



# Ciblage thérapeutique d'AMPK dans les leucémies aiguës myéloïdes

Pierre Sujobert

► **To cite this version:**

Pierre Sujobert. Ciblage thérapeutique d'AMPK dans les leucémies aiguës myéloïdes. Hématologie. Université René Descartes - Paris V, 2014. Français. <NNT : 2014PA05S017>. <tel-01223107>

**HAL Id: tel-01223107**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01223107>**

Submitted on 2 Nov 2015

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

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

**UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES (PARIS 5)**

**ECOLE DOCTORALE « BIOLOGIE ET BIOTECHNOLOGIES » (B2T)**

**DOCTORAT**

**Hématologie et Oncologie**

**PIERRE SUJOBERT**

**CIBLAGE THÉRAPEUTIQUE D'AMPK DANS  
LES LEUCÉMIES AIGUËS MYÉLOÏDES**

**THÈSE DIRIGÉE PAR M. JEROME TAMBURINI**

**SOUTENUE LE 20 NOVEMBRE 2014**

**JURY :**

M. JEAN SOULIER	PRÉSIDENT
M. JEROME TAMBURINI	DIRECTEUR
M. PATRICK AUBERGER	RAPPORTEUR
M. FRÉDÉRIC BOST	RAPPORTEUR
M. PATRICE DUBREUIL	EXAMINATEUR
M. MARIO PENDE	EXAMINATEUR

## REMERCIEMENTS

Ces trois années de thèse furent trois années heureuses. J'ai eu la chance de connaître les différentes étapes d'un travail de recherche, en particulier celle où l'on ne comprend plus rien et où il faut essayer d'être créatif pour proposer de nouvelles hypothèses, et celle où le brouillard se dissipe. Même si le but le plus facilement avouable de la recherche biomédicale est le progrès technologique et médical, je confesserai ici que ma motivation fut plutôt liée à l'excitation intellectuelle de la phase spéculative, au plaisir de la découverte, et à une certaine beauté du résultat scientifique, qui font vite oublier les moments pourtant nombreux et récurrents de déception et d'échec. Je voudrais ici remercier les nombreuses fées qui se sont penchées sur mon berceau de scientifique :

En premier lieu Jérôme Tamburini, qui a dirigé ce travail. Vu tes qualités scientifiques et tes capacités de travail, j'avais un peu d'appréhension à faire ma thèse avec toi : je voudrais te remercier vivement pour l'enthousiasme partagé, ton scepticisme quand je m'emballais trop vite, et ton optimisme quand mon moral déclinait après un énième blot raté... Je me suis senti à la fois libre et encadré, un grand merci. Je remercie également tout particulièrement Didier Bouscary, qui a accepté de m'encadrer en DEA, m'a fait découvrir et m'a appris la recherche, l'hématologie, et beaucoup d'autres choses : tu sais le respect et l'admiration que j'ai pour toi.

Mireille Lambert, qui m'a (entre autre) tout appris de la biologie moléculaire, que j'ai interrompue un nombre incalculable de fois pour lui montrer un gel, lui faire part de ma dernière hypothèse tordue, ou du papier « incroyable » que je venais de voir passer. J'ai eu beaucoup de bonheur à travailler avec toi, et j'espère que ta paillasse me pardonnera mes difficultés à ranger...

Laury Poulain, Marie-Anne Hospital, Nathalie Jacque, Lise Willems, Alexa Green, Anne Marie Ronchetti, Kevin Adam, Stéphanie Mathis, Nicolas Chapuis : la fameuse équipe LAM. Ce travail n'aurait pas existé sans vous, vos hypothèses, vos critiques, vos outils, votre aide. J'espère que l'ambiance continuera d'être aussi agréable dans les 3 m<sup>2</sup> de bureau que nous avons partagé ! Dans cette équipe LAM, un mot spécial pour Adrien Grenier, qui a effectué son M2 avec moi : j'espère t'avoir transmis un peu de mon plaisir à faire de la recherche, et que tu reviendras faire une thèse... Et également un « takk » à Ina Nepstad, l'étudiante venue du Nord, qui a participé à mon projet pendant quelques semaines...

Je voudrai exprimer ma gratitude et mon amitié à Ivan Cruz Moura, ainsi qu'aux membres de son équipe avec lesquels nous avons travaillé dans une ambiance très amicale: Etienne Paubelle, Florence Zylbersztejn, Justine Decroocq.

Patrick Mayeux, Catherine Lacombe, Sylvie Gisselbrecht, Odile Müller, Frédérique Verdier, Lamya Haddaoui, Françoise Porteu, Isabelle Dusanter, Valérie Bardet, Michaela Fontenay, qui m'ont vu arriver au labo « petit Pierre » en 2002, et revenir « grand Pierre » en 2011. Tout cela aurait été différent si Raphaël Itzykson ne m'avait pas conseillé de faire mon DEA dans l'équipe de Sylvie Gisselbrecht : n'hésite pas à me donner d'autre bonnes idées !

Merci aussi aux autres chercheurs (statutaires ou précaires, encore là ou déjà partis) du labo, avec lesquels nous avons eu des débats de midi enflammés et de grandes discussions scientifiques dans les couloirs : la petite et la grande sous-unité du ribosome (Anna Raimbault et Célia Floquet), Elsa Lestang, Frédéric Pendino, Audrey Astori, Yaël Zermati, Emilie-Fleur Gautier, Pierre Montanari, Bérengère de Laval, Caroline Delette, Olivier Kosmider, et al (comme on dit)

L'univers cochinois d'AMPK et du métabolisme mérite d'être connu : j'ai eu la chance de rencontrer Benoit Viollet et Marc Foretz, qui m'ont beaucoup aidé (et impressionné), Christine Perret, Carina Prip-Buus, Anne Françoise Burnol, Frédéric Bouillaud, Céline Ransy, avec lesquels j'ai beaucoup appris dans des collaborations ponctuelles très sympathiques. J'en profite pour remercier d'autres précieux collègues de l'Institut Cochin : Franck Letourneur, Florent Dumont, Karine Labroquère, Emmanuelle Maillard, Alain Schmitt...

Je remercie le laboratoire GlaxoSmithKline, et en particulier Jean-Marie Brusq et Edwige Nicodeme, qui ont eu la bonne idée de nous proposer de tester leur composé dans les leucémies.

Sans franchir la ligne rouge de l'intimité, un grand merci à mes parents qui ont été (entre autre) plus que présents pour nos filles, quand le Papa les délaissait pour ses boîtes de Pétri, à Jeanne et Ophélie, qui ont vaillamment supporté mes quelques passages au labo le week-end, parfois en m'accompagnant, et bien sûr à Julie Noirot, pour tout ce que tu es.

Et une grande pensée pour Camille Sujobert.

## RESUME

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) représentent un groupe d'hémopathies malignes agressives, de pronostic sombre en dépit des traitements intensifs actuellement proposés. Malgré une grande hétérogénéité clinique et moléculaire, les cellules de LAM sont caractérisées par l'activation de voies de signalisation essentielles à leur prolifération et leur survie, comme par exemple celle du complexe mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1). Cependant, l'utilisation clinique d'inhibiteurs tels que la rapamycine ou des inhibiteurs catalytiques s'est avérée décevante, ce qui suggère qu'il n'y a pas d'addiction oncogénique à mTORC1 dans les LAM. Au cours de ce travail, nous avons démontré que l'activation de mTORC1 est au contraire une condition nécessaire à l'induction de la mort cellulaire en réponse à l'activation d'AMPK (AMP-activated protein kinase), établissant une relation de létalité synthétique entre ces deux voies.

Pour cela, nous avons utilisé un nouveau composé activateur spécifique d'AMPK, le GSK621. En invalidant la sous-unité catalytique AMPK $\alpha$ 1 par ARN interférence ou par le système CRISPR/Cas9, nous avons démontré que les effets antileucémiques de ce composé sont bien dépendants de l'activation d'AMPK. Nous avons observé que ce composé favorise l'autophagie, et que ce processus est impliqué dans la mort des cellules leucémiques puisque l'inhibition des protéines ATG5 ou ATG7 a un effet protecteur sur les cellules leucémiques. Les effets antileucémiques du composé GSK621 ont été confirmés sur des cellules primaires, ainsi que sur un panel de vingt lignées de LAM, et dans un modèle murin de xéno greffe. De façon intéressante, l'activation d'AMPK pourrait également compromettre la survie des cellules souches leucémiques, comme en atteste l'atténuation du potentiel clonogénique en méthylcellulose de cellules murines transformées par MLL-ENL ou FLT3-ITD.

Nous avons observé que le composé GSK 621 n'avait pas de toxicité envers les progéniteurs hématopoïétiques normaux, ouvrant ainsi une fenêtre thérapeutique intéressante. Comme l'activation d'AMPK conduit dans de nombreux modèles cellulaires à l'inhibition de mTORC1, et comme l'activation de mTORC1 est observée dans les cellules de LAM mais pas dans les progéniteurs hématopoïétiques normaux, nous avons proposé l'hypothèse que le niveau d'activation de mTORC1 déterminait les effets de l'activateur d'AMPK. Pour cela, nous avons inhibé mTORC1 dans les cellules leucémiques d'une part, et activé mTORC1 dans les progéniteurs normaux d'autre part. De façon inattendue, mTORC1 échappe au contrôle d'AMPK dans les LAM, et nous avons observé que l'activation de mTORC1 est une condition nécessaire et suffisante pour que le composé GSK621 entraîne la mort des cellules. Le substrat moléculaire de cette létalité synthétique est le facteur de transcription proapoptotique ATF4, dont la transcription est favorisée par mTORC1, et la traduction par AMPK via la phosphorylation d'eIF2A.

Ces travaux proposent donc que malgré l'absence d'addiction oncogénique, l'activation de mTORC1 dans les LAM représente une opportunité thérapeutique originale via une relation de létalité synthétique avec l'activation d'AMPK. Ils constituent un rationnel au développement clinique d'activateurs d'AMPK dans les LAM, voire dans d'autres cancers ayant une activation constitutive de mTORC1.

## ABSTRACT

Acute myeloid leukemia (AML) is a heterogeneous disease with poor prognosis despite intensive treatments. Virtually all recurrent molecular alterations in AML functionally converge to cause signal transduction pathway dysregulation that drives cellular proliferation and survival. The mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) is a rapamycin-sensitive signaling node defined by the interaction between mTOR and raptor. Constitutive mTORC1 activity is nearly universal in AML. However, pharmacologic inhibition with rapamycin or second-generation mTOR kinase inhibitors has shown limited anti-leukemic activity in both preclinical models as well as in clinical trials, suggesting that addiction to this oncogene is not a recurrent event in AML. Here we report that sustained mTORC1 activity is nonetheless essential for the cytotoxicity induced by pharmacologic activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) in AML.

Our studies employed a novel AMPK activator called GSK621. Using CRISPR/Cas9 and shRNA-mediated silencing of the AMPK $\alpha$ 1 catalytic subunit, we showed that AMPK activity was necessary for the anti-leukemic response induced by this agent. GSK621-induced AMPK activation precipitated autophagy, and blocking autophagy via shRNA-mediated knockdown of ATG5 or ATG7 protected AML cells from cytotoxicity resulting from treatment with GSK621, suggesting that autophagy promotes cell death in the context of active AMPK. GSK621 cytotoxicity was consistently observed across twenty different AML cell lines, primary AML patient samples and AML xenografts *in vivo*. GSK621-induced AMPK activation also impaired the self-renewal capacity of MLL-ENL- and FLT3-ITD-induced murine leukemias as measured by serial methylcellulose replating assays.

