase® et l'Erwinase®, respectivement) qui dégrade la glutamine (GLN) en glutamate, libérant également de l'ammonium. La sensibilité des LAL à la L-ASE est liée à une diminution voire une absence d'activité Asparagine synthase (ASNS) dans les cellules tumorales, qui rend les blastes de LAL dépendants de l'asparagine présente dans le milieu extracellulaire. L'utilisation de L-ASE dans les LAL est limitée par ses effets indésirables, incluant une coagulopathie- secondaire à un défaut de synthèse hépatique des protéines plasmatiques- responsable de thromboses en particulier au niveau cérébral, des insuffisances hépatiques et pancréatiques, des réactions d'hypersensibilité et une immunosuppression. L'activité glutaminase de la L-ASE est tenue en partie responsable de ces complications (Kafkewitz and Bendich, 1983). In vivo, l'apparition d'anticorps neutralisants chez la majorité des patients traités par L-ASE native issue d'*Escherichia coli*, qu'ils présentent ou non des réactions d'hypersensibilité, s'accompagne d'une diminution d'activité asparaginase sérique et pourrait favoriser la perte de réponse au produit (Panosyan, Seibel, et al., 2004). L'utilisation de la forme pégylée de L-ASE permet de réduire la production d'anticorps de haut-titre de 26% à 2% après induction (Avramis et al., 2002). En cas d'apparition d'une réponse immunogène, l'utilisation de L-ASE issue d'*Erwinia chrysanthemi* constitue une alternative intéressante étant donné l'absence de réaction d'hypersensibilité croisée entre ces deux produits (Willer et al., 2011).

4.4.2 Rôle de l'activité glutaminase de la L-asparaginase

a. Données cliniques sur les taux d'AA sériques

Les données sur les taux d'AA sériques après traitement par L-ASE chez l'homme sont difficiles à interpréter en raison d'une variabilité inter-étude, concernant le type de L-ASE, la posologie et le mode d'administration utilisés. Toutefois, il existe une forte corrélation entre les concentrations sériques de GLN et d'ASN et l'activité asparaginase (ASNase) sérique. L'utilisation de L-ASE native (Kidrolase®) s'accompagne d'une diminution rapide et précoce des taux d'ASN et GLN qui atteignent des valeurs indétectables en quelques heures. Tandis que les taux d'ASN restent effondrés plusieurs jours après l'arrêt des injections de L-ASE et

malgré l'absence d'activité résiduelle enzymatique, les taux sériques de GLN augmentent dès l'arrêt du traitement (Miller et al., 1969). Une activité enzymatique supérieure à 0.1UI/mL semble suffisante pour maintenir des taux d'ASN sériques très faibles (Müller and Boos, 1998), quoique ces données pourraient varier en fonction du type de L- ASE utilisée puisque la déamination optimale d'ASN semble nécessiter la déamination préalable de GLN, qui ne peut ainsi plus participer à la synthèse de novo d'ASN (Panosyan, Grigoryan, et al., 2004). Des injections répétées de 25 000UI/m² d'Erwinase® toutes les 48 heures permettent d'obtenir des taux sériques d'ASN et GLN largement inférieurs aux valeurs pré-thérapeutiques (ASN<1µM et GLN~25µM sous L-ASE versus ASN~50µM et GLN~320µM avant traitement) (Avramis et al., 2007). La comparaison d'une injection d'asparaginase pégylée et d'injection répétées de L-ASE native ne montre pas de différence sur les taux sériques d'ASN et GLN obtenus (Avramis et al., 2002). Dans cette étude, la concentration d'ASN diminue rapidement pendant quatre jours, avant de se stabiliser aux alentours d'1µM pendant 3 semaines, tandis que la concentration de GLN diminue pendant les 2 premières semaines de manière corrélée à l'activité ASNase (une activité ASNase supérieure à 0,4UI/mL permet le maintien de taux de GLN inférieurs à 100µM).

b. Historique : développement d'enzymes à activité glutaminase

Devant l'implication potentielle de l'activité glutaminase de la L-ASE dans son effet anti-leucémique, plusieurs groupes ont testé l'effet anti-leucémique d'enzymes bactériennes à activité essentiellement glutaminase dans les années 1980. Une étude a observé une diminution importante des blastes circulants de LAM et LAL, sous traitement par une asparaginase-glutaminase issue d'*Achromobacter sp*, chez 7/7 patients traités, dont 4 étaient résistants à la L-ASE (Spiers and Wade, 1976). Cependant, des études ultérieures de phase I et II avec une asparaginase-glutaminase issue d'*Acinetobacter* ont mis en évidence une importante neurotoxicité (encéphalopathie et coma) ayant mis fin prématurément aux essais chez l'homme (Warrell et al., 1980) (Warrell et al., 1982). Ces résultats soulignent l'importance de l'activité glutaminase des L-ASE ainsi que la nécessité de comprendre les mécanismes cellulaires sous-jacents pour en limiter la toxicité.

4.4.3 Voies de signalisation régulées par la L-asparaginase

Des variations dans la disponibilité en acides aminés peuvent s'accompagner d'importantes modifications des fonctions cellulaires affectant aussi bien les voies de signalisation, que l'expression de gènes ou le transport et le métabolisme des AA. Deux principales voies de

signalisation sont modulées par les concentrations en AA : 1/ la voie GCN (general control nonrepressed), hautement conservée entre les espèces ; 2/ la voie mTORC1. L'action de la L-ASE sur ces deux voies de signalisation, additionnée à la déplétion en ASN et GLN en soi, explique son effet inhibiteur sur la synthèse protéique.

a. La voie GCN

En condition de privation, la diminution des concentrations intracellulaires d'acides aminés augmente la quantité d'ARN de transfert (ARNt) non chargés, ce qui permet l'activation de la protéine kinase GCN2. Celle-ci phosphoryle alors la ser⁵¹ de la sous-unité α du facteur d'initiation de la traduction eIF2 α (Ramirez et al., 1992). EIF2 α phosphorylé inhibe eIF2B et diminue la formation du complexe ternaire d'initiation de la traduction (eIF2-GTP-Met-tRNA_i^{Met}) qui transfère la première méthionine au ribosome. La voie GCN activée permet ainsi de réprimer la synthèse protéique globale, mais est également capable d'augmenter la traduction d'un petit nombre de protéines dont le facteur de transcription ATF4 (activating transcription factor 4). Ce dernier active la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme des acides aminés, la réponse au stress du réticulum endoplasmique et l'homéostasie d'oxydoréduction, parmi lesquels le gène de l'ASNS, afin de limiter le stress lié aux déficiences en AA (Ye et al., 2010). Lorsque la réponse AADR (amino acid deprivation response) est insuffisante pour faire face au stress, la cellule change son programme d'expression de gènes vers une mort cellulaire programmée en activant notamment la transcription du facteur pro-apoptotique CHOP (CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein). L'inhibition d'ATF4 par shARN induit de l'apoptose dans des lignées d'adénocarcinome colorectal et de fibrosarcome en condition de culture dépourvue d'AANes et sensibilise également ces cellules à la privation en GLN.

La L-ASE augmente la phosphorylation d'eIF2 α et induit une réponse de type AADR, principalement dépendante de GCN2, à l'exception du gène CHOP, dans le foie et la rate de souris (Bunpo et al., 2009). Cette réponse AADR, ainsi que l'inhibition de synthèse protéique hépatique, varie avec l'activité glutaminase de la L-ASE (Reinert et al., 2006). Chez l'homme, le gène de l'ASNS, régulé par la réponse AADR est augmenté dans les cellules de LAL traités par L-ASE.

b. La voie mTORC1

La régulation de mTORC1 par les acides aminés et par la glutamine a été détaillée précédemment. Il existe peu de données sur les liens entre L-ASE et mTOR. Une étude

montre une inhibition des cibles de mTORC1 (S6K1 et 4E-BP1) par la L-ASE issue d'*E.coli* dans des lignées leucémiques de LAL, alors que l'activité d'autres sérines/thréonine kinase étudiées (Akt, p90rsk, cdk2) n'est pas modifiée (Iiboshi et al., 1999). Dans cette étude, l'activité kinase de S6K1, mesurée in vitro, diminue en présence de L-ASE mais également en condition de culture sans GLN ou sans ASN. Les auteurs observent également une diminution de l'effet de la L-ASE sur S6K1 dans un clone de la lignée Jurkatt résistant à la L-ASE par rapport à la lignée parentale. Ces résultats sont sujets à caution car il s'agit d'un travail unique. La L-ASE d'*E.coli* inhibe également mTORC1 dans certains tissus sains (foie et pancréas) in vivo chez la souris, alors que l'utilisation d'une L-ASE dépourvue d'activité glutaminase (issue de *Wolinella succinogenes*) n'a pas d'effet sur mTORC1 dans ces tissus (Reinert et al., 2006). Dans les travaux comparant l'effet de la L-ASE sur les tissus sains dans des souris GCN2^{+/+} et GCN2^{-/-}, les auteurs observent une inhibition de mTORC1 par la L-ASE dans les souris GCN2^{+/+}, contrairement aux souris GCN2^{-/-}. Ceci souligne l'existence d'un lien complexe et bidirectionnel entre les voies GCN et mTOR, puisque la rapamycine, inhibiteur de mTORC1, peut limiter l'induction d'un des gènes cibles de la voie AADR, le gène CHOP, par la L-ASE (Bunpo et al., 2009).

4.4.4 Glutamine synthase et résistance à la L-asparaginase

La principale limitation de l'efficacité de la L-ASE dans les leucémies aiguës est l'apparition rapide d'une résistance clinique. La L-ASE induit une augmentation de l'expression et de l'activité de l'asparagine synthase (ASNS) dans les lignées de LAL ainsi que chez les patients (Hutson et al., 1997) (Appel et al., 2006). Les données in vitro suggèrent une corrélation entre la résistance à la L-ASE et l'augmentation de l'activité, de l'ARNm et de l'expression protéique d'ASNS. Toutefois, in vivo, chez les sujets atteints de LAL, les liens entre sensibilité à la L-ASE et ASNS sont controversés, puisque ni le taux basal d'ASNS, ni le niveau d'expression après exposition à la L-ASE ne permettent de prédire la sensibilité au traitement (Appel et al., 2006) (Hermanova et al., 2012).

La déplétion en glutamine induite par la L-ASE est un élément important dans la compréhension des effets cytotoxiques et anti-leucémiques de cette drogue. La glutamine est produite à partir du glutamate par la glutamine synthase (GS). De façon similaire à ce qui est observé pour l'ASNS, la L-ASE induit une forte augmentation de l'activité enzymatique de GS dans la lignée MOLT-4 (lignée de LAL-T) (Aslanian and Kilberg, 2001). Cette augmentation ne s'accompagne pas de variation du taux d'ARNm de GS, mais pourrait impliquer des mécanismes de régulation post-traductionnels affectant la stabilité de la

protéine. Dans cette étude, la comparaison des niveaux d'activité GS dans des lignées MOLT-4 en fonction de leur sensibilité à la L-ASE montre qu'il existe, dans la lignée résistante, une augmentation de l'activité GS basale, mais également après induction par la L-ASE, par rapport à la lignée sensible. Plusieurs équipes ont testés l'effet fonctionnel d'un inhibiteur de GS, la L-méthionine-sulfoximine (MSO), en addition à la L-ASE, dans des lignées résistantes à la L-ASE de LAL-T, de fibrosarcome de rat ou encore d'hépatocarcinome humain (Aslanian and Kilberg, 2001) (Rotoli et al., 2005) (Tardito et al., 2011). Dans ces différents travaux, l'inhibition de GS restaure la sensibilité à la L-ASE des lignées résistantes. L'augmentation de l'activité enzymatique de GS pourrait constituer un mécanisme d'adaptation à la L-ASE, favorisant la survie cellulaire dans un milieu appauvri en GLN. Toutefois, cette hypothèse reste à valider in vivo. Chez l'enfant, une étude d'expression génique dans les LAL pré-B a identifié un groupe de trois gènes, parmi lesquels le gène GLUL qui code pour GS, dont les niveaux d'expressions seraient prédictifs du risque de rechute à long terme. Cependant, dans cette étude, le risque de rechute est lié à un faible niveau d'expression de GLUL, déterminé sur des prélèvements au diagnostic (Hoffmann et al., 2008). Dans une autre étude, l'analyse de données transcriptomiques chez 173 enfants atteints de LAL a identifié 35 gènes différentiellement exprimés dans les LAL sensibles ou résistantes à la L-ASE, la sensibilité à la drogue ayant été définie in vitro sur un test de viabilité cellulaire (holleman 2004). Un grand nombre de ces gènes est impliqué dans le métabolisme des protéines, mais ni le gène de l'ASNS ni GLUL n'étaient identifiés dans cette étude.

4.4.5 Données dans les LAM

Alors que le rôle de la L-ASE n'est plus à démontrer dans les LAL, son effet dans les LAM est incertain. Lors du développement initial de cette enzyme, dans les années 1970-1980, les premières études en monothérapie incluaient un faible nombre de sujets atteints de LAM, avec des taux de rémission complète aux alentours de 10% en monothérapie, n'ayant pas conduit au développement d'études sur de plus larges cohortes (Clarkson et al., 1970) (Ohnuma et al., 1970). Cependant, dans les LAM réfractaires ou en première rechute, une étude randomisée chez l'adulte (n=195) a comparé l'effet de l'aracytine haute-dose associée ou non à la L-ASE (*E.coli*) à raison d'une injection de 6000UI/m² à J2 et J9. L'administration conjointe d'aracytine et de L-ASE s'accompagnait d'une augmentation significative du taux de rémission complète (40 vs 24%) (Capizzi et al., 1988). Cette association aracytine/L-ASE est utilisée en consolidation dans certains protocoles des LAM de l'enfant (Perel et al., 2005).

In vitro, plusieurs équipes ont comparé la sensibilité à la L-ASE des blastes de LAL et de LAM, prélevés au diagnostic, dans une population d'enfants. Ces études observent toutes une diminution de la sensibilité à la L-ASE (estimée par la mesure de la viabilité cellulaire à 4 jours d'exposition à la drogue) des LAM par rapport aux LAL, avec cependant d'importantes variations en fonction des sous-types de la classification FAB. Ainsi, les LAM de type M1, M4 et M5 semblent présenter une sensibilité à la L-ASE plus importante que les autres sous-types, avec selon les études, une sensibilité des LAM M1 ou LAM M5 in vitro identique à celle des LAL (Zwaan et al., 2000) (Yamada et al., 2001) (Okada et al., 2003).

La majorité des données détaillées précédemment, concernant L-ASE et LAM, sont assez anciennes. Au vu de la progression croissante des connaissances sur le rôle de la glutamine dans les pathologies tumorales et de son lien avec la voie mTORC1, il nous a semblé intéressant d'étudier l'impact de l'activité glutaminase de la L-ASE dans les LAM, et son rôle sur la voie de signalisation mTOR, fréquemment dérégulée dans ces hémopathies.

5. Résultats

5.1 L'AZD8055, inhibiteur catalytique de mTOR, a un effet anti-leucémique

Durant la première partie de mon travail de thèse, je me suis intéressée à l'effet de l'AZD8055, un inhibiteur de l'activité catalytique de mTOR, dans les LAM. Les travaux antérieurs du laboratoire ont en effet montré qu'il existe une activation de mTORC1, évaluée sur la phosphorylation des protéines S6K1 sur la thr³⁸⁹ et 4E-BP1 sur la thr^{37/46}, dans plus de 70% des blastes primaires au diagnostic de LAM. L'utilisation du RAD001, analogue de la rapamycine, pour inhiber mTORC1, s'accompagne de deux limitations majeures: 1/ le RAD001 active la voie PI3K/Akt (comme en témoigne l'augmentation de la phosphorylation d'Akt sur la ser⁴⁷³) en levant la boucle de rétrocontrôle négatif exercée par S6K1 sur la signalisation IRS-2/IGF1-R. Cependant ce mécanisme n'explique que partiellement la résistance des LAM au RAD001 car l'association d'IC87114 (inhibiteur spécifique de la sous-unité catalytique p110 δ des PI3K) au RAD001, bien que majorant significativement la diminution de prolifération des blastes primaires induite par le RAD001 seul, n'induit que peu d'apoptose (Tamburini et al., 2008); 2/ Certains évènements de phosphorylation de 4E-BP1 sont résistants au RAD001 qui n'affecte donc pas significativement la synthèse protéique dans les LAM (Tamburini et al., 2009). Dans ce travail, Jérôme Tamburini a utilisé un inhibiteur spécifique de la traduction cap-dépendante, le 4EGI-1 qui agit par mimétisme de 4E-BP1 en se liant à eIF4E. Cet inhibiteur a un important effet anti-leucémique *in vitro*, soulignant l'intérêt de bloquer efficacement la synthèse protéique dans les LAM. Par ailleurs, la voie mTORC2, évaluée sur la phosphorylation d'Akt sur la ser⁴⁷³, est également activée constitutivement dans 50% des échantillons primaires de LAM, probablement en lien avec la voie PI3K (Tamburini et al., 2007) et la rapamycine n'a, a priori, pas d'effet sur ce complexe dans les LAM. Dans ce but, Sophie Park et Nicolas Chapuis ont étudié l'effet de deux inhibiteurs doubles de mTORC1/2 et de PI3K, appartenant à la nouvelle génération d'inhibiteurs de mTOR, le PI103 (dont la faible biodisponibilité ne permet pas un usage chez l'homme) et le NVP-BEZ235 (Park et al., 2008) (Chapuis et al., 2010). Des résultats intéressants ont été obtenus avec une induction d'apoptose significative, y compris dans le compartiment enrichi en cellules leucémiques immatures avec le PI103, et une inhibition de la phosphorylation de 4E-BP1 sur tous les sites de phosphorylations dépendants de mTOR et contrôlant positivement la synthèse protéique par le NVP-BEZ235.

Dans ce contexte, nous avons voulu étudier l'effet anti-leucémique d'un inhibiteur plus spécifique de mTORC1/2, sans effet inhibiteur sur la PI3K: l'ADZ8055, développé par le laboratoire Astrazeneca. Comme attendu, l'ADZ8055 inhibe l'activité catalytique de la kinase mTOR, au sein du complexe mTORC1 (attestée par la phosphorylation de p70S6K1 sur la thr³⁸⁹) et du complexe mTORC2 (attestée par les phosphorylations d'Akt sur la ser⁴⁷³ et de NDRG1 sur la thr³⁴⁶) dès la dose de 10nM dans les lignées de LAM étudiées et dans les blastes primaires. De plus, contrairement à la rapamycine, l'AZD8055 déphosphoryle entièrement 4E-BP1 sur l'ensemble des sites dépendants de mTOR (thr^{37/46}, ser⁶⁵, thr⁷⁰), ce qui s'accompagne d'une diminution de la quantité du complexe d'initiation de la traduction, eIF4F, que nous avons pu mettre en évidence par la technique de ⁷methyl-GTP pulldown. L'AZD8055 diminue la quantité d'eIF4G lié à eIF4E, en augmentant en contrepartie la liaison eIF4E/4E-BP1 hypophosphorylé. L'inhibition des voies mTORC1 et mTORC2 par l'AZD8055 s'accompagne de plusieurs effets au niveau fonctionnel. Tout d'abord, nous avons observé une diminution de la synthèse protéique globale mesurée par l'incorporation de leucine tritiée. L'AZD8055 est également responsable d'une inhibition de la prolifération ainsi que d'un blocage du cycle cellulaire en G0. Ses effets sur l'apoptose et la clonogénicité ont ensuite été comparés entre les blastes primaires et des cellules hématopoïétiques CD34+ issues de sujets sains. L'AZD8055 induit une apoptose dépendante des caspases ainsi qu'une inhibition de la clonogénicité uniquement dans les cellules leucémiques et ne s'accompagne pas de toxicité pour les cellules normales. Nous avons étudié l'implication de l'autophagie dans la mort cellulaire induite par l'AZD8055. Comme la rapamycine, ce composé induit de l'autophagie (constatée par le clivage de LC3-I en LC3-II en western blot et par l'augmentation de l'activité des cathepsines). L'impact de l'autophagie sur la survie cellulaire, déterminé par l'utilisation de siARNs inhibant ATG5 ou LC3, est lié à la dose d'AZD8055 utilisée, avec un effet protecteur de l'autophagie observé à la dose de 100nM et l'effet inverse à la dose de 10nM d'AZD8055. Enfin, administré per os à la souris, dans un modèle de xénotransplantation, l'AZD8055 permet de réduire la croissance tumorale de la lignée leucémique MV4-11, et augmente la survie des animaux traités. L'ensemble de ces résultats est encourageant et souligne l'intérêt d'inhiber efficacement l'activité catalytique de la kinase mTOR dans les LAM.

5.2 La L-asparaginase, par son activité glutaminase, a une activité pro-apoptotique dans les LAM

Nous avons vu précédemment qu'il pouvait être intéressant de cibler la voie mTORC1 pour inhiber efficacement la traduction dans les LAM. Cependant, les mécanismes par lesquels cette voie est activée dans ces pathologies ne sont pas bien établis, quoiqu'il apparaisse assez clairement que l'activation de mTORC1 est indépendante de la voie PI3K/Akt dans les LAM (Tamburini et al., 2008). Etant donné le rôle prépondérant des acides aminés, en particulier la leucine, sur l'activation de mTORC1 par rapport aux autres stimuli (dont les facteurs de croissance) capables d'activer cette voie, j'ai voulu tester la fonctionnalité du lien entre acides aminés et mTOR ainsi que les effets de l'inhibition de cette voie dans les LAM.

L'utilisation de milieux de culture dépourvus de leucine ou de glutamine inhibe comme attendu la phosphorylation des substrats de mTORC1 (la p70S6K1 sur la thr³⁸⁹ et le répresseur traductionnel 4E-BP1 sur la ser⁶⁵) dans les lignées MOLM-14 et OCI-AML3 ainsi que dans les blastes primaires dès 6 heures de privation (Figure 1A). Des résultats similaires ont été obtenus dans les lignées leucémiques MV4-11 et HL60 (résultats non montrés). La privation en glutamine pendant 24 heures induit une apoptose significative allant de 8.5% (dans la lignée HL60) à 25% de la population cellulaire dans la lignée la plus sensible (OCI-AML3) (Figures 1B et 1C). Elle s'accompagne d'un clivage de la caspase 3 et de son substrat, la protéine PARP.