Strikingly, GSK621 did not induce cytotoxicity in normal CD34+ hematopoietic progenitor cells. We hypothesized that the differential sensitivity to GSK621 could be due to the difference in amplitude of mTORC1 activation between AML and normal CD34+ cells. In contrast to most reported cellular models in which AMPK inhibits mTORC1, sustained mTORC1 activity was seen following GSK621-induced AMPK activation in AML. Inhibition of mTORC1 either pharmacologically (using rapamycin) or genetically (using shRNAs targeting raptor and mTOR) abrogated AMPK-induced cytotoxicity in AML cells, including primary AML patient samples. The same synthetic lethality could be recapitulated in normal CD34+ progenitors by constitutive activation of mTORC1 using a lentivirally-transduced myrAKT construct. We further observed that the level of ATF4 protein is under a transcriptional control by mTORC1 and a translational control by AMPK (through eIF2A), and explains the synthetic lethal relationship between AMPK and mTORC1

Taken together, these data show that the magnitude of mTORC1 activity determines the degree of cytotoxicity triggered by AMPK activation. Our results therefore support AMPK activation as a promising therapeutic strategy in AML and other mTORC1-active malignancies which warrants further investigations in clinical trials.

# SOMMAIRE

<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS .....</b>	<b>7</b>
<b>TABLE DES ABBREVIATIONS .....</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>13</b>
<b>LES LEUCEMIES AIGUËS MYELOIDES : DONNEES PHYSIOPATHOLOGIQUES .....</b>	<b>15</b>
<b>Aspects cliniques .....</b>	<b>15</b>
<b>Physiopathologie .....</b>	<b>22</b>
<b>Dérégulation métabolique et dérégulation des voies de signalisation dans les leucémies : perspectives thérapeutiques.....</b>	<b>29</b>
<b>LES VOIES mTORC1, AMPK ET LA VOIE DE REPONSE INTEGREE AU STRESS : INTEGRATEURS DU METABOLISME CELLULAIRE .....</b>	<b>38</b>
<b>La voie mTORC1 .....</b>	<b>39</b>
<b>La voie AMPK.....</b>	<b>56</b>
<b>La voie de réponse intégrée au stress .....</b>	<b>75</b>
<b>Relations entre les voies mTORC1, AMPK ET ISR .....</b>	<b>87</b>
<b>L'autophagie.....</b>	<b>92</b>
<b>OBJECTIFS DE LA THESE.....</b>	<b>101</b>
<b>RESULTATS .....</b>	<b>102</b>
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>151</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>158</b>
<b>TABLE DES MATIERES.....</b>	<b>186</b>

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

<i>Figure 1. Epidémiologie des LAM .....</i>	<i>16</i>
<i>Figure 2. Classification pronostique cytogénétique et moléculaire des LAM.....</i>	<i>20</i>
<i>Figure 3. Le modèle de leucémogénèse à deux classes de mutations et ses limites .....</i>	<i>24</i>
<i>Figure 4. Effet Warburg et voie PI3K/Akt comme exemple des interrelations fortes entre signalisation et métabolisme.....</i>	<i>32</i>
<i>Figure 5. Modèles théoriques expliquant la spécificité d'effet des thérapies ciblées en oncologie .....</i>	<i>37</i>
<i>Figure 6. Activation de mTORC1 par les voies de signalisation oncogéniques.....</i>	<i>41</i>
<i>Figure 7. Régulation de mTORC1 par les acides aminés. ....</i>	<i>44</i>
<i>Figure 8. Régulation de mTORC1 par la disponibilité en glucose. ....</i>	<i>46</i>
<i>Figure 9. Conséquences de l'activation de mTORC1.....</i>	<i>48</i>
<i>Figure 10. Contrôle de la traduction protéique par mTORC1.....</i>	<i>50</i>
<i>Figure 11. Activation de l'AMPK en conditions de stress énergétique.....</i>	<i>59</i>
<i>Figure 12. Mécanisme d'action des activateurs pharmacologiques d'AMPK.....</i>	<i>66</i>
<i>Figure 13. Conséquences de l'activation d'AMPK. ....</i>	<i>71</i>
<i>Figure 14. La voie de réponse intégrée au stress.....</i>	<i>76</i>
<i>Figure 15. Contrôle de l'initiation de la traduction par eIF2A. ....</i>	<i>81</i>
<i>Figure 16. Mécanismes moléculaires expliquant l'augmentation de la traduction de certains ARNm en cas de phosphorylation d'eIF2A.....</i>	<i>83</i>
<i>Figure 17. Relations entre les voies mTORC1, ISR et AMPK.....</i>	<i>91</i>
<i>Figure 18. Description moléculaire de la voie canonique de l'autophagie.....</i>	<i>96</i>
<i>Figure 19. PERK est une cible d'AMPK impliquée dans les effets cytotoxiques du GSK621. ....</i>	<i>149</i>

## TABLE DES ABBREVIATIONS

ABL	Abelson tyrosine kinase
ACC	acétyl CoA carboxylase
ADN	acide déoxyribonucléique
ADP	adénosine diphosphate
AICAR	aminoimidazole carboxamide ribonucleotide
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
Akt	V-Akt murine thymoma viral oncogene homolog
AMBRA1	activating molecule in beclin 1 related autophagy 1
AMP	adénosine monophosphate
AMPK	AMP activated protein kinase
ARK	AMPK related kinases
ASXL1	additional sex combs-like protein 1
ATF4	activating transcription factor 4
ATF6	activating transcription factor 6
ATG	autophagy related
ATP	adénosine triphosphate
ATR	ataxia telangiectasia and Rad3-related
BCL2	B cell lymphoma 2
BCR	breakpoint cluster region
BRCA1/2	breast cancer 1/2
BRSK	brain specific kinase
CAD	carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamoylase, dihydroorotase
CaMKK $\beta$	calcium/calmodulin dependent protein kinase kinase $\beta$
CAR	récepteurs antigéniques chimériques
CAS 9	CRISPR associated protein 9
CBF	core binding factor
CBM	carbohydrate binding module
CBS	cystathionin- $\beta$ -synthase
CD	cluster of differentiation
C/EBP $\alpha$	CAAT/enhancer bonding protein $\alpha$
C/EBP $\delta$	CAAT/enhancer bonding protein $\delta$
CHOP	C/EBP homologous protein
ChREBP	carbohydrate responsive element binding protein
c-MYC	v-Myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
CreP	constitutive repressor of eIF2A phosphorylation
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
CRTC2	CREB-regulated transcription coactivator-2
CSL	cellule souche leucémique
DAPK	death associated protein kinase
DAPI	death associated protein 1
2DG	2 déoxyglucose
DEPDC5	DEP domain-containing 5
Deptor	DEP domain containing mTOR interacting protein

DNAPK	DNA-dependent protein kinase
DNMT3A	DNA (cytosine-5)-methyl transférase 3 $\alpha$
4EBP1	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1
eEF	eukaryotic elongation factor
eIF	eukaryotic initiation factor
eIF2AK	eIF2A kinase
ERAD	endoplasmic reticulum associated degradation
ERO1 $\alpha$	endoplasmic reticulum oxydase 1 $\alpha$
ERK	extracellular signal regulated kinase
EVI 1	ecotropic viral integration site 1
EZH2	enhancer of zeste homolog 2
F	phénylalanine
FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1
FIP200	focal adhesion kinase family interacting protein of 200kDa
FKBP12	12kDa FK506-binding protein
FLT3	Fms-like tyrosine kinase 3
FLT3-ITD	FLT3 – internal tandem duplication
FOXO 3A	forkhead box O3 A
FRB	FKBP rapamycin binding
GADD34	growth arrest and DNA damage-inducible protein 34
GAP	GTPase Activating protein
GATOR 1	GTPase activity toward rag
GCN2	general control non derepressible 2
GEF	guanosine nucleotid exchange factor
G6PD	glucose 6 phosphate deshydrogénase
GSK3 $\beta$	glycogen synthase kinase 3 $\beta$
GDP	guanosine diphosphate
GLUT1	glucose transporter 1
GRP78	78 kDa glucose regulated protein
GRP 94	94 kDa glucose regulated protein
GTP	guanosine triphosphate
H	histidine
HDAC	histone déacétylase
HEK	human embryonic kidney
HIF1 $\alpha$	hypoxia inducible factor 1 $\alpha$
HLA	human leucocyte antigen
HMGR	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coA reductase
HRAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
HRI	heme-regulated eIF2A kinase
HSF1	heat-shock factor 1
I	isoleucine
IDH	isocitrate déhydrogénase
IGF1	insulin growth factor 1
IGF1R	insulin growth factor 1 receptor
I $\kappa$ B	inhibitor of Nf $\kappa$ B
IKK	I $\kappa$ B kinase
IRE1	inositol requiring enzyme 1

IRS1	insulin receptor substrate 1
ISR	integrated stress response (voie de réponse intégrée au stress)
JNK	c-JUN N-terminal kinase
K	lysine
KEAP1	Kelch like-ECH-associated protein 1
KIT	v- <i>kit</i> Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
KRAS	kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
L	leucine
LAM	leucémies aiguës myéloïdes
LAMTOR	late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and mTOR activator
LC3	microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
LDHA	lactate deshydrogénase A
LKB1	liver kinase B1
LMC	leucémie myéloïde chronique
M	methionine
MARK	microtubule associated protein regulating kinase
MEF	mouse embryonic fibroblast
MELK	maternal embryonic leucine zipper kinase
MLL	mixed lineage leukemia
MLL-PTD	MLL-partial tandem duplication
mLST8	mammalian lethal with sec-13 protein 8
MO25	mouse protéine 25
mSin1	mammalian stress activated map kinase-interacting protein 1
mTORC1	mammalian target of rapamycin complex 1
mTORC2	mammalian target of rapamycin complex 2
myr-Akt	myristoylated Akt
N	alanine
NAD	nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NBR1	neighbour of BRCA1 gene 1
NFkB	nuclear factor-kappa B
NGS	next generation sequencing (séquençage de nouvelle génération)
NPM1	nucleophosmin 1
NPRL2	nitrogen permease regulator-like 2
NPRL3	nitrogen permease regulator-like 3
NRAS	neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
NRF2	nuclear factor erythroid 2 [NF-E2]-related factor 2
NUP98	nucleoporin 98 kDa
OCT	organic transporter cation
OMS	organisation mondiale de la santé
ORF	open reading frame (cadre ouvert de lecture)
PAK2	p21 activated protein kinase
PARP	poly-ADP ribose polymérase
PEP	phosphoenolpyruvate
PERK	PKR-like endoplasmic reticulum kinase ou pancreatic eIF2A kinase

PGC1 $\alpha$	PPAR- $\gamma$ coactivator 1 $\alpha$
PHF6	PHD finger protein 6
PI3K	phosphatidylinositol-3-kinase
PIM 2	proviral integration in murine lymphomas 2
PKR	protein kinase R
PLK1	polo-like kinase 1
PPAR- $\gamma$	peroxisome proliferator-activated receptor
PRAS 40	proline-rich Akt substrate 40 kDa
PROTOR	protein observed with rictor
PP1R12C	protein phosphatase 1 regulatory subunit 12C
PTEN	phosphatase and tensin homolog
Q	glutamine
R	arginine
RAPTOR	regulatory associated prote in of mammalian target of rapamycin
REDD1	regulated in development and DNA damage 1
RIDD	regulated IRE1-dependent decay
RHEB	ras homology enriched in brain
RICTOR	rapamycin insensitive companion of mTOR
ROS	reactive oxygen species (espèces réactives de l'oxygène)
RSK1	ribosomal S6 Kinase 1
RUNX1	runt-related rranscription ractor
S	sérine
SBDS	Schwachman Bodian Diamond syndrome
SGK1	serum and glucocorticoid induced protein kinase 1
SIK	salt inducible kinase
siRNA	small interfering RNA
SMP	syndrome myéloprolifératif
SREBP 1c	sterol responsive element binding protein 1c
STRAD	STE20-related adaptor
T	thréonine
TAK1	TGF $\beta$ activated kinase
TEL2	telomere maintenance 2
TET 2	Tet methylcytosine déoxygénase 2
5' TOP	5' terminal oligopyrimidin
TOR	target of rapamycin
TRAIL	tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand
TRB3	tribbles homolog 3
TRIM24	tripartite motif-containing 24
TSC1	tuberous sclerosis 1 (hamartin)
TSC2	tuberous sclerosis 2 (tuberin)
TTI1	TELO2 interacting protein 1
ULK1	unc-51-like kinase
UPR	unfolded protein response
UV	ultraviolets
UVRAG	ultraviolet irradiation resistance associated gene
V	valine

v-ATPase	vacuolar H <sup>+</sup> -adenoside triphosphatase ATPase
VEGF	vascular endothelial growth factor
WIPI	WD repeat domain phosphoinositide interacting
WT1	Wilms tumor 1
XBP-1	X-box binding protein 1
YY1	Ying Yang 1

## INTRODUCTION

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) représentent un groupe hétérogène de cancers développés à partir des cellules souches hématopoïétiques ou de progéniteurs myéloïdes précoces. Des progrès notables ont été effectués dans la compréhension de cette pathologie, conduisant à des avancées conceptuelles générales en oncologie, comme le concept de cellule souche cancéreuse, celui d'architecture clonale des cancers, ou celui de maladie résiduelle. Cependant, ces avancées fondamentales n'ont pas permis de réels progrès thérapeutiques depuis l'invention de la chimiothérapie, à l'exception notable de la découverte des agents différenciant (acide tout trans rétinoïque, arsenic) dans la leucémie aiguë promyélocytaire.

L'hématologie a également fourni avec l'imatinib dans la leucémie myéloïde chronique l'exemple le plus réjouissant du potentiel thérapeutique des traitements ciblés. Mon laboratoire d'accueil travaille depuis une dizaine d'années à l'identification de voies de signalisation activées dans les LAM, qui pourraient constituer de nouvelles cibles thérapeutiques. Ces travaux ont permis notamment de démontrer l'activation constitutive des voies de signalisation phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) et mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) dans les blastes de LAM, et d'apporter les arguments précliniques pour le développement d'inhibiteurs de ces deux voies. En particulier, Alexa Green a montré au cours de son travail de thèse dans cette équipe le potentiel thérapeutique de la metformine, un antidiabétique oral de la classe des biguanides largement prescrit aux patients diabétiques de type II, via l'activation indirecte de l'AMPK, complexe hétéro-trimérique dont le rôle essentiel dans la régulation du métabolisme cellulaire sera détaillé plus loin.

Mon travail de thèse a consisté à étudier un nouvel activateur direct de l'AMPK, le composé GSK621, dans les leucémies aiguës myéloïdes. Au-delà de la démonstration du potentiel anti-leucémique de cet activateur direct d'AMPK, l'étude de son mécanisme d'action a révélé une relation de létalité synthétique entre l'activation d'AMPK et l'activation de mTORC1. En effet, l'activation de ces deux voies – constitutive pour mTORC1 et à l'aide d'un agent pharmacologique dans le cas de l'AMPK – permet de conduire les cellules leucémiques vers une mort cellulaire impliquant des phénomènes d'autophagie et d'apoptose. Ce phénomène de létalité synthétique explique la spécificité des effets pro-apoptotiques du composé GSK621 sur les cellules leucémiques par rapport aux cellules souches hématopoïétiques normales. Ces résultats sont à l'opposé du modèle couramment admis d'addiction oncogénique à la voie de

signalisation mTORC1 dans les cancers, ce qui permet de comprendre en partie l'efficacité limitée des thérapies ciblant ce complexe (rapamycine et dérivés) en particulier chez les patients atteints de LAM. De plus, ces données suggèrent une nouvelle opportunité thérapeutique pour les agonistes de l'AMPK dans les cas de cancers ayant un niveau d'activation constitutive de mTORC1 élevé.

Après avoir rappelé l'état des connaissances épidémiologiques, cliniques et physiopathologiques sur les LAM et exposé le cadre conceptuel actuel des thérapies ciblées, je présenterai les principales voies de signalisation impliquées dans la réponse au composé GSK621 (mTORC1, AMPK et la voie de réponse intégrée au stress), ainsi que leurs relations d'interdépendance. Je développerai également les connaissances actuelles sur le processus d'autophagie, qui est régulé par ces trois voies et qui conditionne la mort cellulaire en aval de l'activation de l'AMPK dans les LAM.

# LES LEUCEMIES AIGUËS MYELOIDES : DONNEES PHYSIOPATHOLOGIQUES

## Aspects cliniques

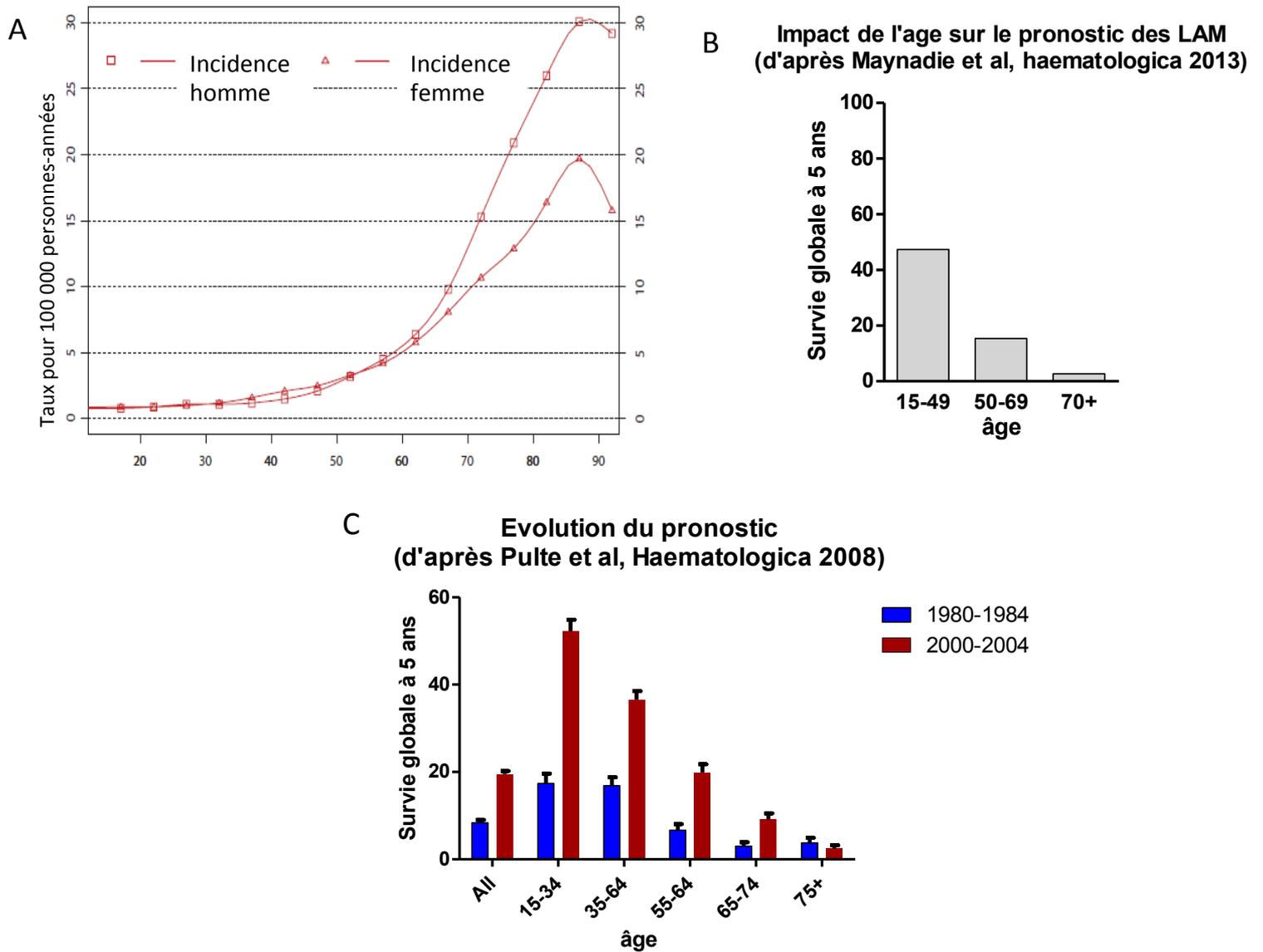
### *Epidémiologie*

Les leucémies aiguës myéloïdes sont actuellement définies par la présence de plus de 20% de cellules myéloïdes immatures bloquées dans leur différenciation (appelées blastes) dans la moelle osseuse ou dans le sang. Cette maladie se manifeste en général par des symptômes liés aux cytopénies (thrombopénie, anémie, neutropénie) en rapport avec un blocage de l'hématopoïèse normale.

Il s'agit d'une maladie rare (3.9 cas pour 100 000 habitants chez les hommes, 3.35 cas pour 100 000 habitants chez les femmes) avec une légère prédominance des cas chez les hommes (sexe ratio 1.1) (Troussard et al., 2009) (figure 1A), et qui touche essentiellement les sujets âgés (âge médian au diagnostic de 71 ans). L'incidence est relativement stable malgré le vieillissement de la population et un changement dans la définition de la maladie dans la classification OMS à partir de l'an 2000 (abaissement du taux de blastes de 30 à 20%).

Le pronostic des patients atteints de LAM est sombre, puisqu'il a été estimé que la survie à 5 ans était d'environ 17% dans une étude européenne portant sur la période 2000-2002 (Maynadié et al., 2013), avec cependant de grandes disparités selon les âges. Ainsi, cette étude montrait que la survie à 5 ans des patients les plus jeunes (15-49 ans) atteignait 47%, alors qu'elle n'était que de 15% chez les 50-69 ans, et de 2.7% chez les plus de 70 ans (figure 1B).

De plus, alors que le pronostic des patients les plus jeunes s'est largement amélioré entre les années 80 et les années 2000, cette tendance est moins nette pour les patients de plus de 65 ans, qui constituent la majorité des cas (Pulte et al., 2008) (figure 1C). Comparée aux autres hémopathies malignes, la LAM est l'une des maladies où les progrès ont été les plus discrets durant la dernière décennie (Sant et al., 2014).



**Figure 1. Epidémiologie des LAM**

A : incidence des LAM selon l'âge (données du registre de Basse Normandie). B : Disparités du pronostic selon l'âge au diagnostic. C : Evolution du pronostic par classe d'âge entre les périodes 1980-1984 et 2000-2004.

## ***Classifications et éléments du pronostic***

La classification actuelle a été proposée par l'OMS en 2008. Elle repose :

- sur les caractéristiques cliniques de la maladie : maladie survenant *de novo*, ou secondairement à un syndrome myélodysplasique ou à une exposition à la chimiothérapie,
- sur la présence d'anomalies cytogénétiques récurrentes
- et en l'absence de particularités cliniques ou cytogénétiques sur l'aspect cytologique des blastes.

Trois entités sont également intégrées aux LAM dans cette classification : les sarcomes granulocytaires, les proliférations associées à la trisomie 21, et les proliférations à cellules dendritiques plasmacytoïdes blastiques (Vardiman et al., 2009).

D'un point de vue pratique, l'évaluation du pronostic d'un patient atteint de LAM repose sur des critères liés au patient d'une part, et liés aux caractéristiques de sa maladie d'autre part :

- caractéristiques liées au patient :

Comme nous l'avons décrit plus haut, l'âge au diagnostic est un facteur pronostique majeur des leucémies aiguës myéloïdes. Cependant, plusieurs facteurs peuvent expliquer le rôle pronostique de l'âge, comme par exemple l'état général, et donc la capacité à supporter des traitements intensifs, ou les caractéristiques biologiques des LAM. Un autre facteur explicatif intéressant est l'attitude des médecins qui craignent probablement de prescrire une chimiothérapie intensive aux patients âgés. Cette attitude devrait s'amender, puisqu'il a été démontré dans une étude de registre suédoise que le recours aux traitements intensifs diminue la mortalité précoce chez les sujets âgés. Comme celle-ci reflète généralement la toxicité des traitements et non l'évolution de la maladie, ces données suggèrent que l'utilisation de thérapies intensives est actuellement une option sûre chez des sujets âgés sous réserve bien entendu d'une évaluation rigoureuse de leur état général (Juliusson et al., 2009).

Plus que l'âge, c'est probablement l'état général du patient qui permet de prédire la tolérance des traitements intensifs. Cette dimension subjective et multifactorielle a pu être mesurée par des scores composites, comme l'« hematopoietic cell transplantation comorbidity score »,

dont il a été montré qu'il pouvait prédire la mortalité toxique des patients de plus de 60 ans atteints de LAM et traités par chimiothérapie intensive (Giles et al., 2007).