En raison de la dépendance des lignées de LAM étudiées à la glutamine, à la fois pour leur survie et pour le maintien de l'activation de la voie mTORC1, je me suis ensuite plus particulièrement intéressée aux moyens permettant de diminuer la disponibilité cellulaire en glutamine. Etant donné l'implication du transporteur de haute affinité pour la glutamine, SLC1A5, dans le contrôle de mTORC1 par la leucine dans les cellules HeLa (Nicklin et al., 2009) et son lien avec les tumeurs, j'ai étudié son expression et l'effet de son inhibition. Le transporteur SLC1A5 est exprimé dans les 4 lignées de LAM étudiées (MOLM-14, MV4-11, OCI-AML3 et HL60) (Figure 2A). J'ai infecté de façon stable plusieurs lignées de LAM par un vecteur lentiviral permettant l'expression inductible par la doxycycline d'un shARN SLC1A5 ou d'un shARN contrôle. J'ai observée une inhibition complète de l'expression protéique du transporteur SLC1A5 après 48 heures d'exposition à la doxycycline, inhibition qui persiste pour des expositions prolongées (Figure 2B). Dans la lignée MOLM-14, l'inhibition de SLC1A5 s'accompagne d'une induction d'apoptose à partir de 3 jours d'exposition à la doxycycline, allant jusque 32% d'apoptose à J4 (Figure 2D).

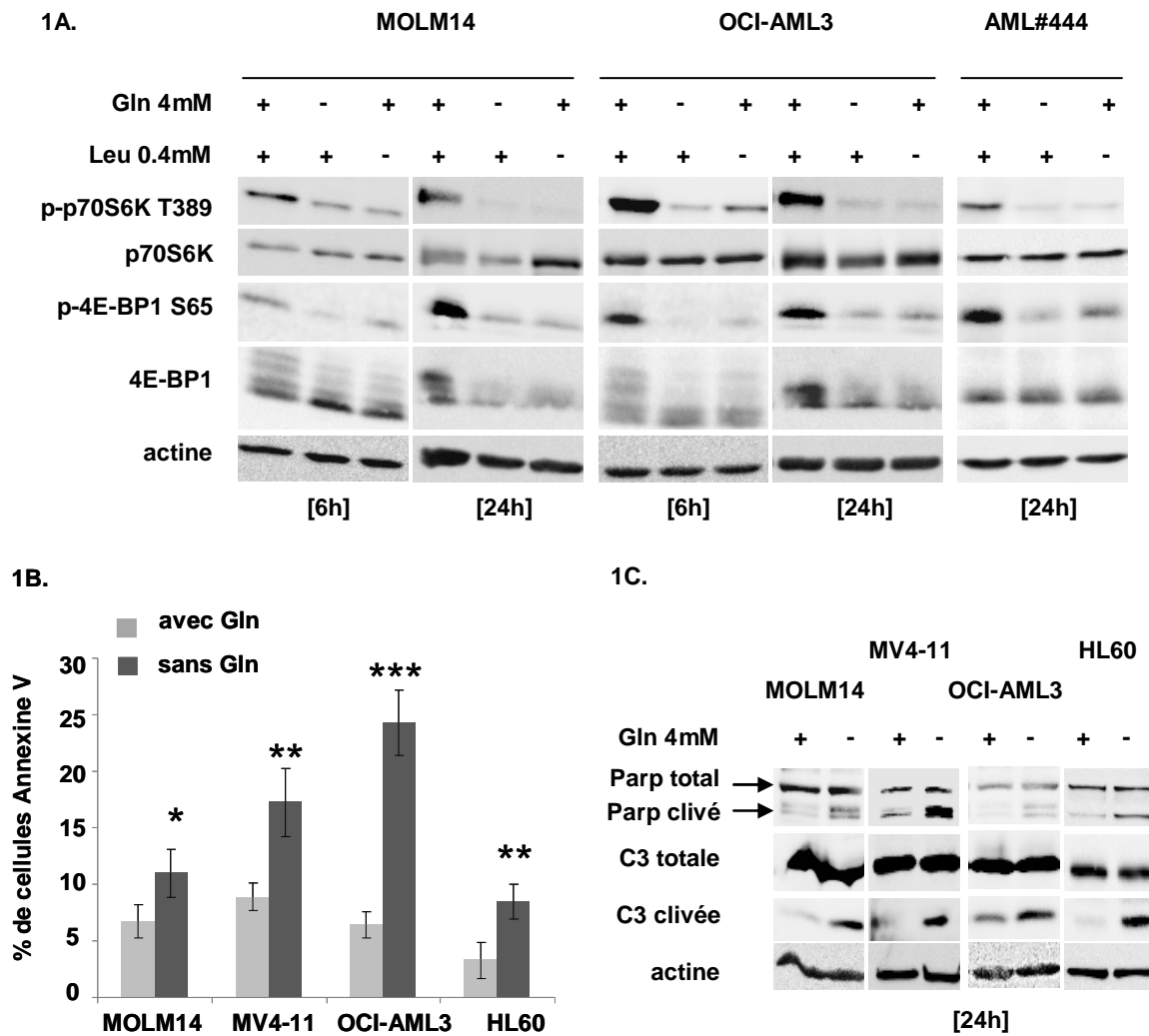
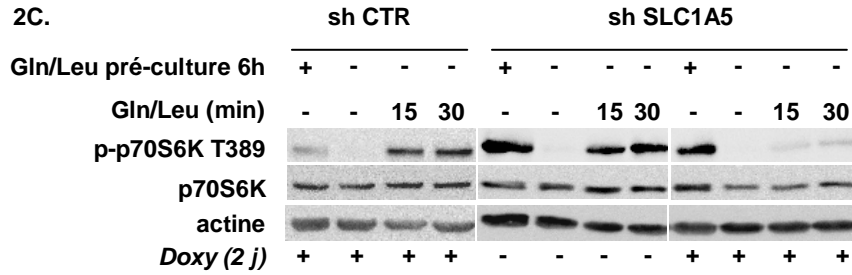
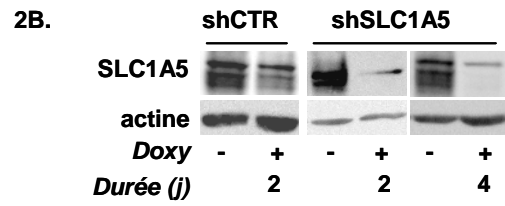
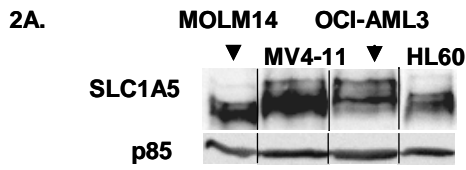


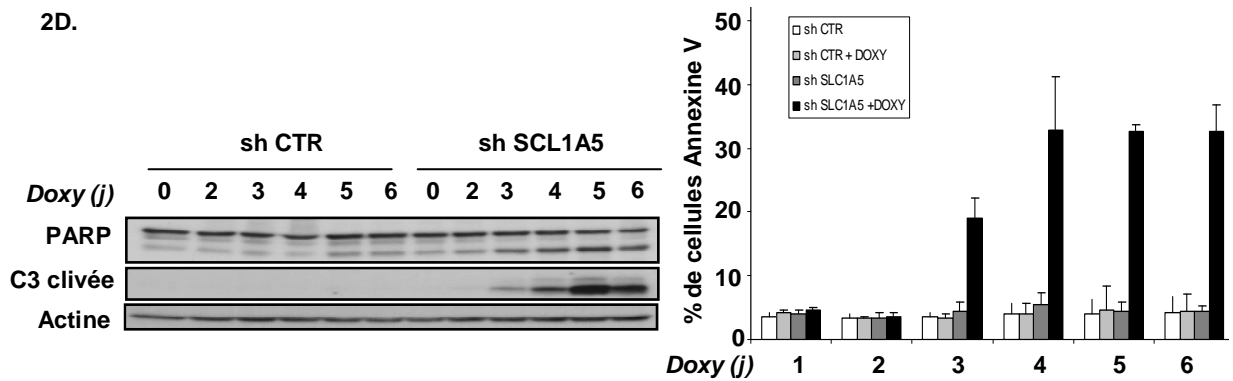
Figure 1. La privation en glutamine inhibe la voie mTORC1 et induit de l'apoptose dans les lignées leucémiques et dans les blastes primaires. Les cellules indiquées ont été cultivées pendant 6 ou 24 heures dans un milieu α Mem avec 10% de SVF dialysé avec ou sans leucine (leu) et/ou glutamine (gln). Les cellules ont ensuite été lysées dans un tampon Laemmli 1X. La phosphorylation des substrats de mTORC1 a été étudiée par western blot (A). L'apoptose a été déterminée par cytométrie de flux (B) et par western blot (C). C3 : caspase 3 ; La recherche de différences statistiquement significatives entre les moyennes des valeurs de différents groupes expérimentaux a été déterminée à l'aide d'un t-test de Student. *, ** et *** signifient $P < 0.05$, $P < 0.01$ et $P < 0.001$ respectivement.

J'ai observé une induction d'apoptose significative mais plus faible dans la lignée MV4-11 infectée avec le lentivirus exprimant le shARN SLC1A5 en présence de doxycycline (18% à J5), tandis que l'inhibition du transporteur SLC1A5 n'a pas d'effet pro-apoptotique dans la lignée HL60 (résultats non montrés). Lorsque l'expression de SLC1A5 est inhibée, l'association glutamine/leucine ne permet plus de restimuler la voie mTORC1 in vitro après une période de privation en acides aminés dans la lignée MOLM-14 attestant de la fonctionnalité du transporteur (Figure 2C). Etant donné l'effet pro-apoptotique observé dans la

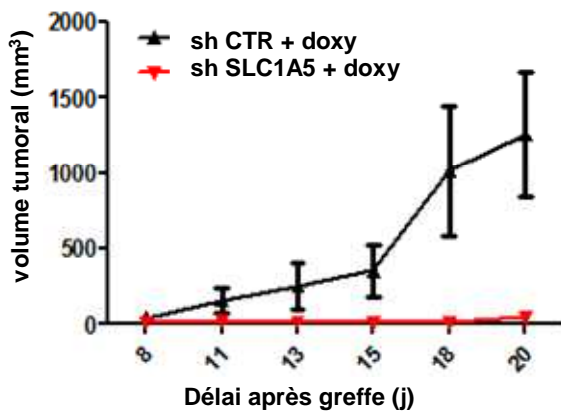
lignée MOLM-14, j'ai testé l'effet de l'inhibition de ce transporteur in vivo dans un modèle de xénotransplantation. La lignée MOLM-14 infectée par le shARN inductible dirigé contre SLC1A5 ou par un shARN contrôle a été transplantée dans des souris nues dont la moitié a ensuite reçu de la doxycycline. J'ai observé une nette diminution de la croissance tumorale ainsi qu'une augmentation de la survie globale chez les animaux traités par doxycycline qui ne développent quasiment plus de tumeur (Figures 2E, F, G) (collaboration avec l'équipe de I Cruz-Moura à Bichat).



2D.



2E.



2F.

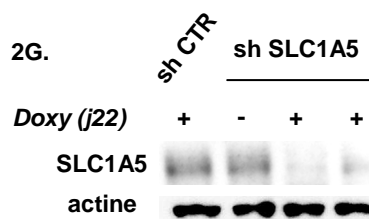
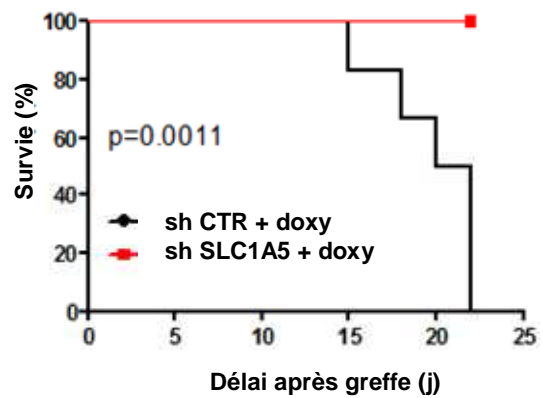
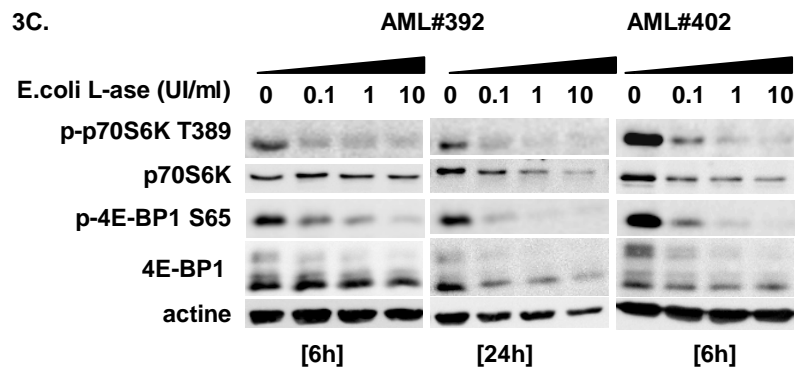
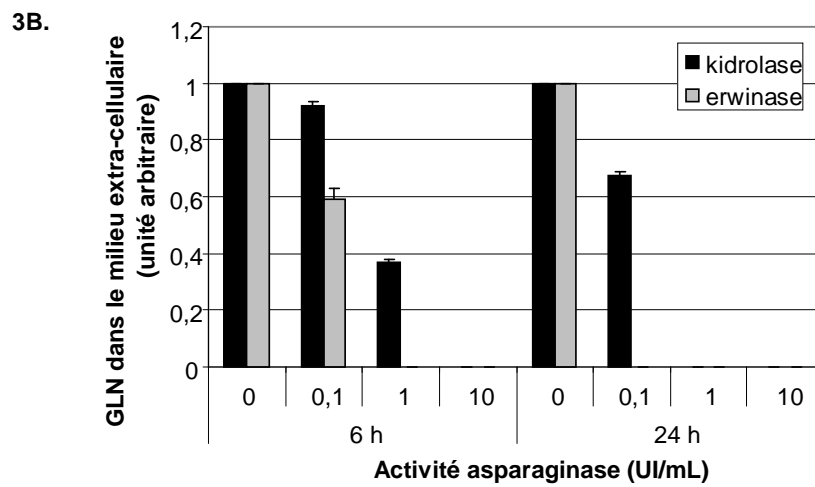
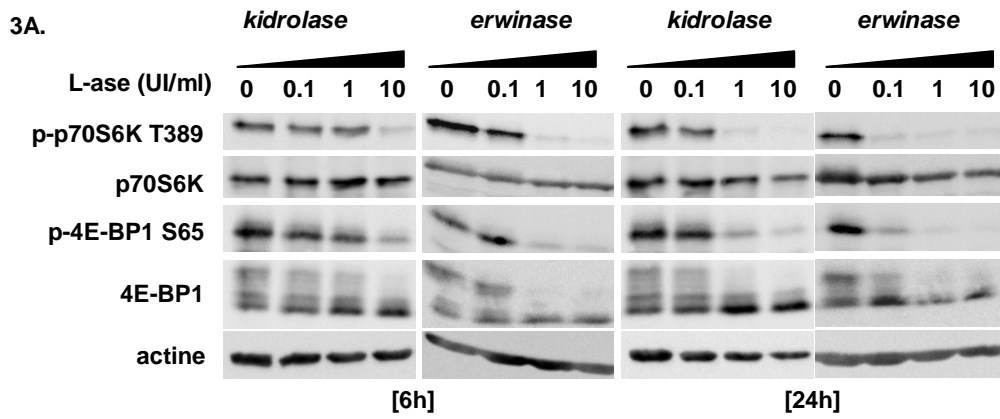


Figure 2. L'inhibition du transporteur SLC1A5 inhibe la stimulation de mTORC1 en réponse à l'association glutamine + leucine, induit de l'apoptose in vitro dans la lignée MOLM-14 et in vivo, réprime la croissance tumorale dans un modèle de xénotransplantation. L'expression de SLC1A5 a été étudiée par WB dans des lignées de LAM (A). La lignée MOLM-14 a été infectée par un vecteur lentiviral permettant l'expression inducible par la doxycycline (doxy) d'un shARN contrôle (CTR) ou d'un shARN SLC1A5. Les cellules ont ensuite été cultivées avec ou sans doxycycline (0.2ng/mL) pendant les temps indiqués (jours). L'inhibition d'expression de SLC1A5 a été contrôlée par WB (B) et l'apoptose étudiée par cytométrie de flux (fixation d'Annexine-V) et par WB (clivage de PARP et de la caspase3) de J1 à J6 (D). La lignée MOLM-14 infectée par le shARN inducible CTR (courbes noires) ou par le shARN SLC1A5 (courbes rouges) a été injectée en sous-cutanée dans le flanc de souris nues qui ont ensuite reçu de la doxycycline par gavage oral 5 jours par semaine. La croissance tumorale a été évaluée trois fois par semaine. La figure 2E représente la moyenne du volume tumoral (n=8 dans chaque groupe). La courbe de survie selon Kaplan-Meier est représentée en 2F. L'expression de SLC1A5 dans des lysats protéiques tumoraux a été contrôlée par WB (2G).

Toutefois, afin d'agir de façon plus radicale sur la concentration de glutamine extracellulaire, j'ai ensuite étudié les effets d'une drogue à activité glutaminase, la L-asparaginase (L-ASE), qui dégrade la glutamine en glutamate. La L-ASE inhibe de façon dose et temps-dépendante les phosphorylations des substrats de mTORC1, incluant la phosphorylation de 4E-BP1 sur la ser⁶⁵, dans les lignées leucémiques testées et dans les blastes primaires (Figures 3A, 3C, 3D). Cette drogue n'a pas d'effet inhibiteur sur les autres voies de signalisation étudiées (mTORC2, MAPK/ERK et STAT5) (données supplémentaires). La comparaison de deux types de L-ASE (Kidrolase® et Erwinase®) dont l'activité glutaminase varie à activité asparaginase égale, ainsi que les dosages de glutamine et d'asparagine dans le milieu extracellulaire ont permis de corrélérer l'inhibition de la voie mTORC1 à la déplétion en glutamine (Figures 3A et 3B). J'ai en effet observé une inhibition complète de mTORC1 pour des doses d'Erwinase plus faibles que celles de Kidrolase nécessaires à l'obtention du même effet sur mTORC1. Après 6 heures d'incubation, mTORC1 est inhibé par 1UI/mL d'Erwinase et 10UI/mL de Kidrolase dont l'activité glutaminase est environ quatre fois plus faible. Pour chaque enzyme, la dose minimale nécessaire à l'inhibition complète de mTORC1, aussi bien à 6 heures qu'à 24 heures, correspond à la dose minimale permettant une dégradation complète de la glutamine dans le milieu extracellulaire (le taux d'asparagine extracellulaire est indosable dès la dose de 0.1UI/mL à partir de 6 heures pour les deux drogues, résultats non montrés). La privation isolée en asparagine, contrairement à celle en glutamine, n'a pas d'effet sur la signalisation en aval de mTORC1 (données supplémentaires).



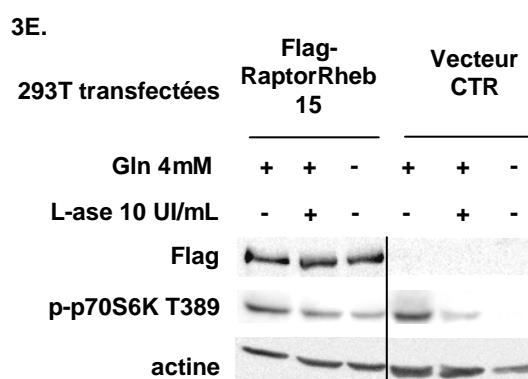
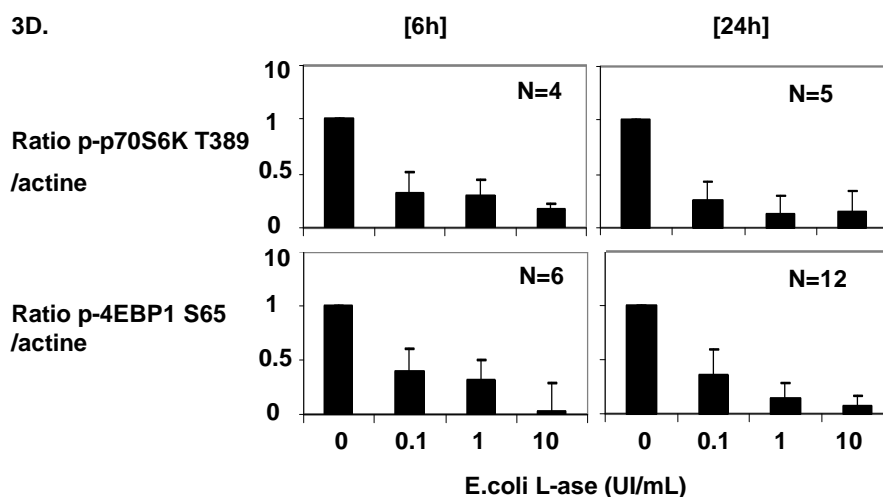


Figure 3. La L-asparaginase inhibe mTORC1 dans les lignées leucémiques et les blastes primaires de LAM. Cette inhibition est liée à son activité glutaminase.

(A) La lignée OCI AML3 a été incubée pendant 6 ou 24 heures sans ou avec de la L-asparaginase issue d'*E.coli* (Kidrolase) ou d'*E.chrysanthemi* (Erwinase) à activité asparaginase égale (0.1 à 10 UI/mL) ; les cellules ont ensuite été lysées en Laemmli et les extraits protéiques analysés par WB.

(B) Les cellules ont été traitées comme indiqué en A ; pour la quantification des acides aminés (AA) dans le milieu extra-cellulaire, le surnageant de culture cellulaire a été déprotéinisé par une solution d'acide sulfosalicylique à 30% (w/v). Après centrifugation (5 min, 4 °C, 10000 tr/min), le surnageant a été dilué avec une solution contenant deux étalons internes (acide D glucosaminique et amino-éthyl-cystéine). Les acides aminés ont ensuite été séparés par chromatographie d'échange d'ions automatisée (AminoTac JLC-500/V, Jeol, Tokyo, Japan).

(C, D) Les cellules mononuclées issues de prélèvements médullaires ou sanguins (enrichis en cellules blastiques, plus de 80%) de 12 patients au diagnostic de LAM ont été traitées comme en (A) et les intensités de signal de phospho-P70S6K^{T389}, phospho-4E-BP1^{S65} et actine observées en WB ont été quantifiées à l'aide du logiciel Multi Gauge, version 3.0 software, Fuji et les ratios de phospho-P70S6K^{T389} ou phospho-4E-BP1^{S65} sur actine ont été calculés et rapportés à 1 par rapport à la condition contrôle sans L-asparaginase.

(E) La lignée HEK-293T a été transfectée par un plasmide d'expression vide ou exprimant une construction Flag-RaptorRheb15. 48 heures après transfection, les cellules ont été incubées pendant 24 heures avec ou sans L-glutamine 4mM ou *E.coli* L-ase (10UI/mL). Après lyse cellulaire, les échantillons ont été analysés par WB.