- caractéristiques liées à la maladie

En dehors de l'hyperleucocytose ( $> 50.10^9/l$ ) ou la coagulation intravasculaire disséminée, connues depuis longtemps comme étant des facteurs de mauvais pronostic, d'autres caractéristiques biologiques des LAM doivent être précisées pour affiner le pronostic.

Ainsi, l'étude cytogénétique a un impact majeur sur la réponse au traitement et la survie, et représente la première étape de détermination du pronostic. La classification du MRC (medical research council) retient trois grandes catégories pronostiques cytogénétiques définies à partir de l'étude standard du caryotype des cellules leucémiques :

- les anomalies de pronostic favorable (environ 20% des cas) : t (15;17) de la leucémie aigüe promyélocytaire, et anomalies impliquant le core binding factor (CBF) : t (8;21) et inv (16).
- Les anomalies de pronostic défavorable (environ 30% des cas) : caryotypes complexes (définis par plus de trois anomalies pour certains groupes coopératifs (CALGB, SWOG) ou plus de quatre anomalies pour le MRC), monosomie du chromosome 5 ou 7, anomalies impliquant *MLL* en 11q23 [à l'exception de la t(9;11)], et anomalies impliquant *EVII* en 3q26. Il est probable que les caryotypes dits « monosomiques » (définis par la présence d'une monosomie sur un autosome associée à une autre anomalie) rejoindront cette catégorie dans les prochaines classifications (Breems et al., 2008).
- Les anomalies de pronostic intermédiaire (environ 50% des cas) : caryotype normal , et anomalies ne faisant pas partie des deux premières catégories.

Cette classification cytogénétique a pu être précisée grâce à la biologie moléculaire. En effet, un certain nombre de mutations récurrentes ont été identifiées dans les LAM, et des études souvent rétrospectives ont permis d'attribuer à certaines une valeur pronostique robuste. En pratique courante, les patients porteurs d'une LAM à caryotype normal sont donc classifiés de manière schématique selon la présence de trois anomalies moléculaires : duplication en

tandem de Fms-like tyrosine kinase 3 (*FLT3*) (environ 30% des patients, anomalie de mauvais pronostic), mutation du gène codant la nucleophosmin (*NPM1*) (environ 30 % des patients à caryotype normal, anomalie de bon pronostic) et mutations homozygotes de CAAT/enhancer binding protein  $\alpha$  (*CEBP $\alpha$* ) (environ 10 % des patients, anomalie de bon pronostic) (Schlenk et al., 2008; Shen et al., 2011).

Au-delà des anomalies de ces trois gènes, de nombreux autres évènements moléculaires récurrents plus rares ont été mis en évidence grâce aux techniques de séquençage de nouvelle génération (NGS). Cependant, l'attribution d'une valeur pronostique à ces évènements rares nécessite des études prospectives sur de grands effectifs, et portant sur un maximum de facteurs pronostiques simultanément. Ainsi, dans une étude portant sur 398 patients traités de manière homogène dans le cadre d'un essai prospectif, Patel et collègues ont séquencé simultanément les gènes *TET2*, *ASXL1*, *DNMT3A*, *CEBPA*, *PHF6*, *WT1*, *TP53*, *EZH2*, *RUNX1*, *PTEN*, *FLT3*, *NPM1*, *HRAS*, *KRAS*, *NRAS*, *KIT*, *IDH1*, et *IDH2* (Patel et al., 2012a). Au-delà de la démonstration du caractère défavorable des mutations d'*ASXL1*, *PHF6*, *FLT3-ITD* et *MLL-PTD*, cette étude permet de préciser que les mutations de *NPM1* sont effectivement de bon pronostic à condition qu'elles soient associées aux mutations d'*IDH1* ou 2 (figure 2). De même, une étude chinoise portant sur 1185 patients et 12 gènes (*FLT3*, *NPM1*, *CEBPA*, *KIT*, *N-RAS*, *MLL*, *WT1*, *IDH1/2*, *TET2*, *DNMT3A* et *ASXL1*) a permis d'exclure les patients mutés pour *NPM1* et *DNMT3A* du groupe de bon pronostic (Shen et al., 2011).

**Figure 2. Classification pronostique cytogénétique et moléculaire des LAM.**

Tiré de (Patel et al., 2012b)

Il est probable que de nouveaux niveaux d'analyse de la biologie des LAM permettront à l'avenir d'affiner plus encore ces classifications pronostiques. Ainsi, l'étude du méthylome permet de classer en 16 catégories distinctes les LAM, et semble avoir une relevance pronostique (Figuerola et al., 2010). Notons toutefois que la multiplication des sous-groupes pronostiques comporte également des limites, notamment lorsqu'il s'agit de réaliser des groupes homogènes pour des essais thérapeutiques.

### ***Aspects thérapeutiques***

La prise en charge thérapeutique des patients atteints de LAM repose sur l'évaluation de leur capacité à supporter un traitement intensif par chimiothérapie, qui repose largement sur l'âge et la présence de comorbidités (Döhner et al., 2010).

Chez les sujets jeunes, le traitement d'induction associe une anthracycline pendant 3 jours avec de l'aracytine en perfusion continue pendant 7 jours. Plusieurs tentatives d'amélioration de cette association ont été testées sans succès (Büchner et al., 2012), à l'exception de l'augmentation des doses d'anthracyclines qui a permis d'améliorer la survie globale (Fernandez et al., 2009; Löwenberg et al., 2009). L'objectif de cette séquence thérapeutique est l'obtention d'une rémission complète, définie par une numération normale ou subnormale (au moins 100 000 plaquettes et au moins 1000 polynucléaires neutrophiles par mm<sup>3</sup>), associée à la présence de moins de 5% de blastes sur le frottis médullaire.

En cas de rémission complète, la prévention des rechutes repose sur des traitements de consolidation, soit par des chimiothérapies (en général trois cycles de fortes doses d'aracytine), soit par une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Le choix parmi ces différentes options repose sur les caractéristiques pronostiques de la maladie (cytogénétiques et moléculaires (cf. supra) et sur la disponibilité d'un donneur HLA-compatible.

Chez les sujets non éligibles à la chimiothérapie intensive, on propose généralement des traitements de faible intensité, dont l'objectif est de contrôler la maladie sans engendrer de toxicité excessive : aracytine sous-cutanée, hydroxyurée, clofarabine ou 5-azacytidine.

Plusieurs thérapies innovantes ont été développées dans les LAM, sans réussir pour le moment à améliorer significativement la prise en charge :

- Thérapies ciblées dirigées contre des voies de signalisation comme par exemple de manière non exhaustive : inhibiteurs de farnésyltransférase (tipifarnib) (Harousseau et al., 2009), inhibiteurs de FLT3 (Kindler et al., 2010; Levis, 2013), inhibiteurs de mTORC1 (rapamycine) (Park et al., 2013) ou encore inhibiteurs de PLK1 (volasertib) (Döhner et al., 2014). Si la plupart de ces agents ont une certaine efficacité et une toxicité acceptable dans les LAM, leurs résultats sont souvent décevants à long terme puisqu'ils ne permettent pas d'éviter l'émergence de clones résistants responsables des rechutes.
- Traitements ciblés contre une cible exprimée préférentiellement exprimée par les LAM, comme par exemple le gemtuzumab-ozogamicin, qui permet de délivrer une chimiothérapie (la calicheamicine) aux cellules exprimant l'antigène CD33 via un anticorps monoclonal anti CD33 couplé, et semble apporter un bénéfice de survie aux LAM de pronostic favorable ou intermédiaire (Castaigne et al., 2012; Hills et al., 2014).
- Traitements stimulant la réponse immunitaire antitumorale, comme les anticorps bispécifiques dirigés contre le CD33 (Laszlo et al., 2014) ou les lymphocytes T modifiés pour exprimer des récepteurs antigéniques chimériques (CARs). Cette dernière approche a déjà démontré son efficacité dans les leucémies aiguës lymphoblastiques (Brentjens et al., 2013), et a été récemment adaptée aux LAM en ciblant l'antigène non peptidique Lewis Y (LeY) (Ritchie et al., 2013).

## Physiopathologie

### *Modèle à deux classes de mutations*

En 2002, Kelly et Gilliland ont proposé un modèle explicatif de la physiopathologie des LAM qui s'est imposé pendant plusieurs années (Kelly and Gilliland, 2002). A partir de la corrélation entre le phénotype des syndromes myéloprolifératifs (SMP) (excès de prolifération sans anomalie de différenciation) et celui des LAM (excès de prolifération et blocage de différenciation) d'une part, et leurs profils mutationnels d'autre part, ils ont proposé que les LAM pouvaient être définies par deux anomalies fonctionnelles ayant chacune une explication génétique (figure 3A) :

- mutation de classe I conduisant à l'activation de voies de signalisation essentielles à la survie et à la prolifération (*FLT3*, *N-RAS*, *c-KIT*)
- mutation de classe II conduisant au blocage de différenciation par l'inactivation de facteurs de transcription clé de l'hématopoïèse (*CBF  $\alpha$* , *CBF  $\beta$* , *C/EBP $\alpha$* ).

Ce modèle peut toutefois être remis en question, du fait de données expérimentales recueillies depuis grâce au séquençage génomique de cinquante LAM et exomique de cent cinquante LAM (Cancer Genome Atlas Research Network, 2013), qui démontraient (figure 3B):

- l'absence d'anomalie génétique de classe I ou II dans un certain nombre de cas de LAM
- l'identification de mutations récurrentes dans des gènes ne pouvant être rattachés fonctionnellement aux deux classes proposées en 2002 : mutations du spliceosome, des cohésines, de gènes suppresseurs de tumeurs (*p53*, *WT1*, *PHF6*), de gènes impliqués dans les modifications post-traductionnelles des histones (*MLL*, *ASXL1*, *EZH2*, *NUP98*) ou de gènes impliqués dans la méthylation de l'ADN (*DNMT3A*, *TET2*, *IDH1/2*).

Il apparaît donc que la physiopathologie des LAM est plus complexe que ce que l'on pouvait imaginer il y a quelques années. De plus, d'autres éléments expérimentaux récemment acquis doivent être inclus dans un modèle physiopathologique des LAM.

### **Cellules souches leucémiques**

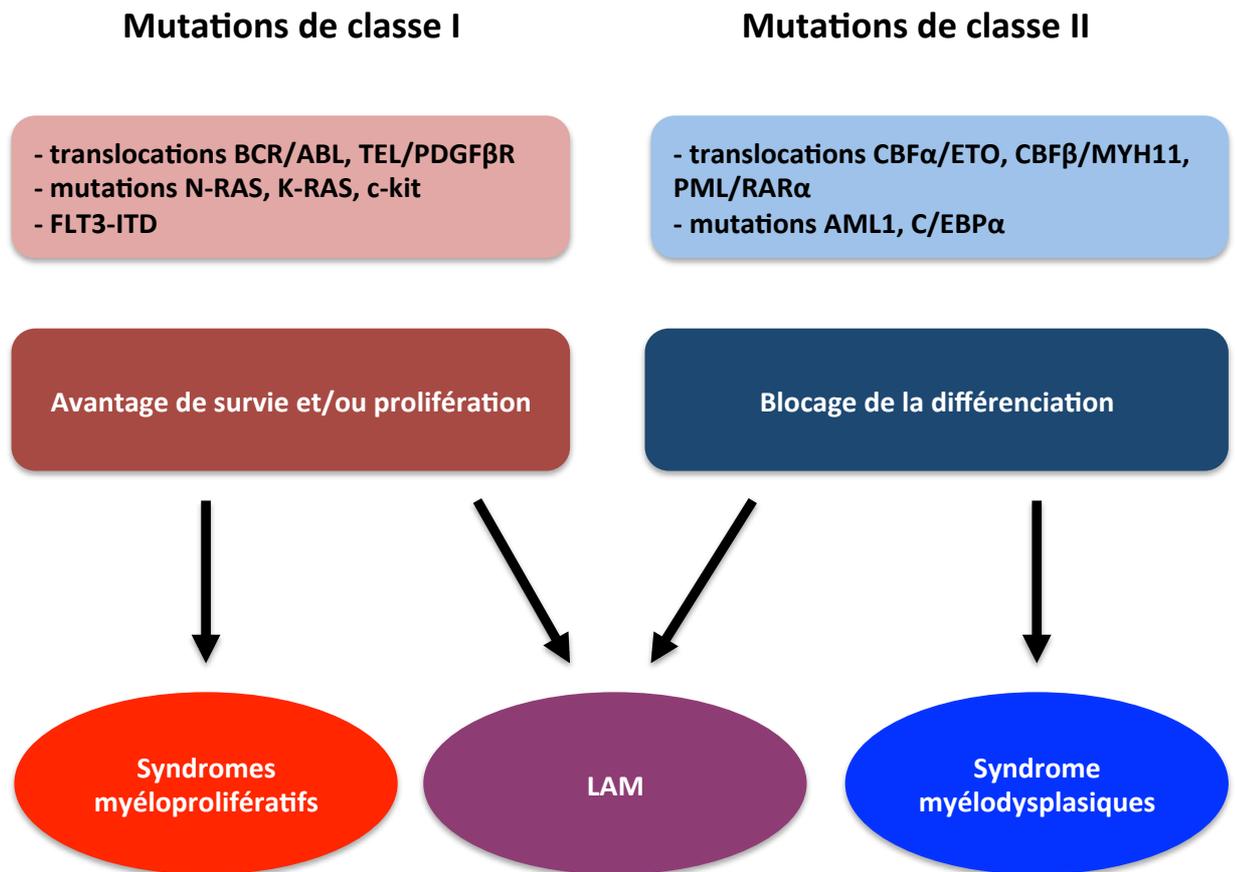
On considère actuellement qu'il existe une organisation hiérarchique des LAM en sous-populations ayant des propriétés biologiques et phénotypiques différentes, avec en particulier l'existence de cellules souches leucémiques (CSL) (Lapidot et al., 1994).

Ces cellules sont définies par :

- leur capacité à s'auto-renouveler et à reproduire la LAM lorsqu'elles sont greffées à des souris immunodéficientes,
- par le fait que l'on peut enrichir une population de cellules leucémiques en cellules souches leucémiques en les sélectionnant selon l'expression de certains marqueurs de différenciation (par exemple CD34+, CD38-, CD123+, etc.).

L'existence de cellules souches leucémiques souvent quiescentes est l'un des modèles permettant d'expliquer les rechutes des patients atteints de LAM, du fait de la résistance de

A



**Figure 3. Le modèle de leucémogénèse à deux classes de mutations et ses limites**

A. Dans le modèle proposé par Gilliland et Kelly, les mutations sont classées en deux classes selon qu'elles confèrent un avantage de survie ou de prolifération (classe I) ou qu'elles entraînent un blocage de la différenciation (classe II). Les caractéristiques cliniques des LAM résultent de l'addition de ces deux types de mutations. D'après (Kelly and Gilliland, 2002)

B. Classification fonctionnelle des mutations détectées par l'analyse génomique de 200 patients atteints de LAM, tiré de (Cancer Genome Atlas Research Network, 2013) (page suivante)



ces rares cellules aux chimiothérapies. C'est pourquoi de nombreuses équipes cherchent à caractériser les propriétés de ces CSL, afin de développer des traitements capables de les éradiquer (Jin et al., 2006; Lagadinou et al., 2013).

Plusieurs résultats expérimentaux conduisent cependant à émettre des réserves sur ce modèle (Meacham and Morrison, 2013).

D'une part, le modèle des CSL repose sur la greffe à un animal immunodéprimé. Ainsi l'on peut craindre que les caractéristiques de ces cellules soient essentiellement liées aux conditions expérimentales, et que la prise de greffe ne représente en fait que partiellement les propriétés intrinsèques des cellules initiateuses de LAM. Ainsi, dans le cas du mélanome, la proportion de cellules souches cancéreuses dépend largement du degré d'immunodépression de la souris receveuse (entre 0,001 et 0,1 % dans la souris NOD/SCID, environ 25% dans la souris NOD/SCID IL2R $\gamma^{\text{null}}$ ) (Quintana et al., 2008). De plus, il est parfaitement envisageable à l'inverse qu'une cellule incapable de greffer chez la souris immunodéprimée puisse être à l'origine d'une rechute chez un patient donné.

D'autre part, il apparaît que la définition phénotypique des CSL est imparfaite, et qu'il existe des cellules souches leucémiques dans tous les compartiments phénotypiques définis par les marqueurs CD34, CD38 ou CD45RA (Sarry et al., 2011; Taussig et al., 2008). Ainsi, si l'existence de cellules ayant des propriétés de CSL semble confirmée, leur identification de manière prospective reste encore délicate et n'est réalisée en pratique que par très peu d'équipes. Dans un travail très original, Gupta et al ont trié des cellules de cancer mammaire en trois sous-populations phénotypiques, et observé qu'après quelques jours de culture réapparaissait l'équilibre initial des trois sous-populations, quelque soit la sous population initialement triée (Gupta et al., 2011). Ce travail démontrait ainsi la plasticité phénotypique des cellules cancéreuses permettant d'assurer une relative stabilité de la population cellulaire globale.

L'ensemble de ces données remet en question l'idée qu'il existe effectivement des CSL distinctes des autres cellules leucémiques, et conduit à proposer un modèle stochastique où l'émergence de propriétés de cellules souches résulte d'un équilibre dynamique des sous-populations tumorales.

## ***Architecture clonale***

Au-delà de l'hétérogénéité phénotypique proposée par le modèle des CSL, les données de nouvelle génération (« NGS » pour next generation sequencing) ont révélé que les LAM ont une architecture clonale complexe, qui témoigne de la sélection de sous-clones ayant un profil génétique différent (Ding et al., 2012; Welch et al., 2012). De plus, il a été récemment montré que ces différences génétiques correspondent effectivement à des différences fonctionnelles (Klco et al., 2014), même si aucune relation génotype-phénotype claire n'a pu être établie à ce jour.

Il est probable que l'architecture clonale telle qu'appréciée par les différences génétiques des clones ne soit qu'une simplification de la complexité des cancers. Il a en effet été récemment montré dans le cancer du colon qu'au sein de sous-clones semblants identiques au plan génétique, certaines populations cellulaires (identifiées par un site aléatoire d'insertion lentivirale) avaient un avantage sélectif d'origine non génétique (Kreso et al., 2013).

### ***Relations avec le microenvironnement***

Si les différents résultats présentés ci-dessus portent sur les cellules leucémiques elles-mêmes, d'autres études ont montré le rôle majeur des cellules du microenvironnement médullaire dans la physiopathologie des LAM.

Ainsi, il a été décrit chez la souris qu'une mutation activatrice de la  $\beta$ -caténine dans les ostéoblastes conduisait au développement de LAM ayant des anomalies cytogénétiques récurrentes rappelant celles observées chez l'humain, comme l'équivalent de la monosomie 7. L'induction de la LAM provenait de la stimulation de la voie NOTCH dans les cellules souches hématopoïétiques par les ostéoblastes (Kode et al., 2014). Ce travail rappelle l'observation de l'émergence de syndromes myélodysplasiques dans des souris ayant une invalidation de *Dicer* ou de *Sbds* (Schwachman Bodian Diamond Syndrome) dans les progéniteurs ostéoblastiques (Raaijmakers et al., 2010). Ces données soulignent donc l'importance de considérer les LAM dans une perspective écologique (Thomas et al., 2013), c'est à dire non seulement comme un dérèglement autonome de la cellule, mais comme une perturbation des interactions cellule / microenvironnement.

### ***Cellules souches préleucémiques***

Il est classique de considérer que la transformation tumorale nécessite l'acquisition successive de plusieurs anomalies génétiques comme cela avait été démontré dans le cancer du colon (Vogelstein et al., 1988). Le caractère multi-étape de la transformation leucémique a également été montré dans une étude prospective de patients ayant subi une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques pour une hémopathie lymphoïde. L'analyse à intervalle régulier du profil d'expression génique des cellules CD34+ montrait des anomalies précoces chez les patients qui allaient finalement développer une LAM, que l'on ne retrouvait pas chez les patients qui n'allaient pas développer de LAM (Li et al., 2011a).

Plus récemment, l'équipe de J. Dick a démontré qu'il existe des mutations du gène *DNMT3A* dans les cellules souches hématopoïétiques normales des patients atteints de LAM avec mutation de ce gène (Shlush et al., 2014). Ces cellules sont effectivement capables de reconstituer une hématopoïèse après xélogreffe chez la souris immunodéprimée avec un avantage sélectif par rapport aux cellules souches n'ayant pas de mutation. Les auteurs décrivaient la persistance de ces cellules souches pré-leucémiques même en cas de rémission complète et proposent donc que l'éradication de cette hématopoïèse pré-leucémique soit un objectif thérapeutique.

### ***Quel modèle pour la physiopathologie des LAM en 2014 ?***

Finalement, même si le modèle proposé par Gilliland semble excessivement simplifié et ne rend pas compte de la diversité génétique des LAM, ce modèle est le seul à avoir rapproché des anomalies moléculaires et des caractéristiques phénotypiques définies. On peut espérer que les années à venir permettront de mieux comprendre les traits phénotypiques associés aux autres classes de mutations mises en évidence par le NGS. Une hypothèse serait que les mutations de la machinerie épigénétique ou du spliceosome permettraient aux cellules leucémiques d'augmenter la variabilité de leur expression génique (Capp, 2005), et ainsi augmenter leur plasticité phénotypique, ce qui pourrait participer à l'acquisition du caractère souche.

S'il faut reconnaître que la biologie moléculaire et ses développements les plus récents à haut débit ont permis d'affiner notre connaissance descriptive des LAM, on peut néanmoins regretter le peu d'avancées conceptuelles qui en ont émergé (Weinberg, 2014). C'est pourquoi il semble indispensable d'améliorer la compréhension fonctionnelle des cellules leucémiques au delà de la description des anomalies moléculaires qui les caractérisent.

## **Dérégulation métabolique et dérégulation des voies de signalisation dans les leucémies : perspectives thérapeutiques.**

### ***Signalisation et métabolisme : deux modes de description de la cellule tumorale ?***

Dans une célèbre revue publiée par D. Hanahan et R. Weinberg en 2000 (Hanahan and Weinberg, 2000), les deux auteurs identifiaient six caractéristiques du cancer (« hallmarks of cancer »), parmi lesquelles trois pouvaient être entièrement supportées par des dérégulations de voies de signalisation (indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance, résistance aux signaux antiprolifératifs, résistance aux signaux proapoptotiques). Les auteurs se référaient alors à la notion de signal, en faisant dans cette revue la synthèse d'un effort de recherche ayant conduit de la découverte des oncogènes à la mise en évidence de réseaux de signalisation et de transmission d'information perturbés dans les cellules cancéreuses.

En 2011, les mêmes auteurs proposent une mise à jour de cette revue avec deux nouvelles caractéristiques inhérentes au processus de transformation, parmi lesquelles le dérèglement du métabolisme énergétique (Hanahan and Weinberg, 2011). Cette caractéristique fondamentale des cellules cancéreuses est connue depuis les travaux d'Otto Warburg dans les années 1920 (Warburg et al., 1927), mais a fait l'objet d'un regain d'intérêt au début des années 2000, avec la mise en évidence de plusieurs aspects propres au métabolisme cancéreux comme les besoins de synthèse rapide d'ATP, la nécessité accrue de synthèse de macromolécules (protéines, glucides, lipides, nucléotides) ou encore l'importance du contrôle du métabolisme oxydatif.