J'ai ensuite voulu vérifier que l'inhibition de mTORC1 obtenue par la privation en glutamine ou par la L-ASE impliquait les mécanismes connus de régulation de mTORC1 par les AA. Pour cela, j'ai transfecté des cellules HEK-293T par un vecteur permettant l'expression d'une protéine chimérique (Raptor-Rheb15) exprimant un signal Flag, correspondant au partenaire de mTORC1, Raptor, fusionné avec la séquence de 15 AA de Rheb1 qui permet sa localisation à la surface du lysosome (Sancak et al., 2010). L'expression de la protéine Flag-Raptor Rheb15 dans la lignée HEK-293T permet le maintien de la phosphorylation de p70S6K1 sur la thr³⁸⁹ dans des conditions de culture sans glutamine ou en présence d'une forte dose de L-ASE. Ces résultats suggèrent que le maintien de mTORC1 à la membrane lysosomale empêcherait son inhibition par la L-ASE ou par la privation en glutamine, de façon similaire à ce qui est décrit pour la privation en l'ensemble des AAE dans des cellules de mammifères. Etant donné les rôles de mTORC1 et de 4E-BP1 dans la synthèse protéique, j'ai ensuite testé l'effet de la L-ASE sur la traduction. J'ai montré que la L-ASE augmente la liaison d'eIF4E et de 4E-BP1 par des expériences de 7Methyl GTP pull down (Figure 4A). Cette inhibition de la formation du complexe d'initiation de la traduction s'accompagne d'une diminution de la synthèse protéique mesurée par l'incorporation de méthionine radio-marquée dans les 4 lignées de LAM étudiées (Figure 4B), d'une inhibition du cycle cellulaire (résultats non montrés) ainsi que d'une diminution d'expression des protéines oncogéniques c-myc et mcl1, dont la synthèse est connue comme étant régulée de façon cap-dépendante (Figure 4C).

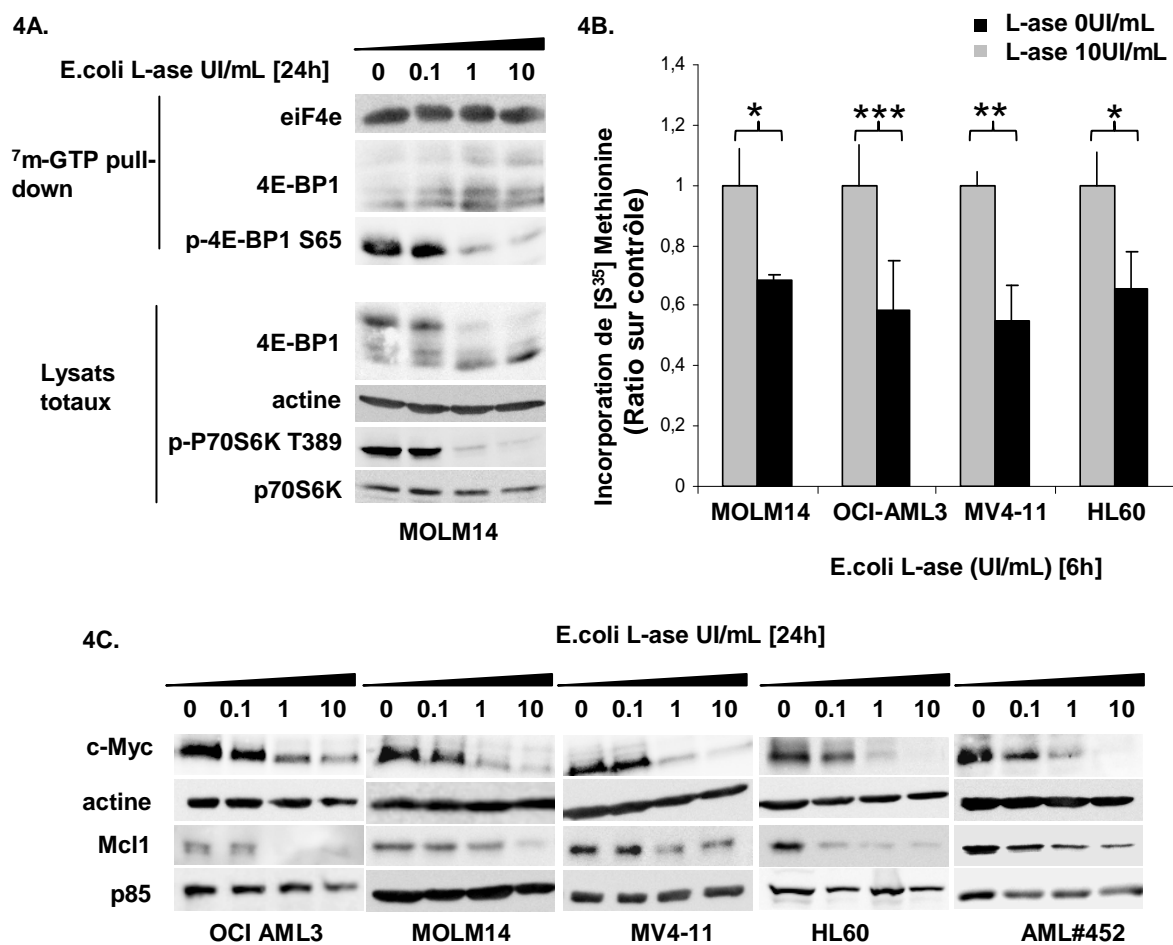


Figure 4. La L-asparaginase inhibe la traduction des ARNm cap-dépendant dans les LAM.

(A) La lignée MOLM-14 a été incubée pendant 24 heures sans ou avec L-asparaginase issue d'*E. coli* (Kidrolase) (0.1 à 10 UI/mL). 7Methyl Guanosine cap affinity assay: 5.10^6 cellules sont lysées par 3 cycles successifs de congélation-décongélation dans 600µL de tampon de solubilisation. Après clarification par centrifugation à 13000g pendant 20min à 4°C, les surnageants sont incubés à 4°C pendant 2h avec les billes 7 methyl GTP-Sepharose dans 500µL de tampon de liaison. Les billes sont ensuite lavées 3 fois et reprises dans du tampon Laemmli.

(B) Après 6 heures d'incubation avec ou sans L-asparaginase (10UI/mL) dans un milieu sans methionine, les cellules indiquées ont été exposées pendant 2 heures avec de la methionine[³⁵S] pour déterminer le taux de synthèse protéique globale.

(C) Après incubation pendant 24 heures avec des doses croissantes de L-asparaginase, l'expression de Mcl1 et c-myc a été testée par WB dans les lignées indiquées et dans les échantillons primaires.

J'ai ensuite étudié l'apoptose induite par la L-ASE dans les lignées leucémiques et les blastes primaires. La L-ASE induit de l'apoptose dès 24 heures, allant de 10-15% jusque 30% pour la dose de 10UI/mL selon les lignées leucémiques étudiées (HL60, MOLM-14, MV4-11 et OCI-AML3), avec des taux atteignant plus de 40% à 48 heures à la dose maximale dans les lignées

OCI-AML3 et MV4-11 (Figures 5A et 5E) et de l'ordre de 20 à 30% dans les deux autres lignées (données supplémentaires). Dans les blastes primaires, j'ai également observé une induction d'apoptose significative dès la dose de 0.1UI/mL de Kidrolase à 24 heures, allant en moyenne jusque 40% pour la dose de 10UI/mL, avec une grande variabilité inter-individuelle sur les 16 échantillons étudiés (Figure 5C). Le faible nombre de patients étudiés ne nous a pas permis d'établir de corrélation entre les caractéristiques de la LAM et la sensibilité à la L-ASE. Afin d'étudier l'importance de l'activité glutaminase de la L-ASE dans l'induction d'apoptose observée, j'ai comparé les effets pro-apoptotiques de la Kidrolase et de l'Erwinase. Les figures 5B et 5E montrent les résultats obtenus dans la lignée OCI-AML3 et dans les blastes primaires ; les 3 autres lignées ont également été testées. Dans les lignées leucémiques, j'ai pu observer une induction d'apoptose significativement différente de façon constante à la dose intermédiaire de 1UI/mL d'activité asparaginase en faveur de l'Erwinase, dont l'activité glutaminase est plus importante. Cet effet différentiel entre les deux drogues s'estompe à la dose maximale de 10UI/mL. Dans les blastes primaires, je n'ai pas observé de différence significative entre les deux drogues, mais une tendance vers un effet plus important en faveur de l'Erwinase. Ces résultats soulignent le rôle de l'activité glutaminase de la L-ASE dans son effet pro-apoptotique dans les LAM. Les résultats obtenus avec les milieux de culture dépourvus spécifiquement, soit de glutamine, soit d'asparagine confirment cette hypothèse puisque, à l'exception de la lignée MV4-11, la privation en asparagine pendant 24 heures dans le milieu de culture n'a pas d'effet apoptotique dans les trois autres lignées de LAM étudiées (données supplémentaires). Dans la lignée MV4-11, l'absence d'asparagine induit près de 17% d'apoptose à 24 heures.

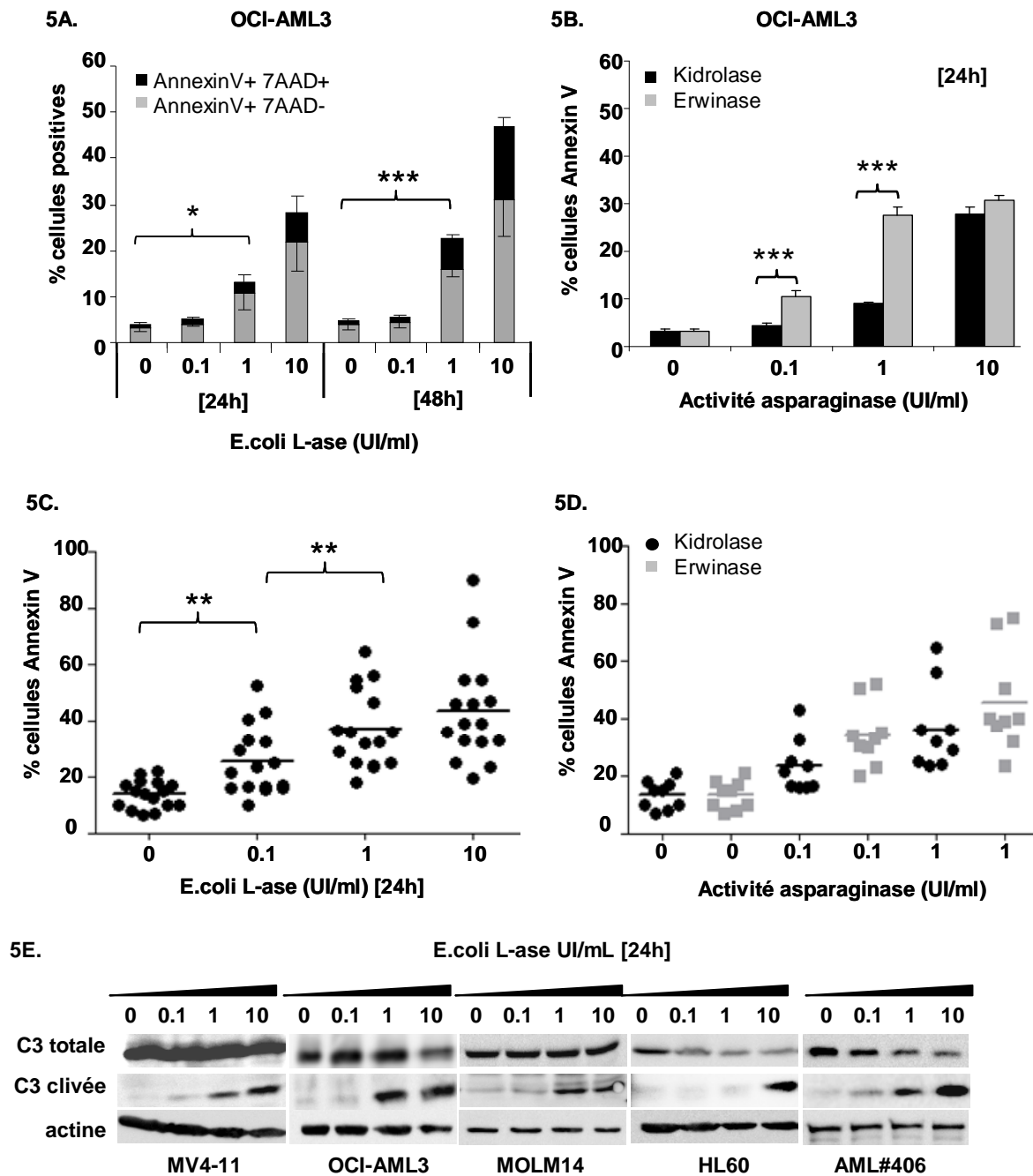


Figure 5. La L-asparaginase induit de l'apoptose dans les lignées de LAM et dans les blastes primaires.

(A) La lignée OCI-AML3 a été cultivée pendant 24 et 48 heures avec ou sans L-ase issue d'*E.coli* (Kidrolase) (0.1 à 10 UI/mL) et l'apoptose mesurée par un marquage 7AAD Annexin V en cytométrie en flux. (B) La lignée OCI-AML3 a été incubée pendant 24 heures sans ou avec Kidrolase ou Erwinase à activité asparaginase égale (0.1 à 10 UI/mL) puis l'apoptose mesurée par marquage AnnexinV en cytométrie en flux. (C et D) Les cellules mononuclées médullaires de 16 patients atteints de LAM au diagnostic ont été traitées comme en (A) et (B). (E) L'induction d'apoptose a été confirmée en WB par l'étude du clivage de la caspase 3 (C3).

La glutamine synthase (GS) permet la synthèse de glutamine à partir de glutamate. Certains travaux précédemment cités ont suggéré un lien entre l'activité de cette enzyme et la

résistance à la L-ASE dans des lignées de LAL. J'ai étudié l'expression de cette enzyme après exposition des cellules de patients et lignées de LAM à la L-ASE. J'ai observé une augmentation constante de l'expression protéique de GS après 24 heures d'incubation des cellules leucémiques en présence de L-ASE (Figure 6A). De façon intéressante, la lignée OCI-AML3 qui est l'une des plus sensibles à la L-ASE exprime plus faiblement la GS par rapport aux autres lignées. J'ai ensuite regardé l'effet de l'inhibition de GS, afin de bloquer la synthèse de novo de glutamine dans la cellule, à l'aide de shARN. Des lignées stables exprimant un shARN GS ou un shARN contrôle ont été obtenues après infection lentivirale à partir des lignées MOLM14, OCI-AML3 et MV4-11 (Figure 6B). L'inhibition spécifique par shARN de GS majore l'apoptose induite par la L-ASE dans la lignée leucémique MV4-11, alors qu'elle n'a pas d'effet dans deux autres lignées testées MOLM14 et OCI-AML3 (Figure 6C).

Ces travaux soulignent l'importance de la glutamine dans les LAM dont une des fonctions est de permettre l'activation de la voie mTORC1, dont nous avons montré précédemment qu'elle favorisait la synthèse protéique et la croissance tumorale. A l'issue des résultats observés durant mon travail de thèse, la L-ASE apparaît potentiellement intéressante dans le traitement des LAM, avec toutefois la nécessité de définir plus précisément les sujets susceptibles de répondre en fonction des caractéristiques biologiques de leur maladie, ainsi que les mécanismes de résistances.

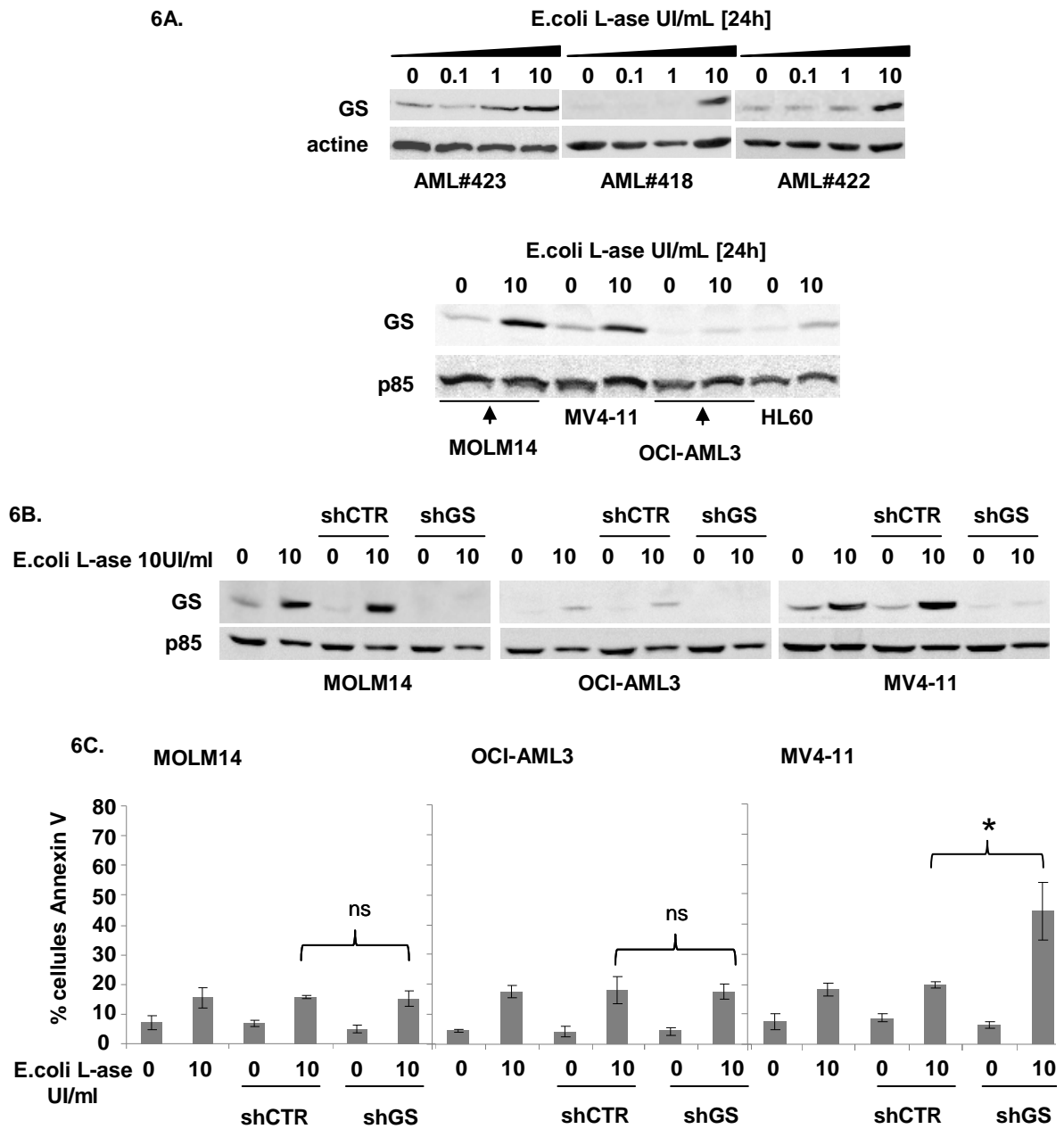


Figure 6. La L-asparaginase augmente l'expression de glutamine synthetase (GS) dans les lignées leucémiques et les blastes primaires. L'inhibition de GS majore l'apoptose induite par la L-ase dans la lignée MV4-11 mais n'a pas d'effet dans les lignées MOLM14 et OCI-AML3. (A) Les cellules indiquées ont été cultivées pendant 24 heures avec ou sans L-ase (kidrolase) à la dose de 0.1, 1 ou 10 UI/mL. L'expression de GS a été déterminée par WB. (B et C) Les lignées MOLM14, OCI-AML3 et MV4-11 ont été infectées avec un shARN CTR (contrôle) ou shARN GS dans un vecteur d'expression; les lignées stables obtenues ont été cultivées pendant 24 heures avec ou sans L-ase (kidrolase) à la dose de 10 UI/mL. L'inhibition de GS a été contrôlée par WB et l'apoptose mesurée par cytométrie en flux.

6. Discussion et perspectives

Les travaux antérieurs du laboratoire dans lequel j'ai travaillé ont souligné l'importance de la synthèse protéique, principalement régulée par la kinase mTOR, dans les LAM. Au cours de mon travail de thèse, j'ai étudié un composé permettant d'inhiber efficacement cette kinase, l'AZD8055, et me suis intéressée à la régulation de mTOR par la glutamine. J'ai pu montrer que : 1/ l'inhibition efficace des deux complexes mTORC1 et mTORC2 à l'aide d'un composé hautement spécifique, l'AZD8055, affecte la survie cellulaire des cellules leucémiques *in vivo* mais également *in vivo* dans un modèle murin ; 2/ la déplétion en glutamine, obtenue à l'aide de L-asparaginase, inhibe mTORC1 et induit la mort cellulaire des cellules de LAM *in vitro*.

En ce qui concerne la première partie de ce travail, plusieurs points restent à approfondir parmi lesquels les rôles respectifs de mTORC1 et mTORC2 dans la survie des blastes de LAM puisqu'actuellement aucun inhibiteur chimique n'est entièrement spécifique de l'un ou l'autre de ces complexes. La rapamycine et ses composés qui, dans les LAM, n'inhibent pas mTORC2, ont un effet partiel sur mTORC1 ne permettant pas de distinguer les rôles respectifs des deux complexes. Dans ce but, l'équipe dans laquelle j'ai effectué mon travail de thèse, développe actuellement des shARN inductibles dirigés contre les protéines partenaires de mTOR, Rictor ou Raptor, associés spécifiquement à l'un ou l'autre des complexes, et nécessaire à leurs fonctions, ainsi qu'un shARN ciblant mTOR directement, afin d'infirmer les lignées leucémiques, et dans un second temps les blastes de patients. Par ailleurs, l'existence de kinases autres que mTOR pouvant être impliquées dans la phosphorylation de 4E-BP1 a été suggérée par plusieurs équipes. Dans les LAM en particulier, le laboratoire a précédemment mis en évidence l'implication indirecte de la kinase Pim2 dans la phosphorylation de 4E-BP1 sur la ser⁶⁵, mécanisme constituant potentiellement un autre frein à l'utilisation des inhibiteurs de première génération de mTOR (Tamburini et al., 2009). Cependant, l'AZD8055, en inhibant les phosphorylations précoces de 4E-BP1 dépendantes de mTOR sur thr^{37/46} qui sont indispensables aux phosphorylations ultérieures sur la ser⁶⁵ et sur la thr⁷⁰, déjoue ce mécanisme de résistance aux rapalogues. L'avantage de l'AZD8055 par rapport aux inhibiteurs doubles agissant à la fois sur mTOR et sur la PI3K, tels que le NVP-BEZ235 précédemment testé par notre équipe, n'a pas été démontré dans les LAM. Cependant, la comparaison des données *in vitro* obtenues avec ces deux inhibiteurs, suggère une efficacité similaire sur l'inhibition des voies de signalisation mTORC1 et mTORC2 ainsi que sur le rétrocontrôle PI3K/AKT. Le spectre d'action plus étroit de l'AZD8055 pourrait, du

moins en théorie, en diminuer les effets secondaires. La revue annexée, intitulée: “PI3K and mTOR Signaling pathways in cancer: new data on targeted therapies” détaille les mécanismes d’action différentiels de ces deux types d’inhibiteurs et leurs intérêts respectifs théoriques et résume les premières données de toxicité issues des essais de phase I/II dans les tumeurs solides. L’AZD8055 est actuellement en cours d’essais cliniques, dont les résultats ne sont pas encore disponibles, dans plusieurs pathologies tumorales (www.clinicaltrials.gov: NCT01316809, NCT00973076, NCT00999882, NCT00731263). Les résultats préliminaires d’une étude ayant inclus 49 patients atteints de tumeurs solides a mis en évidence une bonne biodisponibilité orale avec une toxicité dose-limitante d’ordre hépatique (Banerji et al., 2011). Concernant les limitations potentielles de ce composé, elles relèvent essentiellement des voies de signalisation alternes mises en place par les cellules exposées à l’AZD8055 pour échapper à la mort cellulaire. Parmi celles-ci, nous avons pu constater le rôle complexe de l’autophagie, qui, selon l’intensité du signal de stress (dans notre étude, la dose d’AZD8055 utilisée), exerce des effets opposés sur la cellule. Il est donc nécessaire, dans le développement de l’utilisation de ces nouveaux composés, de prendre en compte cette réponse particulière, d’autant plus qu’elle peut aussi modifier la sensibilité de la cellule aux chimiothérapies classiques que l’on pourrait être amené à utiliser en association avec ces thérapies ciblées. Une étude a mis en évidence un effet protecteur de l’AZD8055, par l’intermédiaire du mécanisme d’autophagie, sur l’apoptose induite par le 5-FU ou l’oxaliplatine dans des lignées de cancer du côlon (Huang et al., 2011). Cependant, dans ce travail, les doses d’AZD8055 utilisées étaient très élevées (0.5 et 1 μ M), alors que dans les LAM, de faibles doses d’AZD8055 (~10nM) sont suffisantes à l’inhibition complète des voies mTORC1 et mTORC2 et pourraient au contraire, d’après nos résultats, induire une autophagie favorisant la mort cellulaire. Il apparaît donc indispensable d’obtenir des données in vitro concernant l’association de l’AZD8055 à l’aracytine ou aux anthracyclines avant de concevoir des essais cliniques utilisant simultanément ces chimiothérapies. Au vu de ces résultats et de ceux préalablement obtenus avec le NVP-BEZ235, le Dr Sophie Park élabore actuellement un essai de phase II étudiant l’effet du NVP-BEZ235 administré par voie orale dans les myélodysplasies de haut-risque et les LAM secondaires peu prolifératives, réfractaires à la chimiothérapie d’induction et à la 5-Azacytidine. Dans ce protocole, les voies de signalisation mTORC1, mTORC2 et PI3K devraient être évaluées en cytométrie de flux sur la population CD34+ et en immunohistochimie sur biopsie ostéo-médullaire.

Concernant la deuxième partie de mon travail de thèse, le manuscrit présentant les résultats

obtenus est en cours de préparation et devrait être soumis très rapidement. J'ai pu montrer que la glutamine est nécessaire à l'activation de mTORC1 dans les LAM. Les outils qui permettent de diminuer la disponibilité en glutamine de la cellule leucémique pourraient donc avoir un intérêt thérapeutique dans ces pathologies. En ce qui concerne l'inhibition du transporteur SLC1A5, plusieurs limitations apparaissent suite à nos résultats. Les effets pro-apoptotiques observés sont très variables d'une lignée leucémique à une autre; certaines lignées sont insensibles à son inhibition. Cette variabilité pourrait être liée à l'expression d'autres transporteurs de la glutamine, notamment SNAT2 que nous n'avons pas explorée. De plus, les mécanismes par lesquels l'inhibition d'expression de ce transporteur induit de l'apoptose dans nos cellules restent à démontrer, puisqu'elle n'inhibe pas mTORC1 dans les conditions de culture standard et n'induit pas non plus d'autophagie (résultats non montrés). Ces résultats ne remettent pas en question le lien entre glutamine et mTOR que nous avons pu mettre en évidence à l'aide de la L-asparaginase, qui diminue drastiquement la quantité de glutamine extra et intracellulaire disponible pour la cellule. J'ai montré l'importance de l'activité glutaminase de la L-asparaginase dans ses effets inhibiteurs sur mTORC1 et la viabilité cellulaire. Bien que le lien direct entre l'inhibition de mTOR et l'apoptose induite par la L-asparaginase n'ait pu être démontré formellement à ce jour, les données antérieures du laboratoire obtenues avec le 4EGI-1, qui agit par mimétisme de 4E-BP1, soulignent le rôle important de ce dernier dans les LAM. Or la L-asparaginase inhibe efficacement la phosphorylation de 4E-BP1. Nous essayons actuellement de développer un vecteur lentiviral qui permettrait l'expression d'une forme mutée de mTOR dont l'activité kinase n'est plus dépendante de la concentration en acides aminés (Ohne et al., 2008), afin de tester les effets de la L-asparaginase indépendants de mTOR. La L-asparaginase présente l'intérêt d'être déjà administrée chez l'homme avec un profil de toxicité bien défini. Pour envisager son utilisation dans le traitement des LAM, il est indispensable de préciser les sous-types de leucémies susceptibles d'y être sensibles. Dans ce but, nous développons actuellement une collaboration avec les hématologues pédiatres (les Pr C. Dumontet, Pr G. Leverger et Pr Y. Bertrand) afin de tester in vitro et in vivo l'effet d'Erwinase[®] sur les blastes de LAM de l'enfant et adulte jeune à la rechute en espérant pouvoir corrélérer la sensibilité à la L-asparaginase aux données clinico-biologiques de la maladie. Les données que j'ai obtenues sur le lien entre l'expression de GS et la sensibilité à la L-ASE doivent être interprétées avec précaution puisqu'un effet additif entre l'inhibition de GS et la L-ASE n'a été observé que dans une seule des lignées étudiées, MV4-11. De plus, contrairement aux données de la littérature où l'effet potentialisateur de l'inhibition de GS est observé dans des lignées de LAL résistantes à la L-

ASE (Aslanian and Kilberg, 2001), la lignée MV4-11 est parmi les plus sensibles des lignées que j'ai testées à la drogue. Toutefois, dans ces études, les auteurs ont utilisé un inhibiteur non spécifique de GS (l-méthionine-S-sulfoximine ou MSO).

Enfin, nous avons observé d'importantes variations de sensibilité à la privation en glutamine d'une lignée cellulaire à une autre. De ce fait, nous cherchons à préciser les mécanismes biologiques qui déterminent le degré de dépendance à la glutamine des cellules leucémiques. Pour cela, nous étudions actuellement les niveaux d'expression protéique de différentes enzymes impliquées dans le métabolisme de la glutamine (glutamine synthase et différentes isoformes des glutaminases) dans les lignées de LAM et les blastes primaires. L'importance du métabolisme de la glutamine dans les LAM n'est pas connue. Les données existantes dans les glioblastomes suggèrent que les mutations d'IDH1, fréquemment observées dans ces pathologies, confèrent aux cellules une sensibilité particulière à l'inhibition spécifique de la glutaminase 1 (Seltzer et al., 2010). De façon similaire, nous aimerions étudier la dépendance cellulaire à la glutamine et l'inhibition d'enzymes impliquées dans son métabolisme dans des lignées de LAM avec mutants IDH1 ou IDH2, présents chez un pourcentage non négligeable de sujets atteints de ces pathologies.

7. Annexes

7.1 Effets anti-leucémiques de l'AZD8055 : article

Lien vers l'article : <http://www.nature.com/leu/journal/v26/n6/full/leu2011339a.html>

7.2 Effets anti-leucémiques de l'AZD8055 : figures supplémentaires

S1

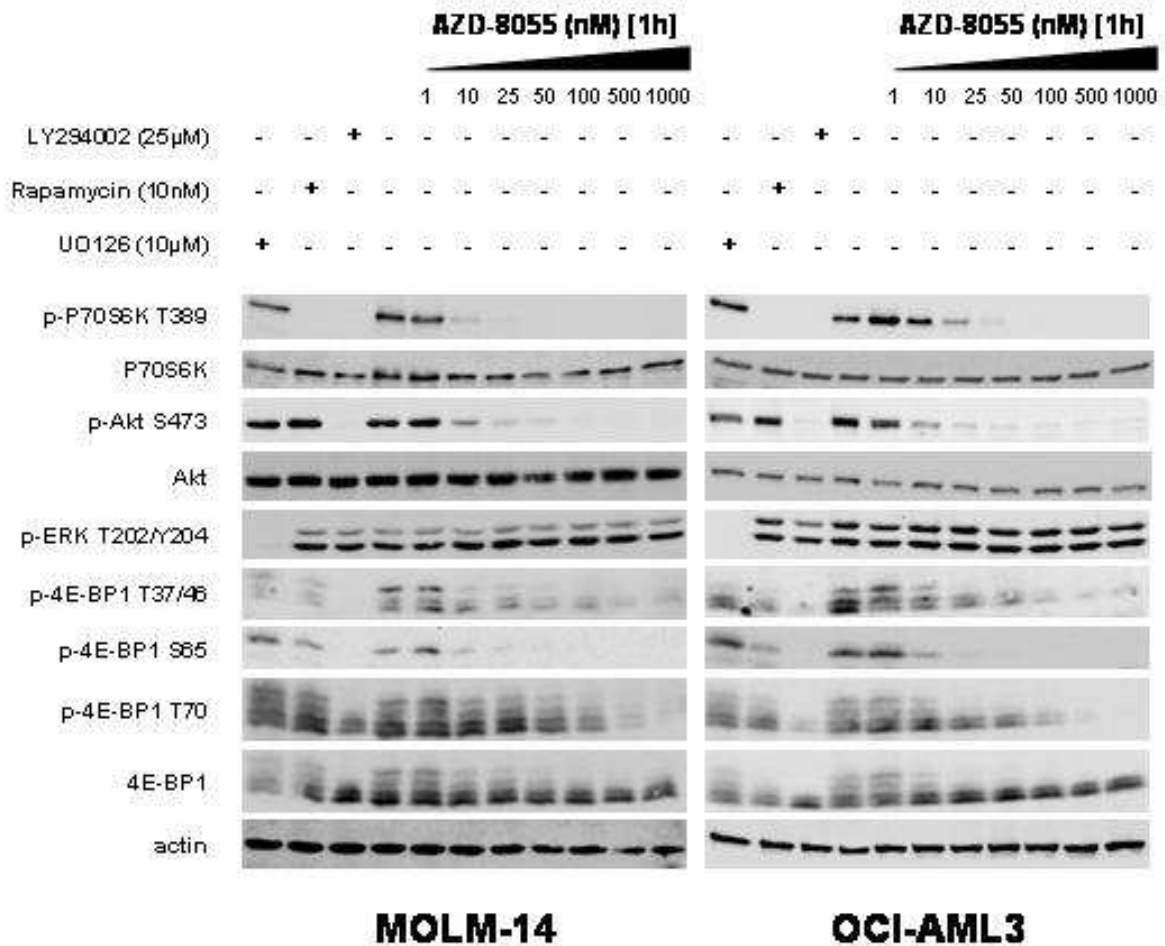


Figure S1. MTORC1 and mTORC2 signaling pathways are blocked by AZD8055 in both OCI-AML3 and MOLM-14 AML cell lines. The human AML cell lines OCI-AML3 (NPM1+) and MOLM-14 (FLT3-ITD+) were cultured 1h without or with 10 μmol/l UO126, 10nmol/l rapamycin, 25 μmol/l LY294002 and crescent (10 to 1000nmol/l) AZD8055 concentrations. mTORC1 and mTORC2 activities were assessed by Western blots using phospho-P70S6K T³⁸⁹ and phospho-4E-BP1 T^{37/46}, S⁶⁵, T⁷⁰; and phospho-Akt S⁴⁷³, respectively. Anti-phospho-ERK1/2 antibody was also used to detect ERK1/2 T202/Y204 phosphorylation.

S2

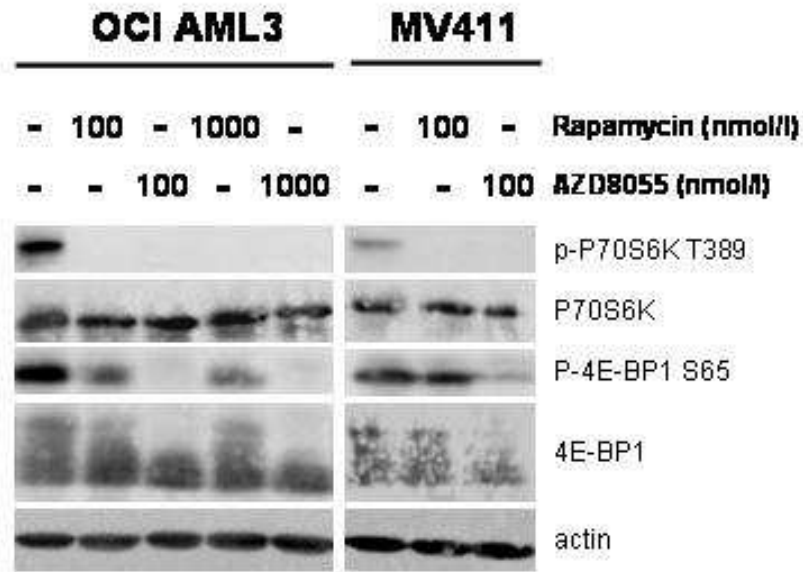


Figure S2. Rapamycin does not block mTORC1 activity even at high doses, in contrast to AZD8055, in AML. The OCI-AML3 and MV4-11 AML cell lines were cultured without or with 10, 100 or 1000nmol/l of rapamycin or AZD8055 and mTORC1 activity was assessed by the detection of phospho-P70S6K T389 and phospho-4E-BP1 S65 by immunoblotting.

S3

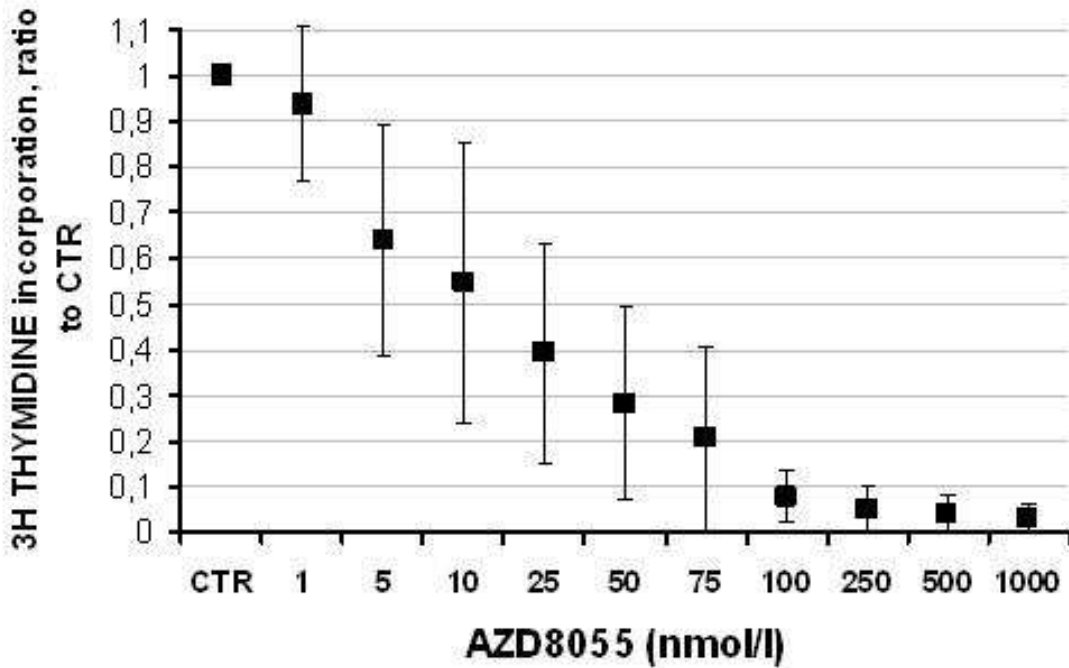


Figure S3. AZD8055 decreases AML cell proliferation. [³H]thymidine pulses were performed to determine proliferation rates in primary blast cells from 7 AML samples cultured with or without AZD8055. Results are expressed as a ratio between each condition and the control condition.

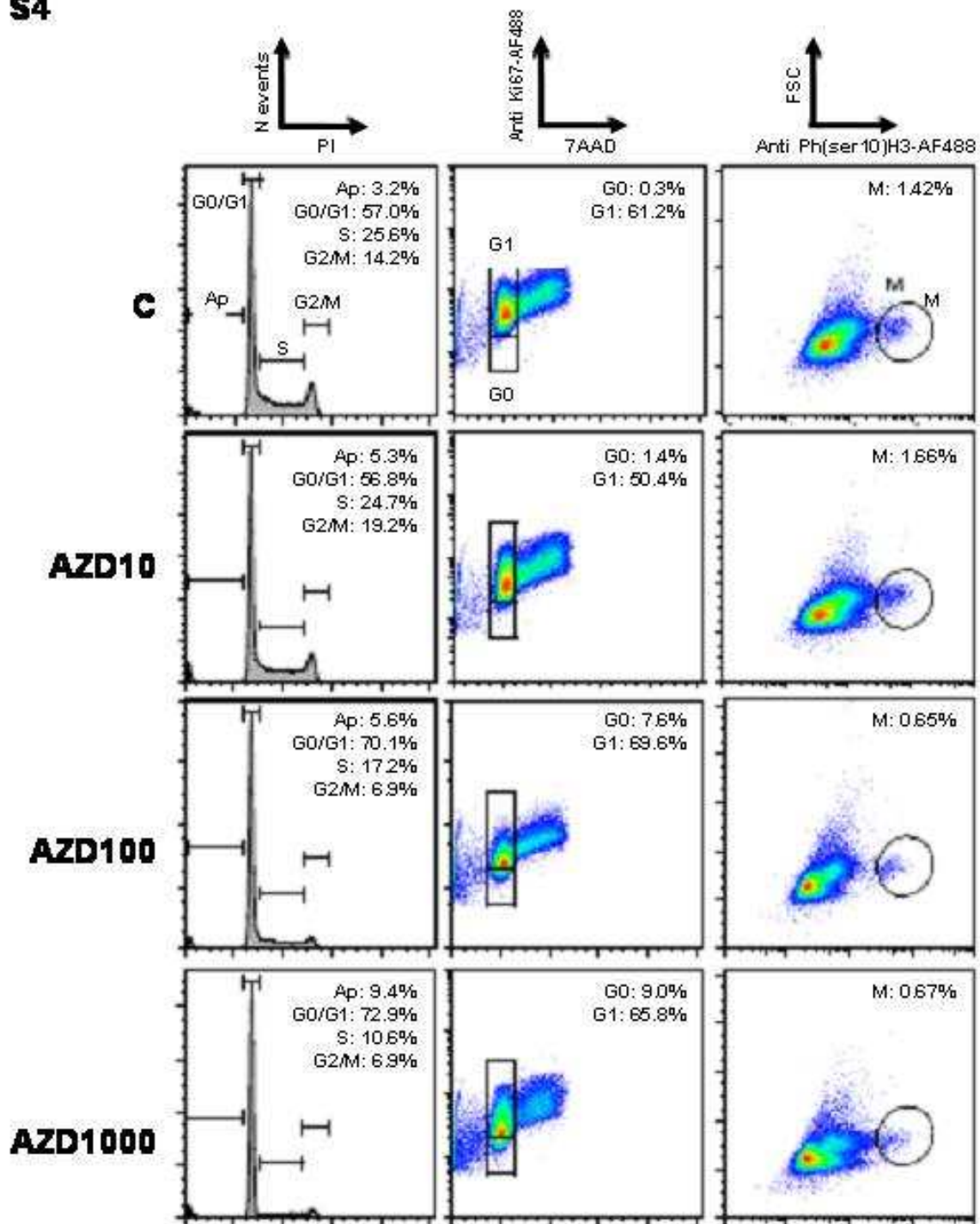
S4

Figure S4. AZD8055 decreases cell-cycle progression in the MOLM-14 cell line. Detailed cell cycle analysis was performed on MOLM-14 cells exposed during 24 h to AZD8055. One representative experiment (n = 3) is shown.

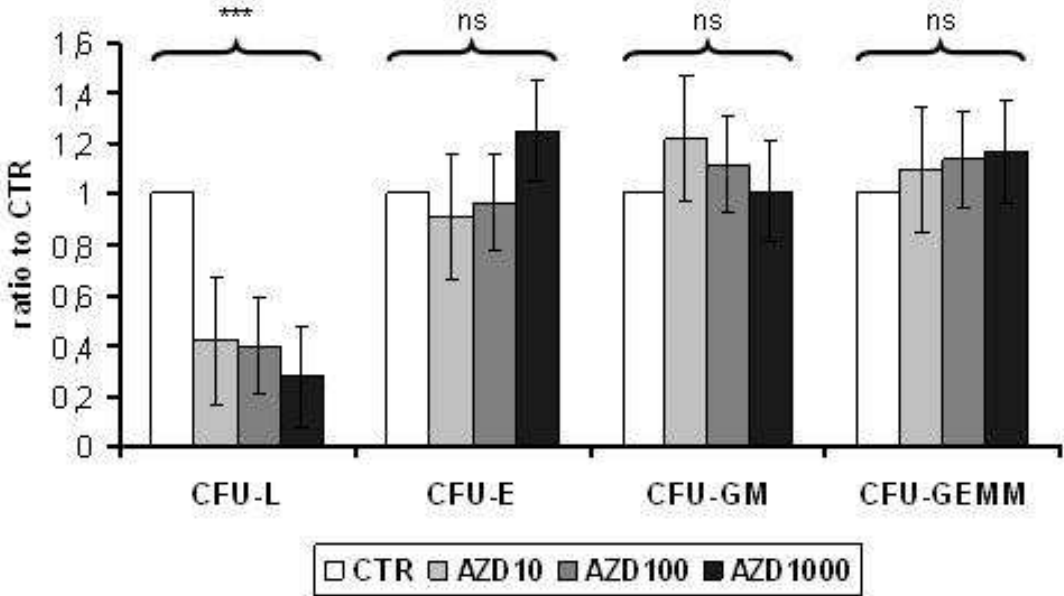


Figure S5. AZD8055 decreases the clonogenic growth of leukemic progenitors without affecting those of normal CD34+ immature progenitors. Primary blast cells from three AML samples and normal CD34+ cells purified from three healthy donors were plated with or without AZD8055 and CFU-L, BFU-E, CFU-GM, and CFU-GEMM colony-forming units were scored under inverted microscope. Results are expressed as a ratio between each condition and the control condition.