La cellule cancéreuse peut ainsi être décrite comme un réseau de voies de signalisation perturbées par des mutations concernant des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeur (modèle signalisation), ou comme une cellule ayant un métabolisme dérégulé (niveau d'énergie, synthèse de métabolites, stress oxydatif) qui explique son phénotype prolifératif (modèle métabolique). Plutôt que d'opposer ces deux modèles, nous pourrions proposer qu'ils constituent deux façons de décrire un même phénomène. Chacun de ces modèles peut alors se révéler plus ou moins adapté pour analyser les résultats ou proposer des hypothèses dans une

situation expérimentale donnée. Au-delà d'une simple discussion épistémologique, ces concepts sous-tendent les développements de la recherche et de la thérapeutique. Ainsi, dans le modèle signalisation, la mise en évidence d'activations constitutives de voies de signalisation dans les cellules cancéreuses a permis le développement de traitements ciblés, dont certains sont désormais utilisés dans la pratique clinique. De même, le modèle métabolique a montré que les particularités métaboliques des cellules cancéreuses peuvent être utilisées dans le cadre du diagnostic (exemple de la tomographie par émission de positrons, qui permet de réaliser une imagerie fonctionnelle de l'avidité des cellules cancéreuses en métabolites comme le glucose ou plus récemment la thymidine ou encore la glutamine) ou pourraient constituer une cible thérapeutique. Si l'on se place dans le cadre théorique que nous proposons, à savoir que le modèle signalisation et le modèle métabolique sont deux façons de décrire un même phénomène, il pourrait être intéressant de mesurer les conséquences métaboliques des interventions visant à moduler les voies de signalisation, ou à l'inverse de s'intéresser aux modulations des voies de signalisation en réponse aux agents ciblant le métabolisme. On pourrait ainsi mettre en évidence de nouveaux mécanismes de résistance aux traitements et espérer que de cette approche globale émerge de nouvelles solutions thérapeutiques.

Mon équipe d'accueil travaille depuis plusieurs années sur les anomalies des voies de signalisation dans les LAM, ce qui a conduit au développement de traitements ciblés (exemple de la rapamycine (Park et al., 2013)). Depuis quelques années, nous nous intéressons plus particulièrement aux relations entre anomalies des voies de signalisation et dérégulation métabolique dans les cellules de LAM. Ainsi, l'étude de la régulation de la voie mTORC1 par la disponibilité en acides aminés a permis de mettre en évidence la sensibilité exquise de ces cellules à la privation en glutamine (Willems et al., 2013). De même, mon équipe d'accueil a montré l'effet anti-leucémique de la metformine, une drogue ciblant la chaîne respiratoire mitochondriale (Green et al., 2010). Mon travail de thèse s'inscrit dans cette interface métabolisme / signalisation, avec l'utilisation d'un composé activant AMPK, une kinase essentielle dans la régulation du métabolisme cellulaire.

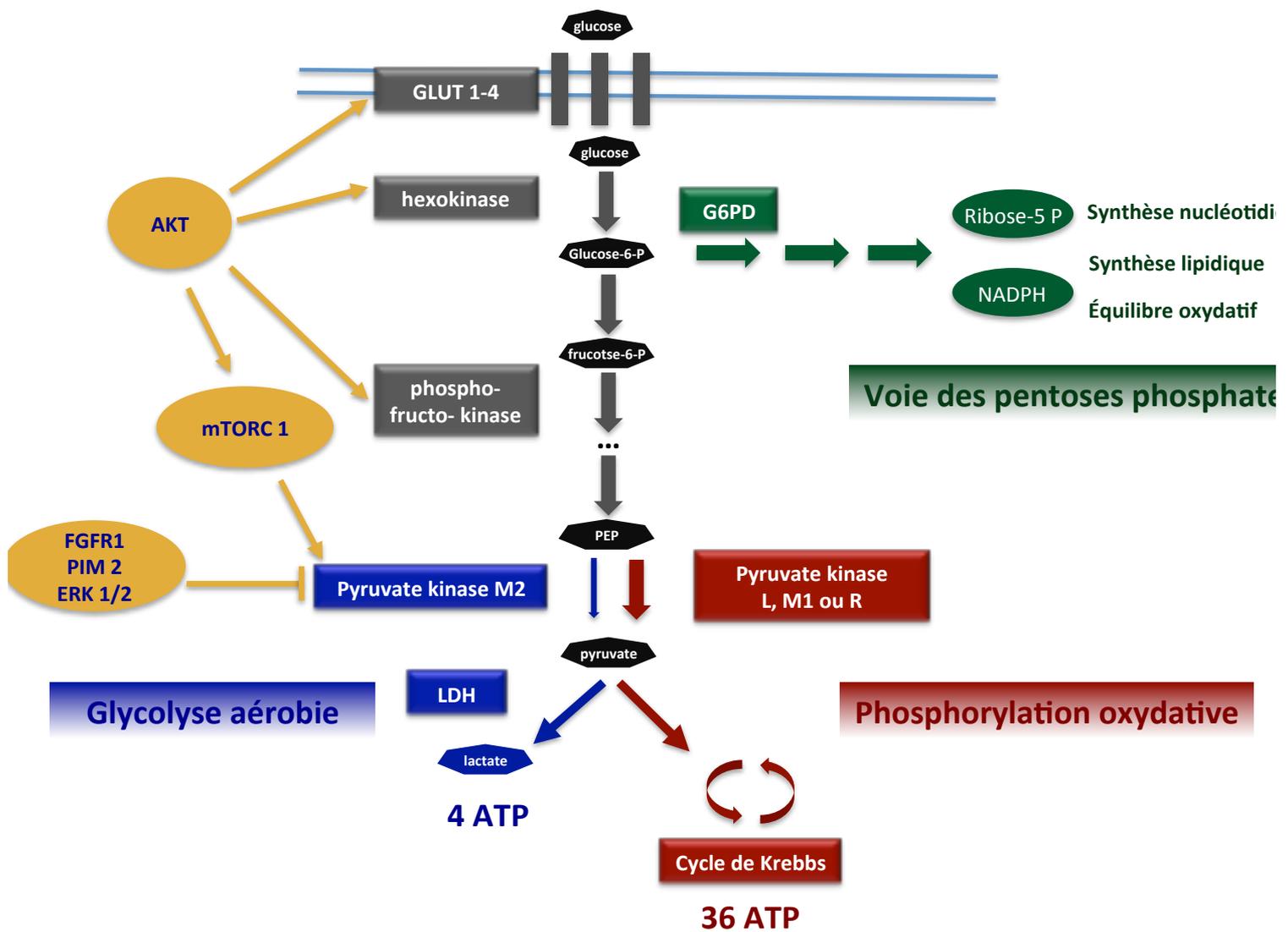
Nous allons illustrer ce lien entre les anomalies du métabolisme des cellules transformées et les anomalies des voies de signalisation par l'exemple de l'effet Warburg et de son contrôle par la voie PI3K dans les cancers.

## ***L'effet Warburg et la voie PI3K : exemple des LAM***

Depuis les années 1920, Otto Warburg a observé que les cellules cancéreuses ont un métabolisme du glucose différent des cellules normales (Warburg et al., 1927) (figure 4). En effet, en situation de normoxie, la plupart des cellules normales utilisent le pyruvate produit par la glycolyse comme substrat du cycle de Krebs, ce qui permet d'obtenir un rendement énergétique maximal (36 molécules d'ATP par molécule de glucose). Au contraire, les cellules cancéreuses privilégient l'utilisation du glucose par la voie de la glycolyse et la production de lactate, ce qui a un rendement faible en terme énergétique (4 molécules d'ATP par molécule de glucose). Cette observation explique l'affinité des cellules cancéreuses pour le glucose, qui a pu être exploitée dans l'imagerie médicale avec la tomographie par émission de positrons utilisant du glucose marqué par un isotope, le 18 fluorodéoxyglucose (18F-FDG).

Beaucoup de temps a passé entre cette observation et la compréhension de l'avantage sélectif conféré aux cellules cancéreuses par ce métabolisme : l'utilisation préférentielle de la glycolyse permet de générer les précurseurs de la synthèse des macromolécules via la voie des pentoses phosphates (Vander Heiden et al., 2009) (figure 4). En 2011, Anastasiou et collègues ont démontré que les cellules cancéreuses expriment préférentiellement l'isoforme 2 de l'enzyme pyruvate kinase (Anastasiou et al., 2011). Cette isoforme est moins active que les autres isoformes exprimées dans les tissus normaux (L dans le foie et le rein, R dans les érythrocytes, M1 dans les muscles et le cerveau). De plus, son activité est régulée par phosphorylation directe par des protéines kinases oncogéniques telles que ERK1/2 (Yang et al., 2012), PIM 2 (Yu et al., 2013) ou FGFR1 (fibroblast growth factor receptor 1) (Hitosugi et al., 2009). Son expression a pour conséquence de ralentir le flux glycolytique et donc de favoriser l'utilisation du glucose-6-Phosphate dans la voie des pentose-phosphates. Cette voie permet la synthèse de ribose, et de NADPH qui est un substrat de la synthèse d'autres macromolécules et permet de diminuer le niveau de stress oxydatif (Anastasiou et al., 2011).

L'effet Warburg peut ainsi être expliqué par des anomalies de signalisation résultant de l'activation d'oncogènes ou de la perte de suppresseurs de tumeur, parmi lesquelles l'activation constitutive de la voie PI3K, la stabilisation de hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ), l'inactivation de l'axe LKB1/AMPK, ou l'inactivation de p53 (Cairns et al., 2011).



**Figure 4. Effet Warburg et voie PI3K/Akt comme exemple des interrelations fortes entre signalisation et métabolisme**

Les cellules transformées ont des capacités de captation du glucose augmentées, et présentent également des mécanismes d'activation des enzymes limitantes de la glycolyse (en gris). Au contraire des cellules normales, qui utilisent le pyruvate comme substrat de la phosphorylation oxydative et obtiennent ainsi un rendement maximal en ATP (en rouge), les cellules cancéreuses transforment la majorité du pyruvate en lactate via la lactate déshydrogénase A (LDH) (en bleu). De plus, les cellules cancéreuses expriment préférentiellement l'isoforme M2 de la pyruvate kinase, dont l'activité est inhibée par des kinases oncogéniques. PKM2 est une enzyme limitante de la glycolyse, ce qui permet l'accumulation d'intermédiaires de la glycolyse, qui seront alors utilisés par la voie des pentoses phosphates (en vert) dont la glucose 6 phosphate deshydrogénase (G6PD) est l'enzyme limitante, pour permettre la production d'intermédiaires pour la synthèse de macromolécules. L'activation de la voie PI3K-Akt-mTORC1 (en jaune) favorise la mise en place de l'effet Warburg à plusieurs niveaux. PEP : phosphoenolpyruvate  
D'après (Vander Heiden et al., 2009)

L'activation constitutive de la voie de la phosphatidylinositol-3-kinase est un phénomène très fréquemment observé dans les cancers (Courtney et al., 2010), y compris dans les LAM (Sujobert et al., 2005; Xu et al., 2003). Cette activation peut être la conséquence de la perte du gène suppresseur de tumeur *PTEN* (phosphatase and tensin homolog), ou de l'activation constitutive de récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase, mais les mécanismes d'activation de cette voie dans les LAM sont encore mal connus (Park et al., 2010). Akt est l'effecteur principal de la voie PI3K, qui favorise la glycolyse en agissant à de multiples niveaux : 1/ en favorisant l'expression des transporteurs de glucose (Barthel et al., 1999), 2/ en activant par phosphorylation la phosphofructokinase 2, dont le produit (fructose-2,6-bisphosphate) est un activateur allostérique de la phosphofructokinase 1 qui est l'enzyme limitante de la glycolyse (Deprez et al., 1997), 3/ en inhibant Foxo3A, ce qui engage les cellules dans un programme transcriptionnel qui favorise la glycolyse (Khatri et al., 2010), ou 4/ en stabilisant HIF1 $\alpha$  via l'activation de mTORC1. HIF1 $\alpha$  est un facteur de transcription qui favorise l'expression de nombreux gènes importants dans la glycolyse, dont PKM2 (Sun et al., 2011).

Dans les LAM, nous avons montré une activation constitutive de la voie PI3K/Akt chez la moitié des patients (Sujobert et al., 2005) et des travaux récents ont pu montrer que l'activation d'Akt est corrélée dans cette pathologie au phénotype glycolytique (Scotland et al., 2013). En effet, la lignée U937 qui présente une délétion bi-allélique de *PTEN* et donc une activation constitutive d'Akt présente également un métabolisme glycolytique prédominant (en comparaison avec les lignées MOLM-14 et HL60) qui explique une certaine résistance à l'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale par la metformine. Dans cette lignée, l'inhibition d'Akt modifie le métabolisme en faveur de la phosphorylation oxydative, ce qui confirme le lien entre activation de la voie PI3K et glycolyse dans cette pathologie. Dans le sens opposé, l'inhibition du métabolisme oxydatif dans les lignées sensibles (MOLM-14 et HL-60) entraîne une phosphorylation d'Akt et une augmentation du flux glycolytique, ce qui confirme l'interdépendance des voies de signalisation et de l'état métabolique des cellules.

L'exemple de l'effet Warburg et de son contrôle par la voie PI3K/Akt illustre ainsi les liens entre signalisation et métabolisme dans les cellules cancéreuses. La mise en évidence d'anomalies métaboliques ou d'activations anormales de voies de signalisation dans les cellules cancéreuses permet d'envisager le développement de nouvelles approches thérapeutiques ciblées sur ces spécificités des cellules cancéreuses, selon deux cadres

théoriques majeurs que nous proposons d'expliciter : le modèle d'addiction oncogénique/hypersensibilité aux gènes suppresseur de tumeur et le modèle d'addiction non oncogénique/létalité synthétique.

### ***Modèle d'addiction oncogénique / hypersensibilité aux gènes suppresseurs de tumeur***

Le modèle d'addiction oncogénique propose que la survie des cellules cancéreuses soit dépendante de l'activité d'oncogènes (figure 5A). Ce terme a été inventé en 2002 par Weinstein dans un éditorial qui proposait une synthèse de plusieurs résultats expérimentaux (Weinstein, 2002). En effet, il avait été observé dans différents modèles murins permettant une expression contrôlée de l'oncogène *c-Myc* (dans des ostéoblastes (Jain et al., 2002), des cellules souches hématopoïétiques (Felsher and Bishop, 1999), des kératinocytes (Pelengaris et al., 1999) ou des cellules  $\beta$  pancréatiques (Pelengaris et al., 2002)), l'apparition de tumeurs agressives, qui régressaient complètement si l'expression de *c-Myc* était supprimée. Ces observations ont été confirmées avec d'autres oncogènes comme H-Ras dans les mélanomes (Chin et al., 1999), ou BCR-ABL dans les leucémies aiguës lymphoblastiques B (LAL-B) (Huettner et al., 2000) et ont conduit au succès de la première thérapie ciblée que fut l'imatinib ciblant l'activité kinase de la protéine de fusion BCR-ABL retrouvée dans la leucémie myéloïde chronique (LMC) ou dans certains cas de LAL-B. Ainsi, certains cancers sont dépendants des oncogènes pour leur survie ce qui représente une cible thérapeutique validée.

Le concept d'hypersensibilité aux gènes suppresseurs de tumeur est le corollaire de l'addiction oncogénique, et prédit que les cellules cancéreuses seront éliminées en cas de réexpression de gènes suppresseurs de tumeur inactivés durant l'oncogenèse. La validité de ce concept a été démontrée dans des modèles tumoraux murins avec la réexpression de p53 (Martins et al., 2006), mais le transfert d'une telle approche semble difficilement envisageable en pratique clinique. Dans les cas où la perte d'un gène suppresseur de tumeur active une voie de signalisation oncogénique, le concept d'hypersensibilité aux gènes suppresseurs de tumeur prédit une sensibilité exquise des cellules cancéreuses à l'inhibition de cette voie oncogénique, comme c'est le cas par exemple avec les inhibiteurs de mTORC1 dans les tumeurs de sclérose tubéreuse de Bourneville (Bissler et al., 2008; Krueger et al., 2010)), en réalisant alors une situation d'addiction oncogénique fonctionnelle.

Dans ce cadre conceptuel, l'émergence des technologies de NGS et la formation de consortiums internationaux visant à caractériser le profil mutationnel des cancers humains ont permis d'espérer l'apparition de traitements ciblés adaptés à chaque cancer et à chaque oncogène auquel il serait dépendant (The Cancer Genome Atlas Research Network et al., 2013). Cependant, si ces efforts collaboratifs considérables ont permis de mieux connaître la complexité du profil mutationnel des cancers humains, ils ont souvent échoué à découvrir des oncogènes fréquemment mutés et accessibles à un traitement ciblé. Notons cependant quelques succès prometteurs, comme la découverte des mutations d'IDH 1 et 2 dans les LAM et les gliomes (Mardis et al., 2009), qui ont conduit au développement de traitements ciblés (Rohle et al., 2013; Wang et al., 2013) dont les résultats cliniques en phase précoce semblent très intéressants dans les LAM (Abstract LB-6156, EHA 2014).

Une alternative à la recherche de cibles thérapeutiques dans le modèle d'addiction oncogénique est la recherche fonctionnelle d'addiction non oncogénique, afin de réaliser une situation de létalité synthétique entre un traitement donné et des particularités fonctionnelles des cellules cancéreuses.

### ***Addiction non oncogénique / modèle de létalité synthétique***

Le concept d'addiction non oncogénique a été proposé en 2007 (Solimini et al., 2007), à l'occasion d'une publication montrant que les souris KO pour *Hsf1* (heat-shock factor 1) étaient résistantes à plusieurs modèles de carcinogénèse, et que l'inhibition de HSF1 par ARN interférence compromettrait la survie de plusieurs lignées de cancer mais pas de cellules normales (Dai et al., 2007). L'addiction non oncogénique repose sur le fait que les cellules transformées sont soumises à de nombreux stress (stress mitotique, stress protéotoxique, stress oxydatif, stress métabolique) que certains auteurs ont proposé d'ajouter aux caractéristiques inhérentes à la transformation (hallmarks of cancer) (Solimini et al., 2007, Luo et al., 2009a). De ce fait, les cellules cancéreuses sont particulièrement sensibles aux agents qui augmentent le niveau de stress, puisque leurs systèmes d'adaptation seront dépassés, ou aux agents qui inhibent les systèmes d'adaptation au stress.

Ce concept est très proche de celui de létalité synthétique développé par les généticiens de la levure, et dont il a été proposé une transposition dans le domaine des agents anticancéreux (Kaelin, 2005) (figure 5B). Deux gènes sont dits synthétiques létaux si la mutation isolée de

chacun des gènes est viable, mais si une mutation simultanée de ces deux gènes est létale. Cette situation peut s'observer en cas de mutations entraînant une perte de fonction : si un gène B est inactivé, alors le gène A devient indispensable à la survie, comme par exemple si les gènes A et B sont situés sur deux voies alternatives de synthèse d'un métabolite essentiel. On peut également envisager l'établissement d'une relation de létalité synthétique avec des mutations gain de fonction : un gène A est essentiel à la survie si le gène B est surexprimé : c'est le cas de la « synthetic dosage lethality » (Kroll et al., 1996). Il a pu être estimé chez *Saccharomyces cerevisiae* que pour les 80% de gènes dont l'inhibition n'est pas létale en soi, une relation de létalité synthétique existe avec environ 10 autres gènes (Tong et al., 2004), ce qui permet de fonder de grands espoirs thérapeutiques en transposant ce concept au traitement du cancer. Le meilleur exemple de létalité synthétique appliqué au traitement du cancer concerne les inhibiteurs de PARP (poly-ADP ribose polymérase) dans les cancers du sein mutés pour les gènes *BRCA1* ou *2* (*breast cancer 1/2*). En effet, l'inhibition de PARP empêche la réparation des cassures simples brins de l'ADN, qui doivent alors être réparées par recombinaison homologue. *BRCA1* et *2* étant indispensables à la recombinaison homologue, les cellules cancéreuses ayant perdu l'un ou l'autre de ces gènes accumulent alors des lésions de l'ADN qui les conduisent finalement à la mort cellulaire. Ce rationnel biologique a conduit au développement d'inhibiteurs de PARP, qui se sont avérés efficaces dans des essais cliniques (Kaye et al., 2012).

La stratégie la plus prometteuse pour la découverte de cibles thérapeutiques dans le cadre de l'addiction non oncogénique est l'utilisation de cribles fonctionnels à l'aide de banques permettant l'invalidation de chacun des gènes par ARN interférence (Luo et al., 2009b) ou plus récemment à l'aide du système CRISPR/Cas9 (Shalem et al., 2014). C'est ainsi que des auteurs ont pu récemment montrer dans des cellules de LMC que la surexpression de PRKCH (qui code la protéine PKC $\eta$ ) confère une résistance à l'imatinib en activant C-RAF. Ce mécanisme de résistance identifié par un crible par une banque d'ARN interférents a été également retrouvé chez les patients présentant une résistance à l'imatinib. Bien que cette approche soit à ce jour limitée aux lignées cellulaires, elle permet de découvrir de manière non biaisée des interactions létales éventuellement accessibles à des approches thérapeutiques.

## addiction oncogénique

## léthalité synthétique

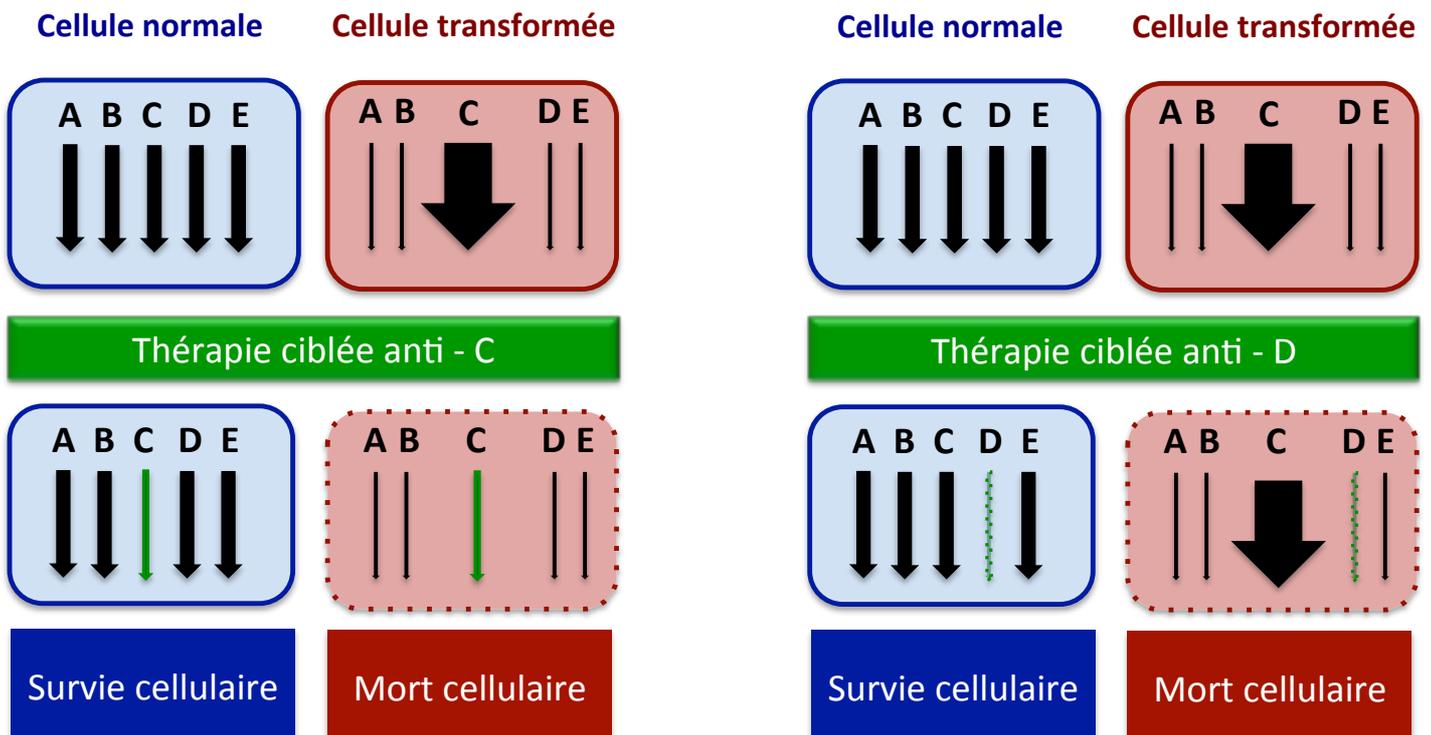


Figure 5. Modèles théoriques expliquant la spécificité d'effet des thérapies ciblées en oncologie.