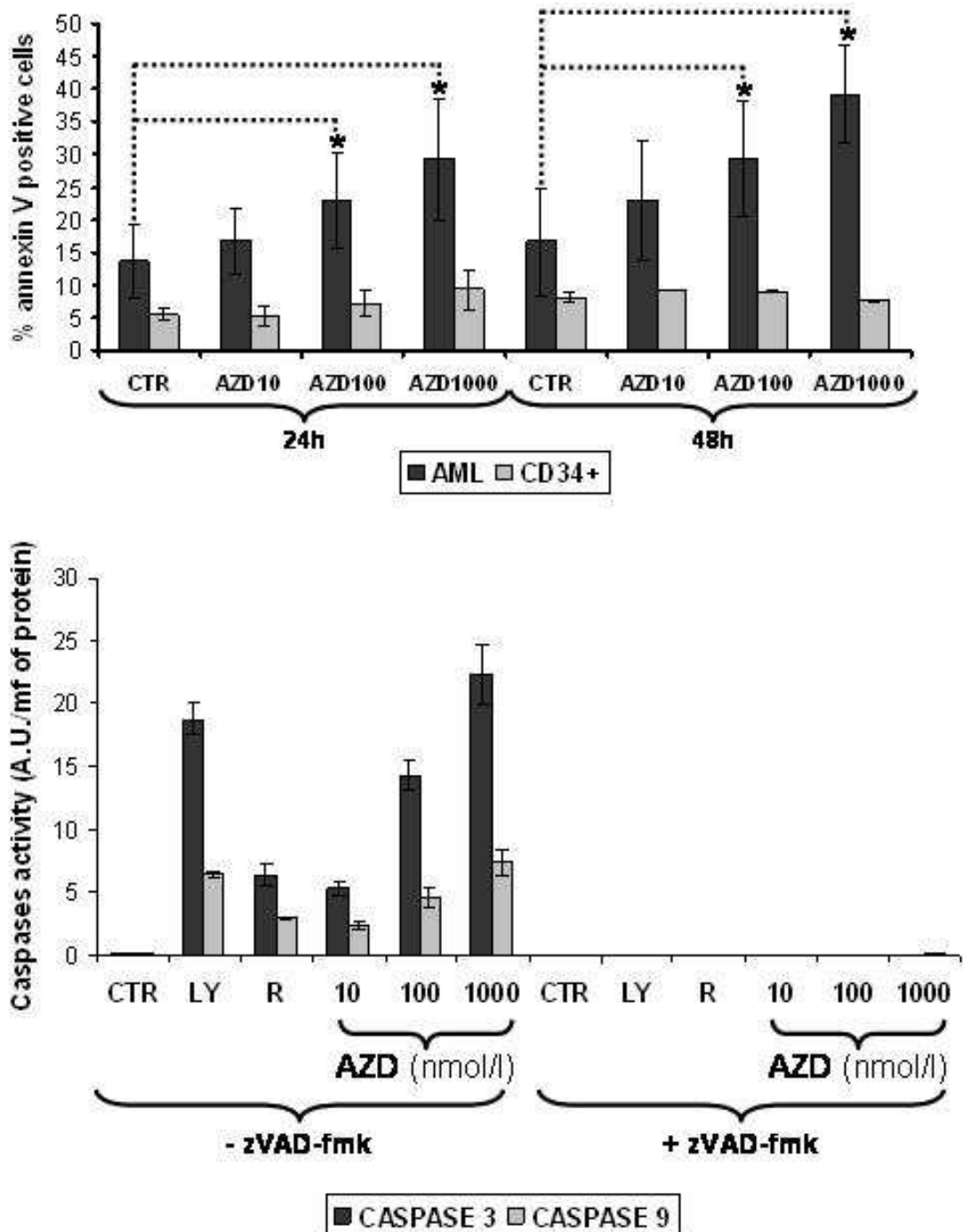


Figure S6. AZD8055 induces apoptosis in primary AML cells but not normal CD34+ immature hematopoietic cells. *Upper Panel:* Primary blast cells from 7 AML samples and normal CD34+ cells from three healthy donors were cultured during 24h and 48 h with or without AZD8055. Apoptosis was determined by Annexin V binding in flow cytometry. *Lower Panel:* Caspase 3 and caspase 9 activities were measured in the MV4-11 cell line treated or not (CTR) with, 10nmol/l rapamycin (R) and 10, 100 or 1000nmol/l AZD8055, eventually pre-incubated with 100 μ mol/l ZVAD.

S7



Figure S7. AZD8055 early induces autophagy in the MV4-11 cell line. A. The MV4-11 cell line was cultured during 1h, 2h, 4h, 8h, 16h or 24h 10% FCS MEM without or with 100nmol/l AZD8055. Autophagy was detected by Western blot using anti-LC3 antibody.

S8

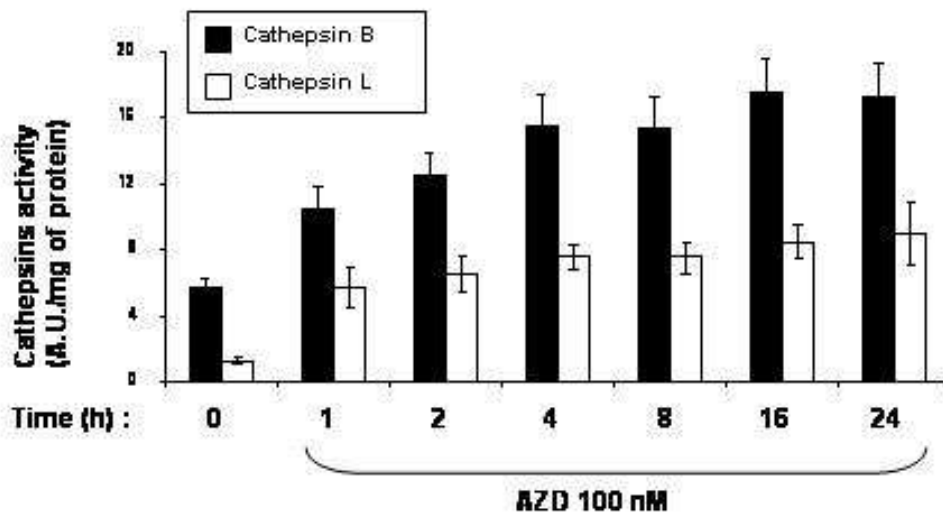


Figure S8. AZD8055 activates lysosomes endopeptidases, indirectly reflecting autophagy induction in the MV4-11 cell line. The MV4-11 cell line was cultured during 1h, 2h, 4h, 8h, 16h or 24h 10% FCS MEM with 100nmol/l AZD8055. The activity of both Cathepsin B and Cathepsin L was measured at each time-point and results are provided as arbitrary units (A.U.) per mg of proteins. Experiments were done in triplicate and vertical bars indicate standard deviations.

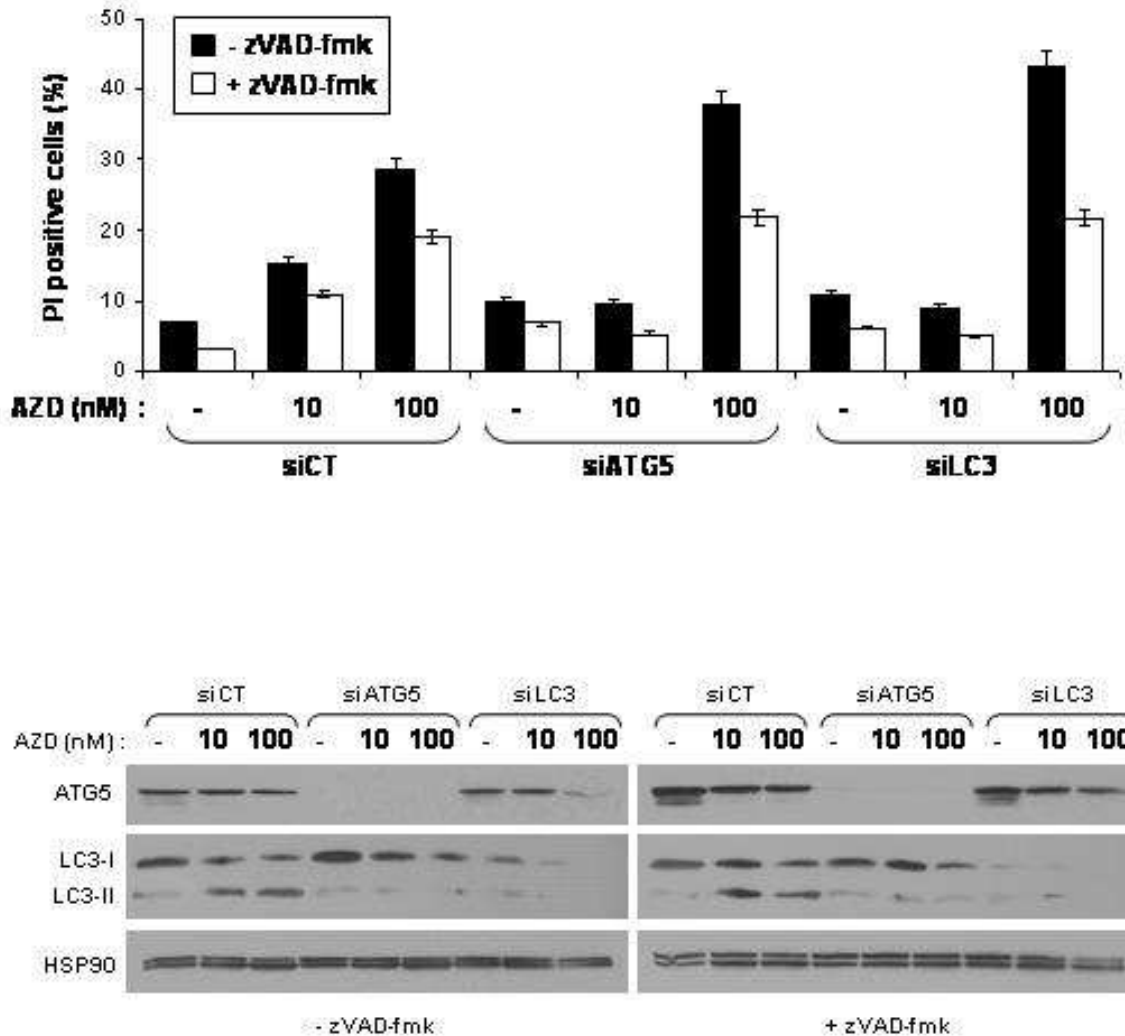


Figure S9. The effect of AZD8055 on autophagy is caspase-independent in the MV4-11 cell line. The MV4-11 cell line was transfected with with anti-Atg5 or anti-LC3 siRNA using Amaxa nucleofector and then cultured 24h in 10% FCS MEM without or with: 1) 10 or 100nmol/l AZD8055 and; 2) 100 μ mol/l of the pan-caspase inhibitor ZVAD. Western blots using anti-Atg5 and anti-LC3 antibodies were done to assess the efficacy of siRNA-mediated protein knockdown and HSP90, detected with anti-HSP90 antibody, was used as a loading control (lower panel). Cell viability was assessed by PI staining within the same conditions (upper panel).

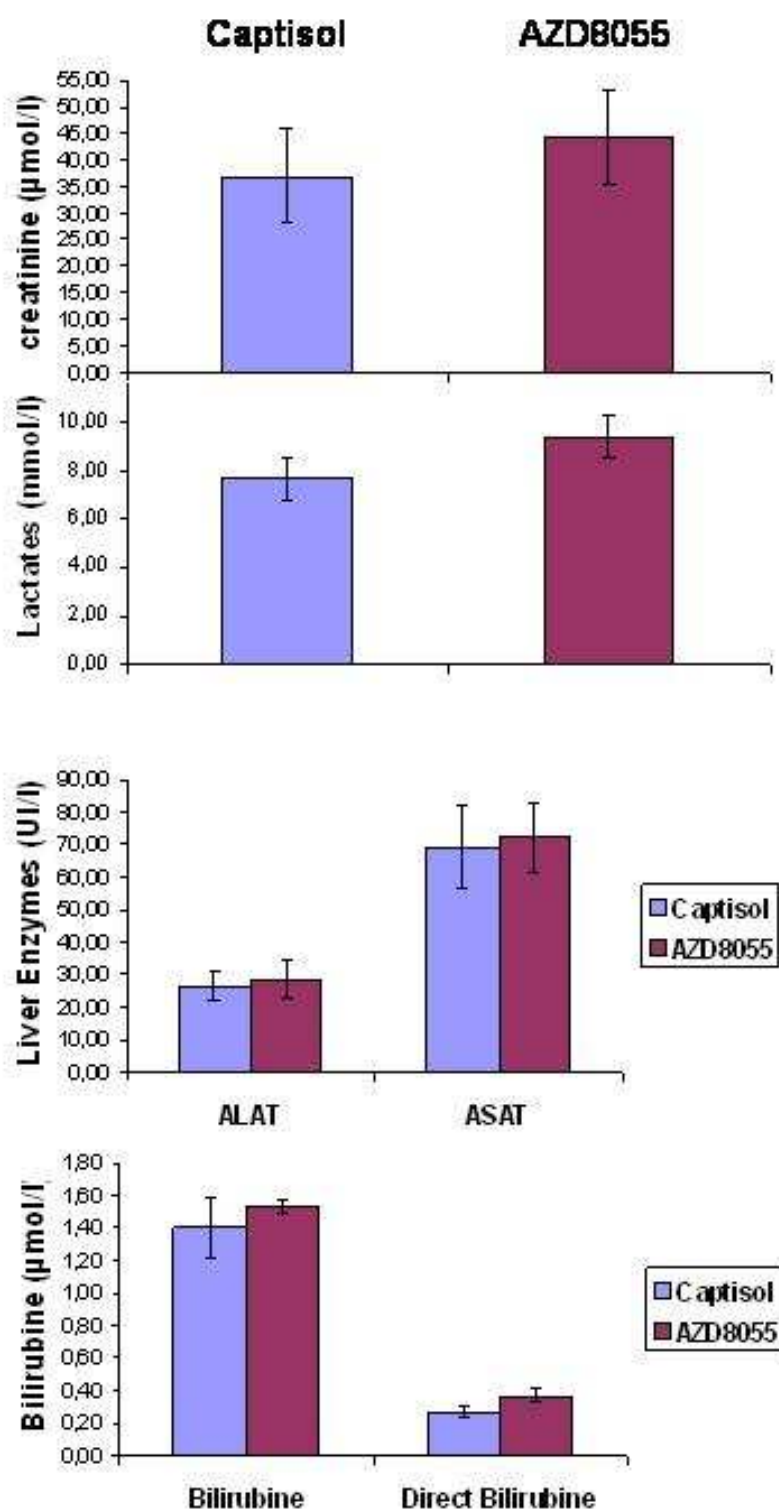
S10

Figure S10. In vivo assessment of AZD8055 toxicity profile. The biological parameters of nude mice treated or not with AZD8055 have been routinely tested in 4 mice from each group (i.e. Captisol and AZD8055) at the end of the experiment, and the units of each parameter are provided within the graph.

SUPPLEMENTAL TABLE 1

P	S	FAB	De Novo	WBC	K	Blast	FLT3	NPM
#1	M	AML4	Y	5	U	70	N	N
#2	F	AML1	N	60	I	90	N	N
#3	F	AML1	Y	40	I	75	N	Y
#4	M	AML2	Y	2	F	80	N	N
#5	M	AML2	Y	45	I	90	Y	N
#6	F	AML1	Y	45	I	82	Y	N
#7	F	AML2	Y	150	I	95	Y	Y
#8	M	AML2	Y	30	I	80	N	N
#9	F	AML5	Y	90	I	90	N	Y
#10	M	AML2	Y	3	F	70	N	N

7.3 PI3K and mTOR signaling pathways in cancer: new data on targeted therapies.Revue

Lien vers l'article: <http://www.springerlink.com/content/ax485w1803114364/>

7.4 La L-asparaginase, par son activité glutaminase, a une activité pro-apoptotique dans les LAM : données supplémentaires

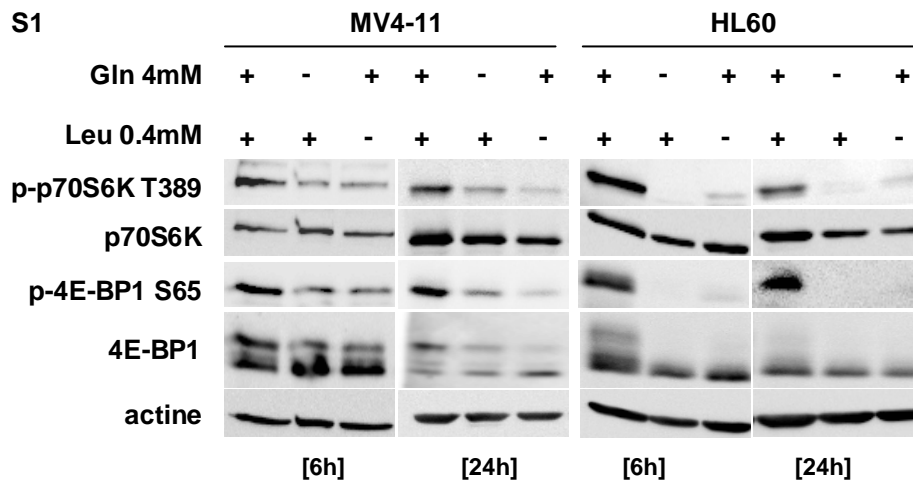


Figure S1. Les lignées MV4-11 et HL60 ont été cultivées pendant 6 ou 24 heures avec et sans glutamine (Gln) et/ou leucine (Leu). Les cellules ont ensuite été lysées en Laemmli 1X et les substrats de mTORC1 analysés par WB

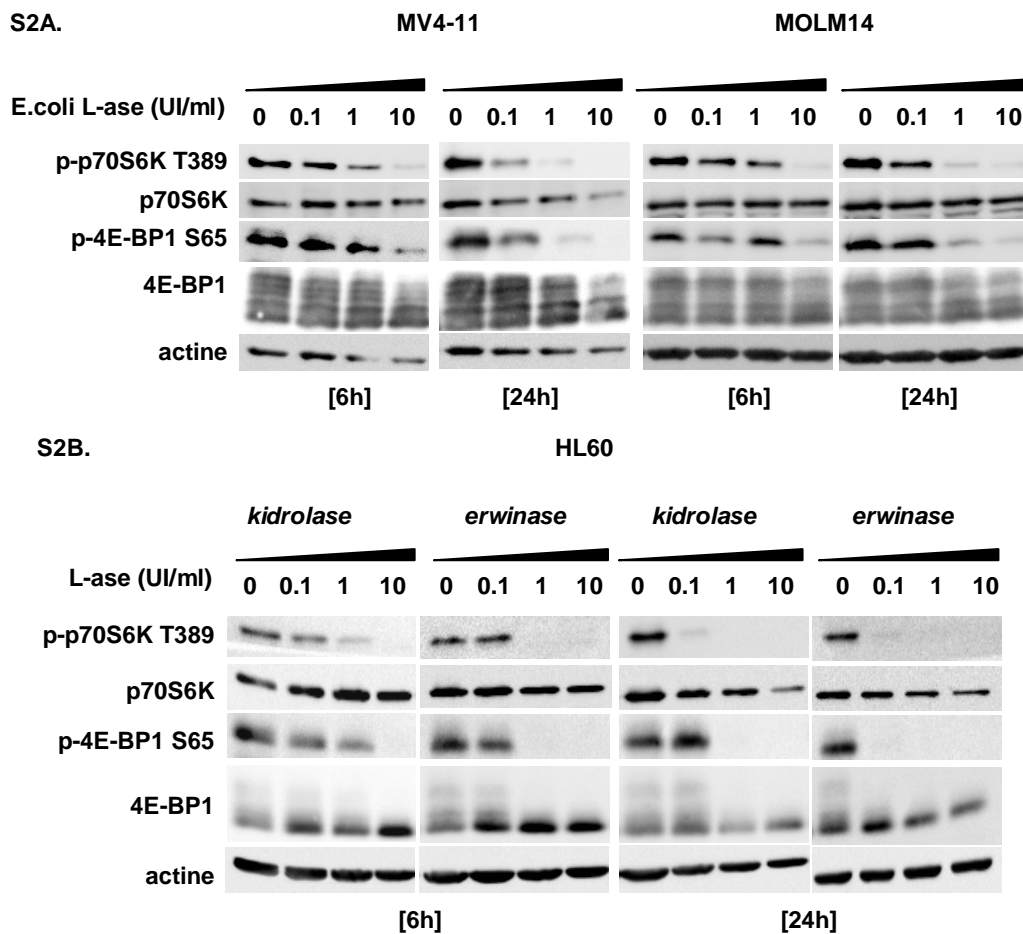
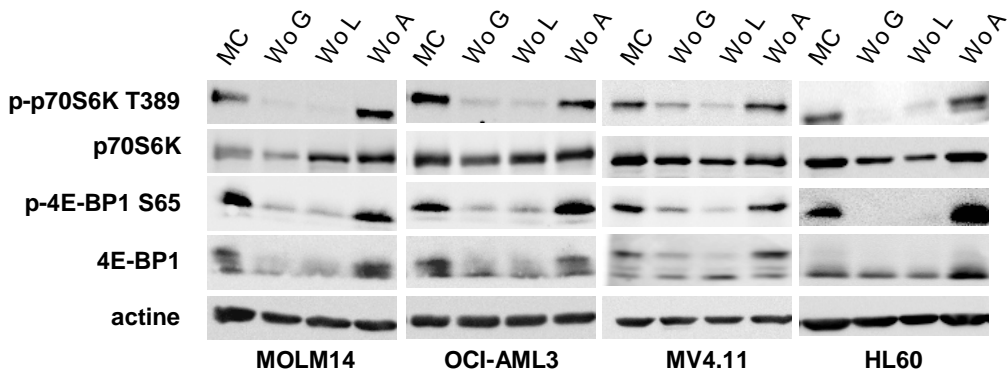


Figure S2. (A et B) Les lignées MOL14, MV411 et HL60 ont été traitées comme indiquées ; les cellules ont ensuite été lysées en Laemmli et les extraits protéiques analysés par WB.

S3A.



[24h]

S3B.

[6h]

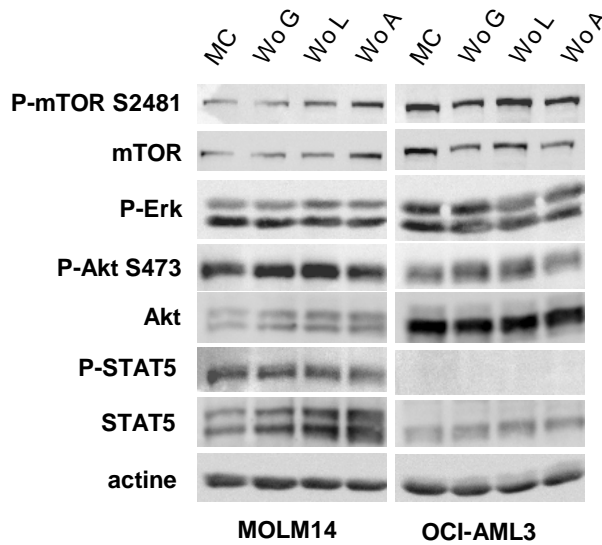


Figure S3. Les lignées indiquées ont été incubées pendant 24 heures dans des milieux de culture sans glutamine (Wo G), sans leucine (Wo L) sans asparagine (Wo A) ou dans un milieu complet en AA (MC) avant d'être lysées puis analysées par WB.

S4.

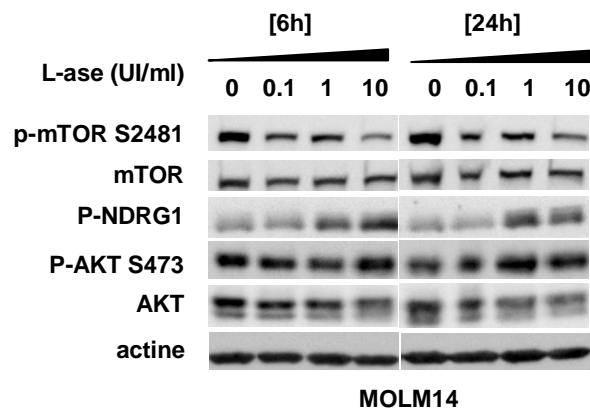


Figure S4. La lignée MOLM14 a été cultivée pendant 6 ou 24 heures en présence de L-ase (Kidrolase) à dose croissante. Différentes voies de signalisation ont ensuite été analysées par WB.

S5.

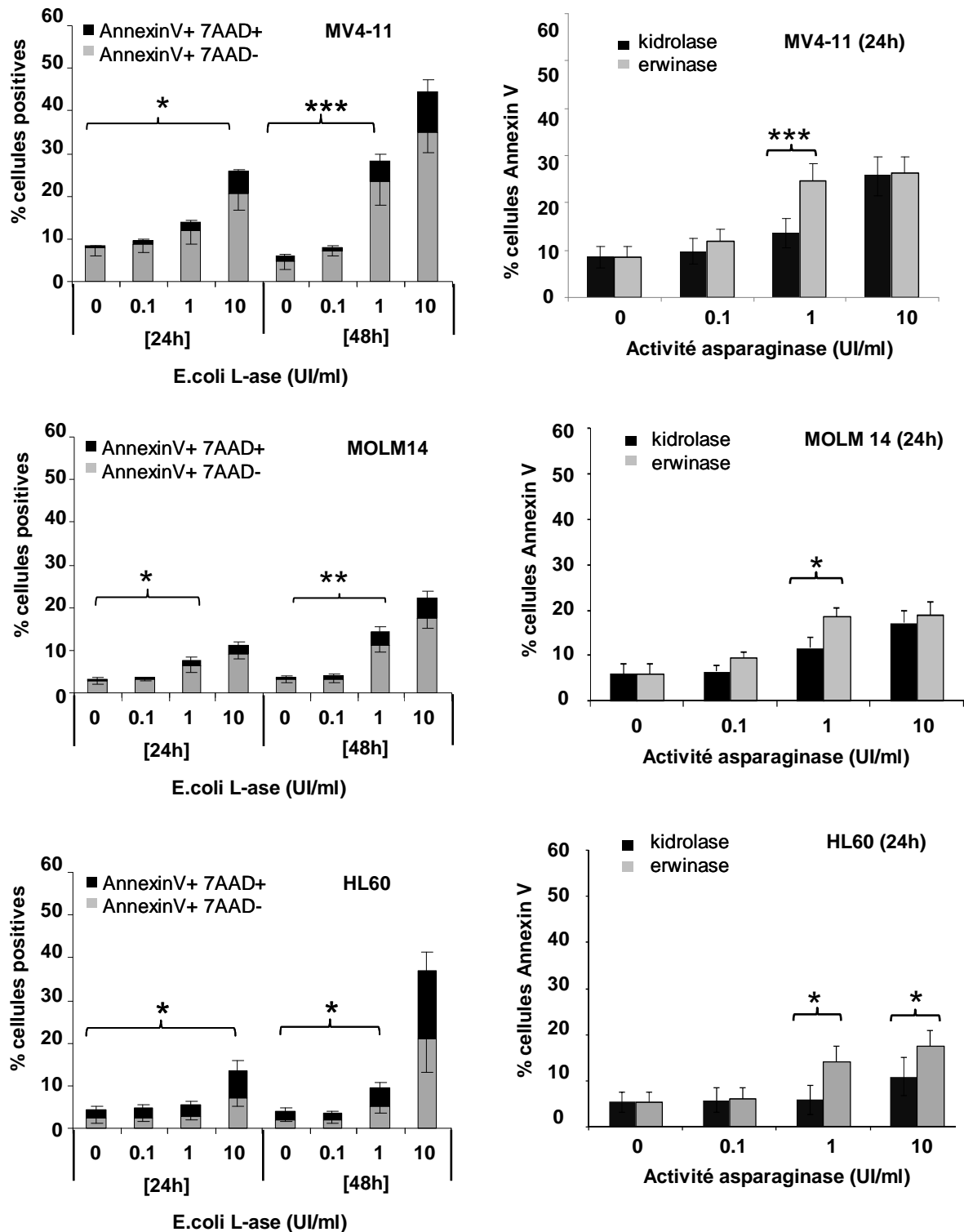


Figure S5. Les lignées MOLM14, MV411 et HL60 ont été cultivées pendant 24 et 48 heures avec ou sans L-ase issue d'*E.coli* (Kidrolase) (0.1 à 10 UI/mL) et l'apoptose mesurée par un marquage 7AAD Annexin V en cytométrie en flux (colonne de gauche). Les mêmes lignées ont été cultivées pendant 24 heures sans ou avec Kidrolase ou Erwinase à activité asparaginase égale (0.1 à 10 UI/mL) puis l'apoptose mesurée par marquage AnnexinV en cytométrie en flux.

S6.

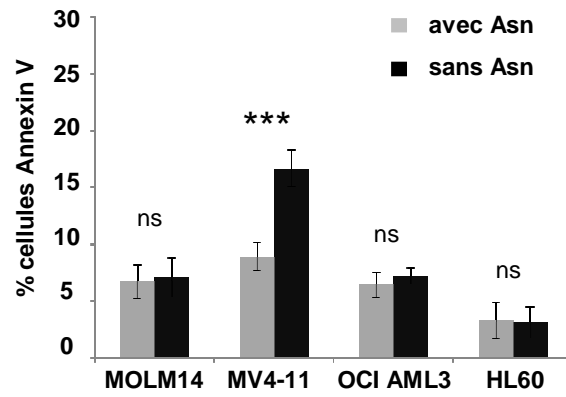


Figure S6. Les lignées leucémiques indiquées ont été cultivées pendant 24 heures dans un milieu de culture avec ou sans asparagine et l'apoptose déterminée par cytométrie en flux

8. Références bibliographiques

- Appel, I.M., den Boer, M.L., Meijerink, J.P.P., Veerman, A.J.P., Reniers, N.C.M., Pieters, R., 2006. Up-regulation of asparagine synthetase expression is not linked to the clinical response L-asparaginase in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 107, 4244–4249.
- Aslanian, A.M., Kilberg, M.S., 2001. Multiple adaptive mechanisms affect asparagine synthetase substrate availability in asparaginase-resistant MOLT-4 human leukaemia cells. *Biochem. J.* 358, 59–67.
- Avramis, V.I., Martin-Aragon, S., Avramis, E.V., Asselin, B.L., 2007. Pharmacokinetic assays of Erwinia asparaginase (erwinase) and pharmacokinetic results in high-risk acute lymphoblastic leukemia (HR ALL) patients: simulations of erwinase population PK-PD models. *Anticancer Res.* 27, 2561–2572.
- Avramis, V.I., Sencer, S., Periclou, A.P., Sather, H., Bostrom, B.C., Cohen, L.J., Ettinger, A.G., Ettinger, L.J., Franklin, J., Gaynon, P.S., Hilden, J.M., Lange, B., Majlessipour, F., Mathew, P., Needle, M., Neglia, J., Reaman, G., Holcenberg, J.S., Stork, L., 2002. A randomized comparison of native Escherichia coli asparaginase and polyethylene glycol conjugated asparaginase for treatment of children with newly diagnosed standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study. *Blood* 99, 1986–1994.
- Avruch, J., Long, X., Ortiz-Vega, S., Rapley, J., Papageorgiou, A., Dai, N., 2009. Amino acid regulation of TOR complex 1. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296, E592–602.
- Baird, F.E., Bett, K.J., MacLean, C., Tee, A.R., Hundal, H.S., Taylor, P.M., 2009. Tertiary active transport of amino acids reconstituted by coexpression of System A and L transporters in Xenopus oocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297, E822–829.
- Banerji, U., Aghajanian, C., Raymond, E., 2011. First results from a phase I trial of AZD8055, a dual mTORC1 and mTORC2 inhibitor. - *ASCO. J Clin Oncol* 29: 2011 (suppl; abstr 3096).
- Bardet, V., Tamburini, J., Ifrah, N., Dreyfus, F., Mayeux, P., Bouscary, D., Lacombe, C., 2006. Single cell analysis of phosphoinositide 3-kinase/Akt and ERK activation in acute myeloid leukemia by flow cytometry. *Haematologica* 91, 757–764.
- Bärlund, M., Monni, O., Kononen, J., Cornelison, R., Torhorst, J., Sauter, G., Kallioniemi OLLI-P, Kallioniemi, A., 2000. Multiple genes at 17q23 undergo amplification and overexpression in breast cancer. *Cancer Res.* 60, 5340–5344.
- Baumgartner, B., Weber, M., Quirling, M., Fischer, C., Page, S., Adam, M., Von Schilling, C., Waterhouse, C., Schmid, C., Neumeier, D., Brand, K., 2002. Increased I κ B kinase activity is associated with activated NF- κ B in acute myeloid blasts. *Leukemia* 16, 2062–2071.
- Bernardi, R., Guernah, I., Jin, D., Grisendi, S., Alimonti, A., Teruya-Feldstein, J., Cordon-Cardo, C., Simon, M.C., Rafii, S., Pandolfi, P.P., 2006. PML inhibits HIF-1 α translation and neoangiogenesis through repression of mTOR. *Nature* 442, 779–785.
- Blagden, S.P., Willis, A.E., 2011. The biological and therapeutic relevance of mRNA translation in cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 8, 280–291.
- Bode, B.P., 2001. Recent molecular advances in mammalian glutamine transport. *J. Nutr.* 131, 2475S–85S; discussion 2486S–7S.
- Bode, B.P., Kaminski, D.L., Souba, W.W., Li, A.P., 1995. Glutamine transport in isolated human hepatocytes and transformed liver cells. *Hepatology* 21, 511–520.
- Brandts, C.H., Sargin, B., Rode, M., Biermann, C., Lindtner, B., Schwäble, J., Buerger, H., Müller-Tidow, C., Choudhary, C., McMahon, M., Berdel, W.E., Serve, H., 2005. Constitutive activation of Akt by Flt3 internal tandem duplications is necessary for increased survival, proliferation, and myeloid transformation. *Cancer Res.* 65, 9643–9650.
- Bungard, C.I., McGivan, J.D., 2004. Glutamine availability up-regulates expression of the amino acid transporter protein ASCT2 in HepG2 cells and stimulates the ASCT2 promoter. *Biochem. J.* 382, 27–32.
- Bunpo, P., Dudley, A., Cundiff, J.K., Cavener, D.R., Wek, R.C., Anthony, T.G., 2009. GCN2 protein kinase is required to activate amino acid deprivation responses in mice treated with the anti-cancer agent L-asparaginase. *J. Biol. Chem.* 284, 32742–32749.
- Cadoret, A., Ovejero, C., Terris, B., Souil, E., Lévy, L., Lamers, W.H., Kitajewski, J., Kahn, A., Perret, C., 2002. New targets of beta-catenin signaling in the liver are involved in the glutamine metabolism. *Oncogene* 21, 8293–8301.
- Capizzi, R.L., Davis, R., Powell, B., Cuttner, J., Ellison, R.R., Cooper, M.R., Dillman, R., Major, W.B., Dupre, E., McIntyre, O.R., 1988. Synergy between high-dose cytarabine and asparaginase in the treatment of adults with refractory and relapsed acute myelogenous leukemia—a Cancer and Leukemia Group B Study. *J. Clin. Oncol.* 6, 499–508.

- Carr, E.L., Kelman, A., Wu, G.S., Gopaul, R., Senkevitch, E., Aghvanyan, A., Turay, A.M., Frauwirth, K.A., 2010. Glutamine uptake and metabolism are coordinately regulated by ERK/MAPK during T lymphocyte activation. *J. Immunol.* 185, 1037–1044.
- Carracedo, A., Ma, L., Teruya-Feldstein, J., Rojo, F., Salmena, L., Alimonti, A., Egia, A., Sasaki, A.T., Thomas, G., Kozma, S.C., Papa, A., Nardella, C., Cantley, L.C., Baselga, J., Pandolfi, P.P., 2008. Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J. Clin. Invest.* 118, 3065–3074.
- Cassago, A., Ferreira, A.P.S., Ferreira, I.M., Fornezari, C., Gomes, E.R.M., Greene, K.S., Pereira, H.M., Garratt, R.C., Dias, S.M.G., Ambrosio, A.L.B., 2012. Mitochondrial localization and structure-based phosphate activation mechanism of Glutaminase C with implications for cancer metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 1092–1097.
- Castilla, L.H., Garrett, L., Adya, N., Orlic, D., Dutra, A., Anderson, S., Owens, J., Eckhaus, M., Bodine, D., Liu, P.P., 1999. The fusion gene Cbfb-MYH11 blocks myeloid differentiation and predisposes mice to acute myelomonocytic leukaemia. *Nat. Genet.* 23, 144–146.
- Castilla, L.H., Wijmenga, C., Wang, Q., Stacy, T., Speck, N.A., Eckhaus, M., Marín-Padilla, M., Collins, F.S., Wynshaw-Boris, A., Liu, P.P., 1996. Failure of embryonic hematopoiesis and lethal hemorrhages in mouse embryos heterozygous for a knocked-in leukemia gene CFBF-MYH11. *Cell* 87, 687–696.
- Chapuis, N., Tamburini, J., Cornillet-Lefebvre, P., Gillot, L., Bardet, V., Willems, L., Park, S., Green, A.S., Ifrah, N., Dreyfus, F., Mayeux, P., Lacombe, C., Bouscary, D., 2010. Autocrine IGF-1/IGF-1R signaling is responsible for constitutive PI3K/Akt activation in acute myeloid leukemia: therapeutic value of neutralizing anti-IGF-1R antibody. *Haematologica* 95, 415–423.
- Chapuis, N., Tamburini, J., Green, A.S., Vignon, C., Bardet, V., Neyret, A., Pannetier, M., Willems, L., Park, S., Macone, A., Maira, S.-M., Ifrah, N., Dreyfus, F., Herault, O., Lacombe, C., Mayeux, P., Bouscary, D., 2010. Dual inhibition of PI3K and mTORC1/2 signaling by NVP-BEZ235 as a new therapeutic strategy for acute myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res.* 16, 5424–5435.
- Chen, C., Liu, Y., Liu, R., Ikenoue, T., Guan, K.-L., Liu, Y., Zheng, P., 2008. TSC-mTOR maintains quiescence and function of hematopoietic stem cells by repressing mitochondrial biogenesis and reactive oxygen species. *J. Exp. Med.* 205, 2397–2408.
- Cheung, N., So, C.W.E., 2011. Transcriptional and epigenetic networks in haematological malignancy. *FEBS Lett.* 585, 2100–2111.
- Choo, A.Y., Blenis, J., 2009. Not all substrates are treated equally: implications for mTOR, rapamycin-resistance and cancer therapy. *Cell Cycle* 8, 567–572.
- Choo, A.Y., Yoon, S.-O., Kim, S.G., Roux, P.P., Blenis, J., 2008. Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 17414–17419.
- Chresta, C.M., Davies, B.R., Hickson, I., Harding, T., Cosulich, S., Critchlow, S.E., Vincent, J.P., Ellston, R., Jones, D., Sini, P., James, D., Howard, Z., Dudley, P., Hughes, G., Smith, L., Maguire, S., Hummersone, M., Malagu, K., Menear, K., Jenkins, R., Jacobsen, M., Smith, G.C.M., Guichard, S., Pass, M., 2010. AZD8055 is a potent, selective, and orally bioavailable ATP-competitive mammalian target of rapamycin kinase inhibitor with in vitro and in vivo antitumor activity. *Cancer Res.* 70, 288–298.
- Cieply, B., Zeng, G., Proverbs-Singh, T., Geller, D.A., Monga, S.P.S., 2009. Unique phenotype of hepatocellular cancers with exon-3 mutations in beta-catenin gene. *Hepatology* 49, 821–831.
- Clarkson, B., Krakoff, I., Burchenal, J., Karnofsky, D., Golbey, R., Dowling, M., Oettgen, H., Lipton, A., 1970. Clinical results of treatment with E. coli L-asparaginase in adults with leukemia, lymphoma, and solid tumors. *Cancer* 25, 279–305.
- Collins, C.L., Wasa, M., Souba, W.W., Abcouwer, S.F., 1998. Determinants of glutamine dependence and utilization by normal and tumor-derived breast cell lines. *J. Cell. Physiol.* 176, 166–178.
- Corcelle, E.A., Puustinen, P., Jäättelä, M., 2009. Apoptosis and autophagy: Targeting autophagy signalling in cancer cells - 'trick or treats'? *FEBS J.* 276, 6084–6096.
- Corradetti, M.N., Inoki, K., Bardeesy, N., DePinho, R.A., Guan, K.-L., 2004. Regulation of the TSC pathway by LKB1: evidence of a molecular link between tuberous sclerosis complex and Peutz-Jeghers syndrome. *Genes Dev.* 18, 1533–1538.
- Crino, P.B., Nathanson, K.L., Henske, E.P., 2006. The tuberous sclerosis complex. *N. Engl. J. Med.* 355, 1345–1356.
- Curthoys, N.P., Watford, M., 1995. Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 15, 133–159.
- Dang, C.V., 2012. MYC on the path to cancer. *Cell* 149, 22–35.
- Dang, L., White, D.W., Gross, S., Bennett, B.D., Bittinger, M.A., Driggers, E.M., Fantin, V.R., Jang, H.G., Jin, S., Keenan, M.C., Marks, K.M., Prins, R.M., Ward, P.S., Yen, K.E., Liu, L.M., Rabinowitz, J.D.,

- Cantley, L.C., Thompson, C.B., Vander Heiden, M.G., Su, S.M., 2009. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 462, 739–744.
- DeBerardinis, R.J., Mancuso, A., Daikhin, E., Nissim, I., Yudkoff, M., Wehrli, S., Thompson, C.B., 2007. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 19345–19350.
- Deguchi, K., Gilliland, D.G., 2002. Cooperativity between mutations in tyrosine kinases and in hematopoietic transcription factors in AML. *Leukemia* 16, 740–744.
- Dibble, C.C., Asara, J.M., Manning, B.D., 2009. Characterization of Rictor Phosphorylation Sites Reveals Direct Regulation of mTOR Complex 2 by S6K1. *Mol Cell Biol* 29, 5657–5670.
- Dos Santos, C., Demur, C., Bardet, V., Prade-Houdellier, N., Payrastre, B., Récher, C., 2008. A critical role for Lyn in acute myeloid leukemia. *Blood* 111, 2269–2279.
- Dowling, R.J.O., Topisirovic, I., Alain, T., Bidinosti, M., Fonseca, B.D., Petroulakis, E., Wang, X., Larsson, O., Selvaraj, A., Liu, Y., Kozma, S.C., Thomas, G., Sonenberg, N., 2010. mTORC1-mediated cell proliferation, but not cell growth, controlled by the 4E-BPs. *Science* 328, 1172–1176.
- EAGLE, H., 1955. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science* 122, 501–514.
- Engelman, J.A., 2009. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat. Rev. Cancer* 9, 550–562.
- Evans, K., Nasim, Z., Brown, J., Butler, H., Kauser, S., Varoqui, H., Erickson, J.D., Herbert, T.P., Bevington, A., 2007. Acidosis-sensing glutamine pump SNAT2 determines amino acid levels and mammalian target of rapamycin signalling to protein synthesis in L6 muscle cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 18, 1426–1436.
- Faber, J., Krivtsov, A.V., Stubbs, M.C., Wright, R., Davis, T.N., van den Heuvel-Eibrink, M., Zwaan, C.M., Kung, A.L., Armstrong, S.A., 2009. HOXA9 is required for survival in human MLL-rearranged acute leukemias. *Blood* 113, 2375–2385.
- Feldman, M.E., Apsel, B., Uotila, A., Loewith, R., Knight, Z.A., Ruggero, D., Shokat, K.M., 2009. Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biol.* 7, e38.
- Fernandez, H.F., Sun, Z., Yao, X., Litzow, M.R., Luger, S.M., Paietta, E.M., Racevskis, J., Dewald, G.W., Ketterling, R.P., Bennett, J.M., Rowe, J.M., Lazarus, H.M., Tallman, M.S., 2009. Anthracycline dose intensification in acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 361, 1249–1259.
- Figuroa, M.E., Abdel-Wahab, O., Lu, C., Ward, P.S., Patel, J., Shih, A., Li, Y., Bhagwat, N., Vasanthakumar, A., Fernandez, H.F., Tallman, M.S., Sun, Z., Wolniak, K., Peeters, J.K., Liu, W., Choe, S.E., Fantin, V.R., Paietta, E., Löwenberg, B., Licht, J.D., Godley, L.A., Delwel, R., Valk, P.J.M., Thompson, C.B., Levine, R.L., Melnick, A., 2010. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell* 18, 553–567.
- Fuchs, B.C., Bode, B.P., 2005. Amino acid transporters ASCT2 and LAT1 in cancer: partners in crime? *Semin. Cancer Biol.* 15, 254–266.
- Fuchs, B.C., Finger, R.E., Onan, M.C., Bode, B.P., 2007. ASCT2 silencing regulates mammalian target-of-rapamycin growth and survival signaling in human hepatoma cells. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 293, C55–63.
- Fuchs, B.C., Perez, J.C., Suetterlin, J.E., Chaudhry, S.B., Bode, B.P., 2004. Inducible antisense RNA targeting amino acid transporter ATB0/ASCT2 elicits apoptosis in human hepatoma cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 286, G467–478.
- Fumarola, C., La Monica, S., Guidotti, G.G., 2005. Amino acid signaling through the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway: Role of glutamine and of cell shrinkage. *J. Cell. Physiol.* 204, 155–165.
- Gallay, N., Dos Santos, C., Cuzin, L., Bousquet, M., Simmonet Gouy, V., Chaussade, C., Attal, M., Payrastre, B., Demur, C., Récher, C., 2009. The level of AKT phosphorylation on threonine 308 but not on serine 473 is associated with high-risk cytogenetics and predicts poor overall survival in acute myeloid leukaemia. *Leukemia* 23, 1029–1038.
- Gan, B., Sahin, E., Jiang, S., Sanchez-Aguilera, A., Scott, K.L., Chin, L., Williams, D.A., Kwiatkowski, D.J., DePinho, R.A., 2008. mTORC1-dependent and -independent regulation of stem cell renewal, differentiation, and mobilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 19384–19389.
- Gan, X., Wang, J., Su, B., Wu, D., 2011. Evidence for direct activation of mTORC2 kinase activity by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* 286, 10998–11002.
- Gao, P., Tchernyshyov, I., Chang, T.-C., Lee, Y.-S., Kita, K., Ochi, T., Zeller, K.I., De Marzo, A.M., Van Eyk, J.E., Mendell, J.T., Dang, C.V., 2009. c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature* 458, 762–765.
- García-Martínez, J.M., Alessi, D.R., 2008. mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem. J.* 416, 375–385.

- García-Martínez, J.M., Moran, J., Clarke, R.G., Gray, A., Cosulich, S.C., Chresta, C.M., Alessi, D.R., 2009. Ku-0063794 is a specific inhibitor of the mammalian target of rapamycin (mTOR). *Biochem. J.* 421, 29–42.
- Gingras, A.C., Raught, B., Gygi, S.P., Niedzwiecka, A., Miron, M., Burley, S.K., Polakiewicz, R.D., Wyslouch-Cieszyńska, A., Aebersold, R., Sonenberg, N., 2001. Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes Dev.* 15, 2852–2864.
- Gingras, A.C., Raught, B., Sonenberg, N., 1999. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 913–963.
- Grandage, V.L., Gale, R.E., Linch, D.C., Khwaja, A., 2005. PI3-kinase/Akt is constitutively active in primary acute myeloid leukaemia cells and regulates survival and chemoresistance via NF-kappaB, Mapkinase and p53 pathways. *Leukemia* 19, 586–594.
- Greenblatt, S., Li, L., Slape, C., Nguyen, B., Novak, R., Duffield, A., Huso, D., Desiderio, S., Borowitz, M.J., Aplan, P., Small, D., 2012. Knock-in of a FLT3/ITD mutation cooperates with a NUP98-HOXD13 fusion to generate acute myeloid leukemia in a mouse model. *Blood* 119, 2883–2894.
- Grundler, R., Miething, C., Thiede, C., Peschel, C., Duyster, J., 2005. FLT3-ITD and tyrosine kinase domain mutants induce 2 distinct phenotypes in a murine bone marrow transplantation model. *Blood* 105, 4792–4799.
- Guertin, D.A., Sabatini, D.M., 2009. The pharmacology of mTOR inhibition. *Sci Signal* 2, pe24.
- Guertin, D.A., Stevens, D.M., Saitoh, M., Kinkel, S., Crosby, K., Sheen, J.-H., Mullholland, D.J., Magnuson, M.A., Wu, H., Sabatini, D.M., 2009. The mTOR complex 2 is required for the development of prostate cancer induced by Pten loss in mice. *Cancer Cell* 15, 148–159.
- Guertin, D.A., Stevens, D.M., Thoreen, C.C., Burds, A.A., Kalaany, N.Y., Moffat, J., Brown, M., Fitzgerald, K.J., Sabatini, D.M., 2006. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev. Cell* 11, 859–871.
- Guzman, M.L., Neering, S.J., Upchurch, D., Grimes, B., Howard, D.S., Rizzieri, D.A., Luger, S.M., Jordan, C.T., 2001. Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood* 98, 2301–2307.
- Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., Turk, B.E., Shaw, R.J., 2008. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol. Cell* 30, 214–226.
- Haghighat, A., Mader, S., Pause, A., Sonenberg, N., 1995. Repression of cap-dependent translation by 4E-binding protein 1: competition with p220 for binding to eukaryotic initiation factor-4E. *EMBO J.* 14, 5701–5709.
- Han, J.M., Jeong, S.J., Park, M.C., Kim, G., Kwon, N.H., Kim, H.K., Ha, S.H., Ryu, S.H., Kim, S., 2012. Leucyl-tRNA Synthetase Is an Intracellular Leucine Sensor for the mTORC1-Signaling Pathway. *Cell* 149, 410–424.
- Hara, K., Maruki, Y., Long, X., Yoshino, K., Oshiro, N., Hidayat, S., Tokunaga, C., Avruch, J., Yonezawa, K., 2002. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 110, 177–189.
- Hara, K., Yonezawa, K., Weng, Q.P., Kozłowski, M.T., Belham, C., Avruch, J., 1998. Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *J. Biol. Chem.* 273, 14484–14494.
- Hermanova, I., Zaliova, M., Trka, J., Starkova, J., 2012. Low expression of asparagine synthetase in lymphoid blasts precludes its role in sensitivity to L-asparaginase. *Exp. hematol.* 40, 657–665
- Hietakangas, V., Cohen, S.M., 2008. TOR complex 2 is needed for cell cycle progression and anchorage-independent growth of MCF7 and PC3 tumor cells. *BMC Cancer* 8, 282.
- Hoffmann, K., Firth, M.J., Beesley, A.H., Freitas, J.R., Ford, J., Senanayake, S., de Klerk, N.H., Baker, D.L., Kees, U.R., 2008. Prediction of relapse in paediatric pre-B acute lymphoblastic leukaemia using a three-gene risk index. *Br. J. Haematol.* 140, 656–664.
- Högstrand, K., Hejll, E., Sander, B., Rozell, B., Larsson, L.-G., Grandien, A., 2012. Inhibition of the intrinsic but not the extrinsic apoptosis pathway accelerates and drives MYC-driven tumorigenesis towards acute myeloid leukemia. *PLoS ONE* 7, e31366.
- Holz, M.K., Blenis, J., 2005. Identification of S6 kinase 1 as a novel mammalian target of rapamycin (mTOR)-phosphorylating kinase. *J. Biol. Chem.* 280, 26089–26093.
- Hoshii, T., Tadokoro, Y., Naka, K., Ooshio, T., Muraguchi, T., Sugiyama, N., Soga, T., Araki, K., Yamamura, K.-I., Hirao, A., 2012. mTORC1 is essential for leukemia propagation but not stem cell self-renewal. *J. Clin. Invest.* 122, 2114–2129
- Hou, H.-A., Kuo, Y.-Y., Liu, C.-Y., Lee, M.C., Tang, J.-L., Chen, C.-Y., Chou, W.-C., Huang, C.-F., Lee, F.-Y., Liu, M.-C., Yao, M., Tien, H.-F., 2011. Distinct association between aberrant methylation of Wnt inhibitors and genetic alterations in acute myeloid leukaemia. *Br. J. Cancer* 105, 1927–1933.

- Hsieh, A.C., Costa, M., Zollo, O., Davis, C., Feldman, M.E., Testa, J.R., Meyuhas, O., Shokat, K.M., Ruggero, D., 2010. Genetic dissection of the oncogenic mTOR pathway reveals druggable addiction to translational control via 4EBP-eIF4E. *Cancer Cell* 17, 249–261.
- Hsieh, A.C., Liu, Y., Edlind, M.P., Ingolia, N.T., Janes, M.R., Sher, A., Shi, E.Y., Stumpf, C.R., Christensen, C., Bonham, M.J., Wang, S., Ren, P., Martin, M., Jessen, K., Feldman, M.E., Weissman, J.S., Shokat, K.M., Rommel, C., Ruggero, D., 2012. The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis. *Nature* 485, 55–61.
- Hsu, P.P., Kang, S.A., Rameseder, J., Zhang, Y., Ottina, K.A., Lim, D., Peterson, T.R., Choi, Y., Gray, N.S., Yaffe, M.B., Marto, J.A., Sabatini, D.M., 2011. The mTOR-regulated phosphoproteome reveals a mechanism of mTORC1-mediated inhibition of growth factor signaling. *Science* 332, 1317–1322.
- Hsu, P.P., Sabatini, D.M., 2008. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* 134, 703–707.
- Hu, W., Zhang, C., Wu, R., Sun, Y., Levine, A., Feng, Z., 2010. Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 7455–7460.
- HUANG, J., MANNING, B.D., 2008. The TSC1–TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem J* 412, 179–190.
- Huang, S., Yang, Z.J., Yu, C., Sinicrope, F.A., 2011. Inhibition of mTOR kinase by AZD8055 can antagonize chemotherapy-induced cell death through autophagy induction and down-regulation of p62/sequestosome 1. *J. Biol. Chem.* 286, 40002–40012.
- Hundal, H.S., Taylor, P.M., 2009. Amino acid transceptors: gate keepers of nutrient exchange and regulators of nutrient signaling. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296, E603–613.
- Hutson, R.G., Kitoh, T., Moraga Amador, D.A., Cosic, S., Schuster, S.M., Kilberg, M.S., 1997. Amino acid control of asparagine synthetase: relation to asparaginase resistance in human leukemia cells. *Am. J. Physiol.* 272, C1691–1699.
- Iiboshi, Y., Papst, P.J., Hunger, S.P., Terada, N., 1999. L-Asparaginase inhibits the rapamycin-targeted signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260, 534–539.
- Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., Guan, K.-L., 2002. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat. Cell Biol.* 4, 648–657.
- Inoki, K., Ouyang, H., Zhu, T., Lindvall, C., Wang, Y., Zhang, X., Yang, Q., Bennett, C., Harada, Y., Stankunas, K., Wang, C.-Y., He, X., MacDougald, O.A., You, M., Williams, B.O., Guan, K.-L., 2006. TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell* 126, 955–968.
- Inoki, K., Zhu, T., Guan, K.-L., 2003. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 115, 577–590.
- Jacinto, E., Facchinetti, V., Liu, D., Soto, N., Wei, S., Jung, S.Y., Huang, Q., Qin, J., Su, B., 2006. SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* 127, 125–137.
- Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Ruegg, M.A., Hall, A., Hall, M.N., 2004. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat. Cell Biol.* 6, 1122–1128.
- Janes, M.R., Limon, J.J., So, L., Chen, J., Lim, R.J., Chavez, M.A., Vu, C., Lilly, M.B., Mallya, S., Ong, S.T., Konopleva, M., Martin, M.B., Ren, P., Liu, Y., Rommel, C., Fruman, D.A., 2010. Effective and selective targeting of leukemia cells using a TORC1/2 kinase inhibitor. *Nat. Med.* 16, 205–213.
- Kadia, T.M., Kantarjian, H., Kornblau, S., Borthakur, G., Faderl, S., Freireich, E.J., Luthra, R., Garcia-Manero, G., Pierce, S., Cortes, J., Ravandi, F., 2012. Clinical and proteomic characterization of acute myeloid leukemia with mutated RAS. *Cancer*. [Epub ahead of print]
- Kafkewitz, D., Bendich, A., 1983. Enzyme-induced asparagine and glutamine depletion and immune system function. *Am. J. Clin. Nutr.* 37, 1025–1030.
- Kato, N., Kitaura, J., Doki, N., Komeno, Y., Watanabe-Okochi, N., Togami, K., Nakahara, F., Oki, T., Enomoto, Y., Fukuchi, Y., Nakajima, H., Harada, Y., Harada, H., Kitamura, T., 2011. Two types of C/EBP α mutations play distinct but collaborative roles in leukemogenesis: lessons from clinical data and BMT models. *Blood* 117, 221–233.
- Kekuda, R., Prasad, P.D., Fei, Y.J., Torres-Zamorano, V., Sinha, S., Yang-Feng, T.L., Leibach, F.H., Ganapathy, V., 1996. Cloning of the sodium-dependent, broad-scope, neutral amino acid transporter Bo from a human placental choriocarcinoma cell line. *J. Biol. Chem.* 271, 18657–18661.
- Kelly, L.M., Liu, Q., Kutok, J.L., Williams, I.R., Boulton, C.L., Gilliland, D.G., 2002. FLT3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model. *Blood* 99, 310–318.
- Kharas, M.G., Okabe, R., Ganis, J.J., Gozo, M., Khandan, T., Paktinat, M., Gilliland, D.G., Gritsman, K., 2010. Constitutively active AKT depletes hematopoietic stem cells and induces leukemia in mice. *Blood* 115, 1406–1415.

- Kim, E., Goraksha-Hicks, P., Li, L., Neufeld, T.P., Guan, K.-L., 2008. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat. Cell Biol.* 10, 935–945.
- Kim, S., Kim, S.F., Maag, D., Maxwell, M.J., Resnick, A.C., Juluri, K.R., Chakraborty, A., Koldobskiy, M.A., Cha, S.H., Barrow, R., Snowman, A.M., Snyder, S.H., 2011. Amino acid signaling to mTOR mediated by inositol polyphosphate multikinase. *Cell Metab.* 13, 215–221.
- Kornblau, S.M., Womble, M., Qiu, Y.H., Jackson, C.E., Chen, W., Konopleva, M., Estey, E.H., Andreeff, M., 2006. Simultaneous activation of multiple signal transduction pathways confers poor prognosis in acute myelogenous leukemia. *Blood* 108, 2358–2365.
- Kovacević, Z., 1971. The pathway of glutamine and glutamate oxidation in isolated mitochondria from mammalian cells. *Biochem. J.* 125, 757–763.
- Krause, U., Bertrand, L., Maisin, L., Rosa, M., Hue, L., 2002. Signalling pathways and combinatory effects of insulin and amino acids in isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* 269, 3742–3750.
- Kroemer, G., Pouyssegur, J., 2008. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* 13, 472–482.
- Kung, H.-N., Marks, J.R., Chi, J.-T., 2011. Glutamine synthetase is a genetic determinant of cell type-specific glutamine independence in breast epithelia. *PLoS Genet.* 7, e1002229.
- Kurayama, R., Ito, N., Nishibori, Y., Fukuhara, D., Akimoto, Y., Higashihara, E., Ishigaki, Y., Sai, Y., Miyamoto, K., Endou, H., Kanai, Y., Yan, K., 2011. Role of amino acid transporter LAT2 in the activation of mTORC1 pathway and the pathogenesis of crescentic glomerulonephritis. *Lab. Invest.* 91, 992–1006.
- Labow, B.I., Souba, W.W., Abcouwer, S.F., 2001. Mechanisms governing the expression of the enzymes of glutamine metabolism--glutaminase and glutamine synthetase. *J. Nutr.* 131, 2467S–74S
- Laplante, M., Sabatini, D.M., 2009. An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis. *Curr. Biol.* 19, R1046–1052.
- Le, A., Lane, A.N., Hamaker, M., Bose, S., Gouw, A., Barbi, J., Tsukamoto, T., Rojas, C.J., Slusher, B.S., Zhang, H., Zimmerman, L.J., Liebler, D.C., Slebos, R.J.C., Lorkiewicz, P.K., Higashi, R.M., Fan, T.W.M., Dang, C.V., 2012. Glucose-independent glutamine metabolism via TCA cycling for proliferation and survival in B cells. *Cell Metab.* 15, 110–121.
- Levine, A.J., Puzio-Kuter, A.M., 2010. The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. *Science* 330, 1340–1344.
- Long, X., Ortiz-Vega, S., Lin, Y., Avruch, J., 2005. Rheb binding to mammalian target of rapamycin (mTOR) is regulated by amino acid sufficiency. *J. Biol. Chem.* 280, 23433–23436.
- Muller, A.M.S., Duque, J., Shizuru, J.A., Lübbert, M., 2008. Complementing mutations in core binding factor leukemias: from mouse models to clinical applications. *Oncogene* 27, 5759–5773.
- Ma, L., Chen, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Pandolfi, P.P., 2005. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* 121, 179–193.
- Ma, X.M., Blenis, J., 2009. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 307–318.
- Magnuson, B., Ekim, B., Fingar, D.C., 2012. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem. J.* 441, 1–21.
- Manning, B.D., Cantley, L.C., 2007. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 1261–1274.
- Martín-Rufián, M., Tosina, M., Campos-Sandoval, J.A., Manzanares, E., Lobo, C., Segura, J.A., Alonso, F.J., Matés, J.M., Márquez, J., 2012. Mammalian glutaminase *gls2* gene encodes two functional alternative transcripts by a surrogate promoter usage mechanism. *PLoS ONE* 7, e38380.
- Masri, J., Bernath, A., Martin, J., Jo, O.D., Vartanian, R., Funk, A., Gera, J., 2007. mTORC2 activity is elevated in gliomas and promotes growth and cell motility via overexpression of rictor. *Cancer Res.* 67, 11712–11720.
- Masson, K., Rönstrand, L., 2009. Oncogenic signaling from the hematopoietic growth factor receptors c-Kit and Flt3. *Cell. Signal.* 21, 1717–1726.
- Mazzio, E.A., Boukli, N., Rivera, N., Soliman, K.F.A., 2012. Pericellular pH homeostasis is a primary function of the Warburg effect: inversion of metabolic systems to control lactate steady state in tumor cells. *Cancer Sci.* 103, 422–432.
- McGivan, J.D., Bungard, C.I., 2007. The transport of glutamine into mammalian cells. *Front. Biosci.* 12, 874–882.
- Menon, S., Yecies, J.L., Zhang, H.H., Howell, J.J., Nicholatos, J., Harputlugil, E., Bronson, R.T., Kwiatkowski, D.J., Manning, B.D., 2012. Chronic activation of mTOR complex 1 is sufficient to cause hepatocellular carcinoma in mice. *Sci Signal* 5, ra24.
- Metallo, C.M., Gameiro, P.A., Bell, E.L., Mattaini, K.R., Yang, J., Hiller, K., Jewell, C.M., Johnson, Z.R., Irvine, D.J., Guarente, L., Kelleher, J.K., Vander Heiden, M.G., Iliopoulos, O., Stephanopoulos, G.,

2012. Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature* 481, 380–384.
- Milella, M., Kornblau, S.M., Estrov, Z., Carter, B.Z., Lapillonne, H., Harris, D., Konopleva, M., Zhao, S., Estey, E., Andreeff, M., 2001. Therapeutic targeting of the MEK/MAPK signal transduction module in acute myeloid leukemia. *J. Clin. Invest.* 108, 851–859.
- Miller, H.K., Salsler, J.S., Balis, M.E., 1969. Amino acid levels following L-asparagine amidohydrolase (EC.3.5.1.1) therapy. *Cancer Res.* 29, 183–187.
- Mizuki, M., Fenski, R., Halfter, H., Matsumura, I., Schmidt, R., Müller, C., Grüning, W., Kratz-Albers, K., Serve, S., Steur, C., Büchner, T., Kienast, J., Kanakura, Y., Berdel, W.E., Serve, H., 2000. Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. *Blood* 96, 3907–3914.
- Montagne, J., Stewart, M.J., Stocker, H., Hafen, E., Kozma, S.C., Thomas, G., 1999. Drosophila S6 kinase: a regulator of cell size. *Science* 285, 2126–2129.
- Mullen, A.R., Wheaton, W.W., Jin, E.S., Chen, P.-H., Sullivan, L.B., Cheng, T., Yang, Y., Linehan, W.M., Chandel, N.S., DeBerardinis, R.J., 2012. Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria. *Nature* 481, 385–388.
- Müller, H.J., Boos, J., 1998. Use of L-asparaginase in childhood ALL. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 28, 97–113.
- Müller-Tidow, C., Steffen, B., Cauvet, T., Tickenbrock, L., Ji, P., Diederichs, S., Sargin, B., Köhler, G., Stelljes, M., Puccetti, E., Ruthardt, M., deVos, S., Hiebert, S.W., Koeffler, H.P., Berdel, W.E., Serve, H., 2004. Translocation products in acute myeloid leukemia activate the Wnt signaling pathway in hematopoietic cells. *Mol. Cell. Biol.* 24, 2890–2904.
- Nardella, C., Chen, Z., Salmena, L., Carracedo, A., Alimonti, A., Egia, A., Carver, B., Gerald, W., Cordon-Cardo, C., Pandolfi, P.P., 2008. Aberrant Rheb-mediated mTORC1 activation and Pten haploinsufficiency are cooperative oncogenic events. *Genes Dev.* 22, 2172–2177.
- Newsholme, P., Procopio, J., Lima, M.M.R., Pithon-Curi, T.C., Curi, R., 2003. Glutamine and glutamate--their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochem. Funct.* 21, 1–9.
- Nick, H.J., Kim, H.-G., Chang, C.-W., Harris, K.W., Reddy, V., Klug, C.A., 2012. Distinct classes of c-Kit-activating mutations differ in their ability to promote RUNX1-ETO-associated acute myeloid leukemia. *Blood* 119, 1522–1531.
- Nicklin, P., Bergman, P., Zhang, B., Triantafellow, E., Wang, H., Nyfeler, B., Yang, H., Hild, M., Kung, C., Wilson, C., Myer, V.E., MacKeigan, J.P., Porter, J.A., Wang, Y.K., Cantley, L.C., Finan, P.M., Murphy, L.O., 2009. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* 136, 521–534.
- Nobukuni, T., Joaquin, M., Roccio, M., Dann, S.G., Kim, S.Y., Gulati, P., Byfield, M.P., Backer, J.M., Natt, F., Bos, J.L., Zwartkruis, F.J.T., Thomas, G., 2005. Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 14238–14243.
- O'Reilly, K.E., Rojo, F., She, Q.-B., Solit, D., Mills, G.B., Smith, D., Lane, H., Hofmann, F., Hicklin, D.J., Ludwig, D.L., Baselga, J., Rosen, N., 2006. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res.* 66, 1500–1508.
- Ochiai, H., Higa, K., Hishiyama, N., Hisamatsu, S., Fujise, H., 2006. Characterization of several amino acid transports and glutamine metabolism in MOLT4 human T4 leukemia cells. *Clin Lab Haematol* 28, 399–404.
- Ogmundsdóttir, M.H., Heublein, S., Kazi, S., Reynolds, B., Visvalingam, S.M., Shaw, M.K., Goberdhan, D.C.I., 2012. Proton-Assisted Amino Acid Transporter PAT1 Complexes with Rag GTPases and Activates TORC1 on Late Endosomal and Lysosomal Membranes. *PLoS ONE* 7, e36616.
- Oh, W.J., Jacinto, E., 2011. mTOR complex 2 signaling and functions. *Cell Cycle* 10, 2305–2316.
- Oh, W.J., Wu, C., Kim, S.J., Facchinetti, V., Julien, L.-A., Finlan, M., Roux, P.P., Su, B., Jacinto, E., 2010. mTORC2 can associate with ribosomes to promote cotranslational phosphorylation and stability of nascent Akt polypeptide. *EMBO J.* 29, 3939–3951.
- Ohne, Y., Takahara, T., Hatakeyama, R., Matsuzaki, T., Noda, M., Mizushima, N., Maeda, T., 2008. Isolation of hyperactive mutants of mammalian target of rapamycin. *J. Biol. Chem.* 283, 31861–31870.
- Ohnuma, T., Holland, J.F., Freeman, A., Sinks, L.F., 1970. Biochemical and pharmacological studies with asparaginase in man. *Cancer Res.* 30, 2297–2305.
- Okada, S., Hongo, T., Yamada, S., Watanabe, C., Fujii, Y., Ohzeki, T., Horikoshi, Y., Ito, T., Yazaki, M., Komada, Y., Tawa, A., 2003. In vitro efficacy of l-asparaginase in childhood acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* 123, 802–809.
- Okuda, T., van Deursen, J., Hiebert, S.W., Grosveld, G., Downing, J.R., 1996. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 84, 321–330.

- Ollila, S., Mäkelä, T.P., 2011. The tumor suppressor kinase LKB1: lessons from mouse models. *J Mol Cell Biol* 3, 330–340.
- Orloff, M.S., Eng, C., 2008. Genetic and phenotypic heterogeneity in the PTEN hamartoma tumour syndrome. *Oncogene* 27, 5387–5397.
- Oshiro, N., Yoshino, K., Hidayat, S., Tokunaga, C., Hara, K., Eguchi, S., Avruch, J., Yonezawa, K., 2004. Dissociation of raptor from mTOR is a mechanism of rapamycin-induced inhibition of mTOR function. *Genes Cells* 9, 359–366.
- Palmada, M., Speil, A., Jeyaraj, S., Böhmer, C., Lang, F., 2005. The serine/threonine kinases SGK1, 3 and PKB stimulate the amino acid transporter ASCT2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 272–277.
- Panosyan, E.H., Grigoryan, R.S., Avramis, I.A., Seibel, N.L., Gaynon, P.S., Siegel, S.E., Fingert, H.J., Avramis, V.I., 2004. Deamination of glutamine is a prerequisite for optimal asparagine deamination by asparaginases in vivo (CCG-1961). *Anticancer Res.* 24, 1121–1125.
- Panosyan, E.H., Seibel, N.L., Martin-Aragon, S., Gaynon, P.S., Avramis, I.A., Sather, H., Franklin, J., Nachman, J., Ettinger, L.J., La, M., Steinherz, P., Cohen, L.J., Siegel, S.E., Avramis, V.I., 2004. Asparaginase antibody and asparaginase activity in children with higher-risk acute lymphoblastic leukemia: Children's Cancer Group Study CCG-1961. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 26, 217–226.
- Parikh, C., Subrahmanyam, R., Ren, R., 2006. Oncogenic NRAS rapidly and efficiently induces CMML- and AML-like diseases in mice. *Blood* 108, 2349–2357.
- Park, S., Chapuis, N., Bardet, V., Tamburini, J., Gallay, N., Willems, L., Knight, Z.A., Shokat, K.M., Azar, N., Viguie, F., Ifrah, N., Dreyfus, F., Mayeux, P., Lacombe, C., Bouscary, D., 2008. PI-103, a dual inhibitor of Class IA phosphatidylinositide 3-kinase and mTOR, has antileukemic activity in AML. *Leukemia* 22, 1698–1706.
- Park, S., Chapuis, N., Tamburini, J., Bardet, V., Cornillet-Lefebvre, P., Willems, L., Green, A., Mayeux, P., Lacombe, C., Bouscary, D., 2010. Role of the PI3K/AKT and mTOR signaling pathways in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 95, 819–828.
- Patel, J.P., Gönen, M., Figueroa, M.E., Fernandez, H., Sun, Z., Racevskis, J., Van Vlierberghe, P., Dolgalev, I., Thomas, S., Aminova, O., Huberman, K., Cheng, J., Viale, A., Socci, N.D., Heguy, A., Cherry, A., Vance, G., Higgins, R.R., Ketterling, R.P., Gallagher, R.E., Litzow, M., van den Brink, M.R.M., Lazarus, H.M., Rowe, J.M., Luger, S., Ferrando, A., Paietta, E., Tallman, M.S., Melnick, A., Abdel-Wahab, O., Levine, R.L., 2012. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 366, 1079–1089.
- Patursky-Polischuk, I., Stolovich-Rain, M., Hausner-Hanochi, M., Kasir, J., Cybulski, N., Avruch, J., Rüegg, M.A., Hall, M.N., Meyuhos, O., 2009. The TSC-mTOR Pathway Mediates Translational Activation of TOP mRNAs by Insulin Largely in a Raptor- or Rictor-Independent Manner. *Mol Cell Biol* 29, 640–649.
- Perel, Y., Auvergnon, A., Leblanc, T., Michel, G., Reguerre, Y., Vannier, J.-P., Dalle, J.-H., Gandemer, V., Schmitt, C., Méchinaud, F., Lejars, O., Pigué, C., Couillaud, G., Pautard, B., Landman-Parker, J., Thuret, I., Aladjidi, N., Baruchel, A., Leverger, G., 2005. Treatment of childhood acute myeloblastic leukemia: dose intensification improves outcome and maintenance therapy is of no benefit—multicenter studies of the French LAME (Leucémie Aiguë Myéloblastique Enfant) Cooperative Group. *Leukemia* 19, 2082–2089.
- Pérez-Gómez, C., Campos-Sandoval, J.A., Alonso, F.J., Segura, J.A., Manzanares, E., Ruiz-Sánchez, P., González, M.E., Márquez, J., Matés, J.M., 2005. Co-expression of glutaminase K and L isoenzymes in human tumour cells. *Biochem. J.* 386, 535–542.
- Peterson, T.R., Laplante, M., Thoreen, C.C., Sancak, Y., Kang, S.A., Kuehl, W.M., Gray, N.S., Sabatini, D.M., 2009. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell* 137, 873–886.
- Peterson, T.R., Sengupta, S.S., Harris, T.E., Carmack, A.E., Kang, S.A., Balderas, E., Guertin, D.A., Madden, K.L., Carpenter, A.E., Finck, B.N., Sabatini, D.M., 2011. mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell* 146, 408–420.
- Pinilla, J., Aledo, J.C., Cwiklinski, E., Hyde, R., Taylor, P.M., Hundal, H.S., 2011. SNAT2 transceptor signalling via mTOR: a role in cell growth and proliferation? *Front Biosci (Elite Ed)* 3, 1289–1299.
- Pui, C.-H., Evans, W.E., 2006. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 354, 166–178.
- Ramirez, M., Wek, R.C., Vazquez de Aldana, C.R., Jackson, B.M., Freeman, B., Hinnebusch, A.G., 1992. Mutations activating the yeast eIF-2 alpha kinase GCN2: isolation of alleles altering the domain related to histidyl-tRNA synthetases. *Mol. Cell. Biol.* 12, 5801–5815.
- Rathore, M.G., Saumet, A., Rossi, J.-F., de Bettignies, C., Tempe, D., Lecellier, C.-H., Villalba, M., 2012. The NF-κB member p65 controls glutamine metabolism through miR-23a. *Int J Biochem Cell Biol.* 44, 1448–56

- Récher, C., Beyne-Rauzy, O., Demur, C., Chicanne, G., Dos Santos, C., Mas, V.M.-D., Benzaquen, D., Laurent, G., Huguet, F., Payrastra, B., 2005. Antileukemic activity of rapamycin in acute myeloid leukemia. *Blood* 105, 2527–2534.
- Ricciardi, M.R., McQueen, T., Chism, D., Milella, M., Estey, E., Kaldjian, E., Sebolt-Leopold, J., Konopleva, M., Andreeff, M., 2005. Quantitative single cell determination of ERK phosphorylation and regulation in relapsed and refractory primary acute myeloid leukemia. *Leukemia* 19, 1543–1549.
- Roboz, G.J., 2011. Novel approaches to the treatment of acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011, 43–50.
- Rotoli, B.M., Uggeri, J., Dall'Asta, V., Visigalli, R., Barilli, A., Gatti, R., Orlandini, G., Gazzola, G.C., Bussolati, O., 2005. Inhibition of glutamine synthetase triggers apoptosis in asparaginase-resistant cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 15, 281–292.
- Roux, P.P., Ballif, B.A., Anjum, R., Gygi, S.P., Blenis, J., 2004. Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 13489–13494.
- Sancak, Y., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Markhard, A.L., Nada, S., Sabatini, D.M., 2010. Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* 141, 290–303.
- Sancak, Y., Peterson, T.R., Shaul, Y.D., Lindquist, R.A., Thoreen, C.C., Bar-Peled, L., Sabatini, D.M., 2008. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* 320, 1496–1501.
- Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Sengupta, S., Sheen, J.-H., Hsu, P.P., Bagley, A.F., Markhard, A.L., Sabatini, D.M., 2006. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol. Cell* 22, 159–168.
- Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., Sabatini, D.M., 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098–1101.
- Schuringa, J.J., Wierenga, A.T., Kruijer, W., Vellenga, E., 2000. Constitutive Stat3, Tyr705, and Ser727 phosphorylation in acute myeloid leukemia cells caused by the autocrine secretion of interleukin-6. *Blood* 95, 3765–3770.
- Seltzer, M.J., Bennett, B.D., Joshi, A.D., Gao, P., Thomas, A.G., Ferraris, D.V., Tsukamoto, T., Rojas, C.J., Slusher, B.S., Rabinowitz, J.D., Dang, C.V., Riggins, G.J., 2010. Inhibition of glutaminase preferentially slows growth of glioma cells with mutant IDH1. *Cancer Res.* 70, 8981–8987.
- Serra, V., Scaltriti, M., Prudkin, L., Eichhorn, P.J.A., Ibrahim, Y.H., Chandralapaty, S., Markman, B., Rodriguez, O., Guzman, M., Rodriguez, S., Gili, M., Russillo, M., Parra, J.L., Singh, S., Arribas, J., Rosen, N., Baselga, J., 2011. PI3K inhibition results in enhanced HER signaling and acquired ERK dependency in HER2-overexpressing breast cancer. *Oncogene* 30, 2547–2557.
- Settembre, C., Zoncu, R., Medina, D.L., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S., Huynh, T., Ferron, M., Karsenty, G., Vellard, M.C., Facchinetti, V., Sabatini, D.M., Ballabio, A., 2012. A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *EMBO J.* 31, 1095–1108.
- Sidoryk, M., Matyja, E., Dybel, A., Zielinska, M., Bogucki, J., Jaskólski, D.J., Liberski, P.P., Kowalczyk, P., Albrecht, J., 2004. Increased expression of a glutamine transporter SNAT3 is a marker of malignant gliomas. *Neuroreport* 15, 575–578.
- Sidoryk-Wegrzynowicz, M., Lee, E., Mingwei, N., Aschner, M., 2011. Disruption of astrocytic glutamine turnover by manganese is mediated by the protein kinase C pathway. *Glia* 59, 1732–1743.
- Smith, E.M., Finn, S.G., Tee, A.R., Browne, G.J., Proud, C.G., 2005. The tuberous sclerosis protein TSC2 is not required for the regulation of the mammalian target of rapamycin by amino acids and certain cellular stresses. *J. Biol. Chem.* 280, 18717–18727.
- Soliman, G.A., Acosta-Jaquez, H.A., Dunlop, E.A., Ekim, B., Maj, N.E., Tee, A.R., Fingar, D.C., 2010. mTOR Ser-2481 autophosphorylation monitors mTORC-specific catalytic activity and clarifies rapamycin mechanism of action. *J. Biol. Chem.* 285, 7866–7879.
- Spiers, A.S., Wade, H.E., 1976. Bacterial glutaminase in treatment of acute leukaemia. *Br Med J* 1, 1317–1319.
- Steensma, D.P., McClure, R.F., Karp, J.E., Tefferi, A., Lasho, T.L., Powell, H.L., DeWald, G.W., Kaufmann, S.H., 2006. JAK2 V617F is a rare finding in de novo acute myeloid leukemia, but STAT3 activation is common and remains unexplained. *Leukemia* 20, 971–978.
- Sujobert, P., Bardet, V., Cornillet-Lefebvre, P., Hayflick, J.S., Prie, N., Verdier, F., Vanhaesebroeck, B., Muller, O., Pesce, F., Ifrah, N., Hunault-Berger, M., Berthou, C., Villemagne, B., Jourdan, E., Audhuy, B., Solary, E., Witz, B., Harousseau, J.L., Himmerlin, C., Lamy, T., Lioure, B., Cahn, J.Y., Dreyfus, F., Mayeux, P., Lacombe, C., Bouscary, D., 2005. Essential role for the p110delta isoform in phosphoinositide 3-kinase activation and cell proliferation in acute myeloid leukemia. *Blood* 106, 1063–1066.
- Tamburini, J., Chapuis, N., Bardet, V., Park, S., Sujobert, P., Willems, L., Ifrah, N., Dreyfus, F., Mayeux, P., Lacombe, C., Bouscary, D., 2008. Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition activates

- phosphatidylinositol 3-kinase/Akt by up-regulating insulin-like growth factor-1 receptor signaling in acute myeloid leukemia: rationale for therapeutic inhibition of both pathways. *Blood* 111, 379–382.
- Tamburini, J., Elie, C., Bardet, V., Chapuis, N., Park, S., Broët, P., Cornillet-Lefebvre, P., Lioure, B., Ugo, V., Blanchet, O., Ifrah, N., Witz, F., Dreyfus, F., Mayeux, P., Lacombe, C., Bouscary, D., 2007. Constitutive phosphoinositide 3-kinase/Akt activation represents a favorable prognostic factor in de novo acute myelogenous leukemia patients. *Blood* 110, 1025–1028.
- Tamburini, J., Green, A.S., Bardet, V., Chapuis, N., Park, S., Willems, L., Uzunov, M., Ifrah, N., Dreyfus, F., Lacombe, C., Mayeux, P., Bouscary, D., 2009. Protein synthesis is resistant to rapamycin and constitutes a promising therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Blood* 114, 1618–1627.
- Tardito, S., Chiu, M., Uggeri, J., Zerbini, A., Da Ros, F., Dall'Asta, V., Missale, G., Bussolati, O., 2011. L-Asparaginase and inhibitors of glutamine synthetase disclose glutamine addiction of β -catenin-mutated human hepatocellular carcinoma cells. *Curr Cancer Drug Targets* 11, 929–943.
- Tato, I., Bartrons, R., Ventura, F., Rosa, J.L., 2011. Amino acids activate mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) via PI3K/Akt signaling. *J. Biol. Chem.* 286, 6128–6142.
- Thangavelu, K., Pan, C.Q., Karlberg, T., Balaji, G., Uttamchandani, M., Suresh, V., Schüler, H., Low, B.C., Sivaraman, J., 2012. Structural basis for the allosteric inhibitory mechanism of human kidney-type glutaminase (KGA) and its regulation by Raf-Mek-Erk signaling in cancer cell metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 7705–7710.
- Thoreen, C.C., Chantranupong, L., Keys, H.R., Wang, T., Gray, N.S., Sabatini, D.M., 2012. A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature* 485, 109–113.
- Tse, K.F., Mukherjee, G., Small, D., 2000. Constitutive activation of FLT3 stimulates multiple intracellular signal transducers and results in transformation. *Leukemia* 14, 1766–1776.
- Um, S.H., Frigerio, F., Watanabe, M., Picard, F., Joaquin, M., Sticker, M., Fumagalli, S., Allegrini, P.R., Kozma, S.C., Auwerx, J., Thomas, G., 2004. Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* 431, 200–205.
- Vassiliou, G.S., Cooper, J.L., Rad, R., Li, J., Rice, S., Uren, A., Rad, L., Ellis, P., Andrews, R., Banerjee, R., Grove, C., Wang, W., Liu, P., Wright, P., Arends, M., Bradley, A., 2011. Mutant nucleophosmin and cooperating pathways drive leukemia initiation and progression in mice. *Nat. Genet.* 43, 470–475.
- Wang, J.-B., Erickson, J.W., Fuji, R., Ramachandran, S., Gao, P., Dinavahi, R., Wilson, K.F., Ambrosio, A.L.B., Dias, S.M.G., Dang, C.V., Cerione, R.A., 2010. Targeting mitochondrial glutaminase activity inhibits oncogenic transformation. *Cancer Cell* 18, 207–219.
- Wang, X., Beugnet, A., Murakami, M., Yamanaka, S., Proud, C.G., 2005. Distinct signaling events downstream of mTOR cooperate to mediate the effects of amino acids and insulin on initiation factor 4E-binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* 25, 2558–2572.
- Wang, Y., Krivtsov, A.V., Sinha, A.U., North, T.E., Goessling, W., Feng, Z., Zon, L.I., Armstrong, S.A., 2010. The Wnt/ β -catenin pathway is required for the development of leukemia stem cells in AML. *Science* 327, 1650–1653.
- Ward, P.S., Thompson, C.B., 2012. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell* 21, 297–308.
- Warrell, R.P., Jr, Arlin, Z.A., Gee, T.S., Chou, T.C., Roberts, J., Young, C.W., 1982. Clinical evaluation of succinylated Acinetobacter glutaminase-asparaginase in adult leukemia. *Cancer Treat Rep* 66, 1479–1485.
- Warrell, R.P., Jr, Chou, T.C., Gordon, C., Tan, C., Roberts, J., Sternberg, S.S., Philips, F.S., Young, C.W., 1980. Phase I evaluation of succinylated Acinetobacter glutaminase-asparaginase in adults. *Cancer Res.* 40, 4546–4551.
- Wiemels, J.L., Xiao, Z., Buffler, P.A., Maia, A.T., Ma, X., Dicks, B.M., Smith, M.T., Zhang, L., Feusner, J., Wiencke, J., Pritchard-Jones, K., Kempfski, H., Greaves, M., 2002. In utero origin of t(8;21) AML1-ETO translocations in childhood acute myeloid leukemia. *Blood* 99, 3801–3805.
- Willer, A., Gerss, J., König, T., Franke, D., Kühnel, H.-J., Henze, G., von Stackelberg, A., Möricke, A., Schrappe, M., Boos, J., Lanvers-Kaminsky, C., 2011. Anti-Escherichia coli asparaginase antibody levels determine the activity of second-line treatment with pegylated E coli asparaginase: a retrospective analysis within the ALL-BFM trials. *Blood* 118, 5774–5782.
- Wise, D.R., DeBerardinis, R.J., Mancuso, A., Sayed, N., Zhang, X.-Y., Pfeiffer, H.K., Nissim, I., Daikhin, E., Yudkoff, M., McMahon, S.B., Thompson, C.B., 2008. Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 18782–18787.
- Wise, D.R., Thompson, C.B., 2010. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends Biochem. Sci.* 35, 427–433.
- Wise, D.R., Ward, P.S., Shay, J.E.S., Cross, J.R., Gruber, J.J., Sachdeva, U.M., Platt, J.M., DeMatteo, R.G., Simon, M.C., Thompson, C.B., 2011. Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent

- carboxylation of α -ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 19611–19616.
- Witte, D., Ali, N., Carlson, N., Younes, M., 2002. Overexpression of the neutral amino acid transporter ASCT2 in human colorectal adenocarcinoma. *Anticancer Res.* 22, 2555–2557.
- Wiza, C., Nascimento, E.B.M., Ouwens, D.M., 2012. Role of PRAS40 in Akt and mTOR signaling in health and disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012 Jun;302:E1453-60
- Xu, Q., Simpson, S.-E., Scialla, T.J., Bagg, A., Carroll, M., 2003. Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation. *Blood* 102, 972–980.
- Xu, Q., Thompson, J.E., Carroll, M., 2005. mTOR regulates cell survival after etoposide treatment in primary AML cells. *Blood* 106, 4261–4268.
- Xu, Z., Wang, M., Wang, L., Wang, Y., Zhao, X., Rao, Q., Wang, J., 2009. Aberrant expression of TSC2 gene in the newly diagnosed acute leukemia. *Leuk. Res.* 33, 891–897.
- Yamada, S., Hongo, T., Okada, S., Watanabe, C., Fujii, Y., Ohzeki, T., 2001. Clinical relevance of in vitro chemoresistance in childhood acute myeloid leukemia. *Leukemia* 15, 1892–1897.
- Yan, L., Mieulet, V., Burgess, D., Findlay, G.M., Sully, K., Procter, J., Goris, J., Janssens, V., Morrice, N.A., Lamb, R.F., 2010. PP2A T61 epsilon is an inhibitor of MAP4K3 in nutrient signaling to mTOR. *Mol. Cell* 37, 633–642.
- Yao, H., Ashihara, E., Maekawa, T., 2011. Targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in human cancers. *Expert Opin. Ther. Targets* 15, 873–887.
- Ye, J., Kumanova, M., Hart, L.S., Sloane, K., Zhang, H., De Panis, D.N., Bobrovnikova-Marjon, E., Diehl, J.A., Ron, D., Koumenis, C., 2010. The GCN2-ATF4 pathway is critical for tumour cell survival and proliferation in response to nutrient deprivation. *EMBO J.* 29, 2082–2096.
- Yilmaz, O.H., Valdez, R., Theisen, B.K., Guo, W., Ferguson, D.O., Wu, H., Morrison, S.J., 2006. Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells. *Nature* 441, 475–482.
- Yu, Y., Yoon, S.-O., Poulogiannis, G., Yang, Q., Ma, X.M., Villén, J., Kubica, N., Hoffman, G.R., Cantley, L.C., Gygi, S.P., Blenis, J., 2011. Phosphoproteomic analysis identifies Grb10 as an mTORC1 substrate that negatively regulates insulin signaling. *Science* 332, 1322–1326.
- Yuneva, M., Zamboni, N., Oefner, P., Sachidanandam, R., Lazebnik, Y., 2007. Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. *J. Cell Biol.* 178, 93–105.
- Yuneva, M.O., Fan, T.W.M., Allen, T.D., Higashi, R.M., Ferraris, D.V., Tsukamoto, T., Matés, J.M., Alonso, F.J., Wang, C., Seo, Y., Chen, X., Bishop, J.M., 2012. The metabolic profile of tumors depends on both the responsible genetic lesion and tissue type. *Cell Metab.* 15, 157–170.
- Zhang, P., Nelson, E., Radomska, H.S., Iwasaki-Arai, J., Akashi, K., Friedman, A.D., Tenen, D.G., 2002. Induction of granulocytic differentiation by 2 pathways. *Blood* 99, 4406–4412.
- Zhao, Y., Xiong, X., Sun, Y., 2011. DEPTOR, an mTOR inhibitor, is a physiological substrate of SCF(β TrCP) E3 ubiquitin ligase and regulates survival and autophagy. *Mol. Cell* 44, 304–316.
- Zheng, X., Oancea, C., Henschler, R., Ruthardt, M., 2009. Cooperation between constitutively activated c-Kit signaling and leukemogenic transcription factors in the determination of the leukemic phenotype in murine hematopoietic stem cells. *Int. J. Oncol.* 34, 1521–1531.
- Zinzalla, V., Stracka, D., Oppliger, W., Hall, M.N., 2011. Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell* 144, 757–768.
- Zoncu, R., Bar-Peled, L., Efeyan, A., Wang, S., Sancak, Y., Sabatini, D.M., 2011. mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase. *Science* 334, 678–683.
- Zwaan, C.M., Kaspers, G.J., Pieters, R., Ramakers-Van Woerden, N.L., den Boer, M.L., Wünsche, R., Rottier, M.M., Hähnen, K., van Wering, E.R., Janka-Schaub, G.E., Creutzig, U., Veerman, A.J., 2000. Cellular drug resistance profiles in childhood acute myeloid leukemia: differences between FAB types and comparison with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 96, 2879–2886.