Dans le modèle d'addiction oncogénique, la survie des cellules cancéreuses est dépendante de l'activité d'un oncogène (par exemple l'oncogène C dans ce schéma) : l'inhibition de celui-ci entrainera la mort des cellules cancéreuses alors qu'il sera sans effet sur les cellules normales. Ce modèle explique par exemple les effets des inhibiteurs de BCR-ABL dans la leucémie myéloïde chronique.

Dans le modèle de létalité synthétique, l'activation de l'oncogène crée une dépendance à des mécanismes de suppléance (voies métaboliques, signalisation, systèmes de réparation...). Dans l'exemple proposé dans ce schéma, l'activation de l'oncogène C rend les cellules cancéreuses dépendantes de la voie D pour leur survie. Il existe une relation de létalité synthétique entre activation de la voie C et inhibition de la voie D qui explique l'effet du traitement dans les cellules cancéreuses, mais pas dans les cellules normales.

## **LES VOIES MTORC1, AMPK ET LA VOIE DE REPONSE INTEGREE AU STRESS : INTEGRATEURS DU METABOLISME CELLULAIRE**

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à trois voies de signalisation dont l'état d'activation est lié aux conditions métaboliques des cellules, et qui contrôlent en retour de nombreux aspects du métabolisme cellulaire.

Ainsi, l'activation du complexe mTORC1 promeut globalement les processus anaboliques, lorsque les cellules sont stimulées par des facteurs de croissance dans un environnement riche en nutriments (acides aminés, glucose). L'activation de mTORC1 est considérée comme oncogénique, comme en témoigne les nombreuses mutations conduisant à une activation de cette voie dans les cancers sporadiques ainsi que la mise en évidence plus récente de mutations gain-de-fonction de la kinase mTOR elle-même dans de rares cas de cancers sporadiques (Grabiner et al., 2014).

Au contraire de mTORC1, certaines voies de signalisation sont activées dans les cellules dans les situations de stress. Ainsi, AMPK (AMP-activated protein kinase) est activée en cas de stress énergétique, et la voie de réponse intégrée au stress (ISR) est activée en cas de carence en nutriments (acides aminés, glucose, fer), d'hypoxie ou d'infection virale. Ces deux voies favorisent des processus cataboliques, permettant aux cellules de restaurer leur homéostasie. De façon intéressante, le rôle de ces deux voies dans les cancers est équivoque, puisqu'elles sont parfois décrites comme suppresseur de tumeur, et parfois comme indispensables à la progression tumorale (Hardie, 2013, Ma and Hendershot, 2004).

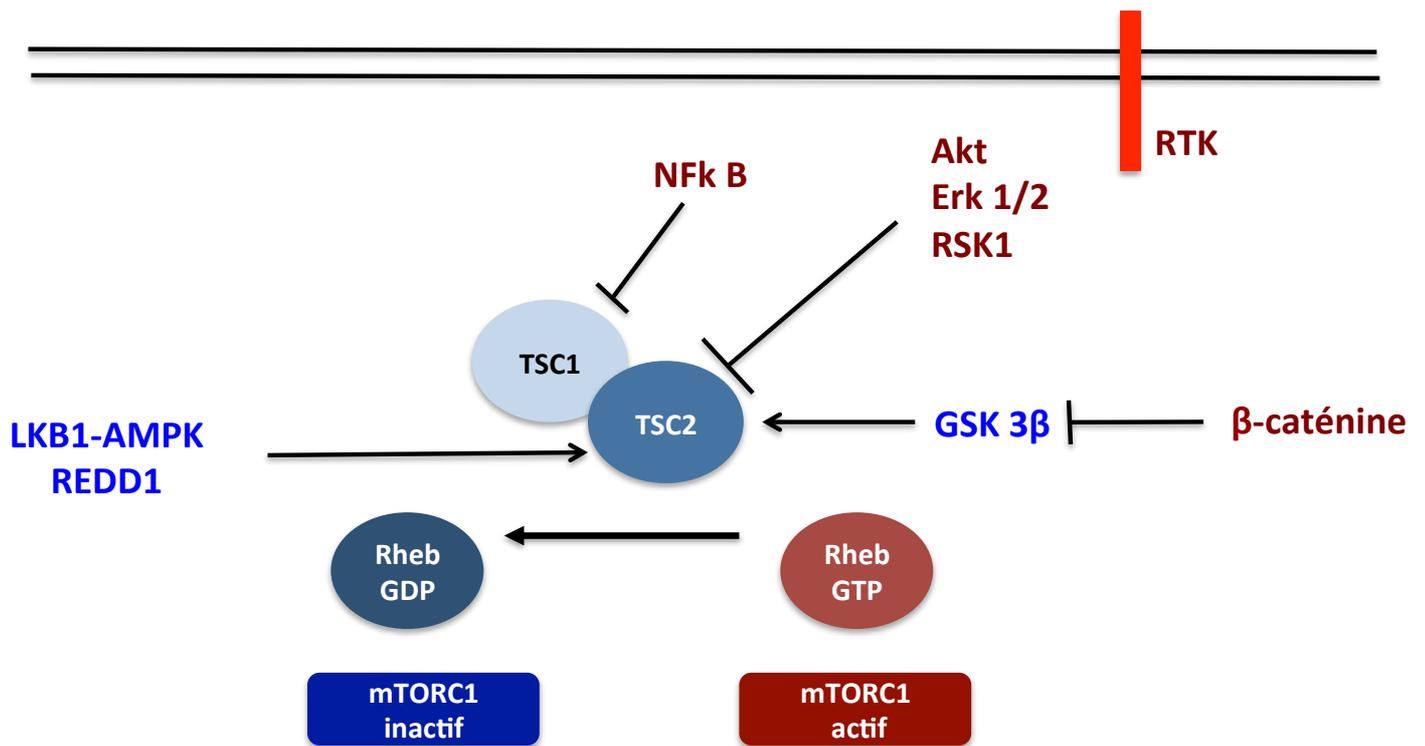
Certaines connexions entre ces voies ont été décrites, impliquant soit des molécules de signalisation, soit des modulations concertées de processus métaboliques complexes tels que l'autophagie, à laquelle nous allons également consacrer une étude détaillée.

## La voie mTORC1

### ***Description des complexes mTORC1 et mTORC2***

La découverte de mTOR provient de l'étude du mécanisme d'action de la rapamycine, un macrolide produit par la bactérie *Streptomyces hygroscopicus*, qui possède des capacités antiprolifératives dans de nombreux types cellulaires. Sa cible moléculaire TOR (Target of rapamycin) a été découverte en 1993 chez la levure, puis en 1994 chez les mammifères (Brown et al., 1994; Sabatini et al., 1994) : mTOR pour mammalian target of rapamycin. mTOR est une sérine/thréonine kinase de la famille des phosphatidylinositol-3-kinases, impliquée dans deux complexes multiprotéiques, mTORC1 et mTORC2, ayant certains partenaires en commun (mLST8 (mammalian lethal with sec-13 protein 8), Deptor (DEP domain containing mTOR interacting protein), tti1 (TELO2 interacting protein 1)/tel2 (telomere maintenance 2)) et certains partenaires spécifiques de chaque complexe. Ainsi, mTORC1 est caractérisé par l'association à Raptor (regulatory associated protein of mammalian target of rapamycin) et PRAS 40 (proline-rich Akt substrate 40 kDa), alors que mTORC2 est caractérisé par la présence de Rictor (rapamycin insensitive companion of mTOR), mSin1 (mammalian stress activated map kinase-interacting protein 1) et Protor (protein observed with Rictor) 1 et 2. Ces deux complexes ont des fonctions et des mécanismes de régulation qui leur sont propres. L'activité du complexe mTORC1 peut être inhibée spécifiquement par la rapamycine. Sa fonction la mieux décrite est le contrôle de l'initiation de la traduction des ARNm en protéine via ses substrats directs P70S6K et 4E-BP1 (Laplanche and Sabatini, 2012). La régulation et les fonctions de mTORC1 vont faire l'objet d'un chapitre détaillé plus bas. A l'inverse, le complexe mTORC2 n'est pas sensible à la rapamycine et les mécanismes permettant son activation sont moins bien décrits que dans le cas de mTORC1. L'activation de mTORC2 a été observée après stimulation par l'insuline, selon un mécanisme original d'association du complexe mTORC2 aux ribosomes, de manière dépendante de l'activité PI3K (Zinzalla et al., 2011). Les principaux substrats connus de mTORC2 sont : i) Akt dont la phosphorylation sur la S473 induite par mTORC2 survient en même temps que sa traduction et est nécessaire à l'activation complète de cette kinase (Sarbasov et al., 2005) ; ii) SGK1 (Serum and Glucocorticoid induced protein kinase 1) qui est une kinase impliquée dans la survie et la prolifération cellulaire (García-Martínez and Alessi, 2008); iii) la paxilline et iv) Rac 1, une protéine de la famille des Rho GTPases ayant un rôle dans l'adhésion et dans l'organisation du cytosquelette d'actine (Jacinto et al., 2004). Au plan pharmacologique, mTORC2 a été décrit initialement comme insensible à la rapamycine (Jacinto et al., 2004), à la différence de mTORC1. Cependant, cette notion doit être nuancée, puisque des auteurs ont décrit dans certains types cellulaires (Jurkat, U937,

BJAB, U 87, SKW3, UACC-903) une inhibition de mTORC2 lors de traitements prolongés (24h) par la rapamycine du fait d'une dissociation du complexe mTORC2 (Sarbassov et al., 2006). Les inhibiteurs catalytiques de mTOR sont capables d'inhiber mTORC2 simultanément à mTORC1 mais il n'existe pas actuellement d'inhibiteur pharmacologique spécifique de mTORC2.



**Figure 6. Activation de mTORC1 par les voies de signalisation oncogéniques.**

L'activation de mTORC1 nécessite son association avec RHEB liée au GTP. Le complexe TSC1/TSC2 qui exerce une activité GTPase sur RHEB, est régulé négativement par les voies de signalisation oncogéniques, et positivement par l'axe suppresseur de tumeur LKB1/AMPK en cas de stress énergétique, ou par REDD1 en cas d'hypoxie.

## **Régulation et conséquences de l'activation de mTORC1**

L'activation de mTORC1 est régulée par de nombreuses voies de signalisation, ce qui permet à ce complexe d'intégrer le statut nutritionnel et la présence de facteurs de croissance pour moduler l'état de prolifération et le métabolisme de la cellule. La relevance de ces différentes voies d'activation peut être largement dépendante du type cellulaire et de l'état nutritionnel (Wolff et al., 2011).

### **Régulation par les facteurs de croissance**

L'activité de mTORC1 est dépendante de son association à une GTPase nommée RHEB (Ras homology enriched in brain), qui active mTORC1 lorsqu'elle est elle-même activée par son association au GTP (figure 6). Alors que l'on ne connaît pas de protéine ayant une fonction de guanine nucleotid exchange factor (GEF) pour RHEB (c'est-à-dire permettant son activation par remplacement d'une molécule de GDP par une molécule de GTP), de nombreux travaux ont démontré le rôle majeur du complexe TSC1/TSC2 (Tuberous sclerosis 1 ou hamartin, et Tuberous sclerosis 2 ou tuberin) dans l'activation de la fonction GTPase portée par RHEB (c'est-à-dire permettant l'hydrolyse du GTP en GDP permettant ainsi l'inhibition de RHEB) dans la régulation de mTORC1 (Inoki et al., 2003a). Le complexe TSC1/2 a ainsi une activité GAP (GTPase activating protein) vis-à-vis de RHEB.

Par ailleurs, TSC2 est un substrat pour plusieurs kinases activées en aval des récepteurs à activité tyrosine kinase, telles qu'Akt (Inoki et al., 2002), Pim 2 (proviral integration of Moloney virus 2) (Lu et al., 2013b), ERK1/2 (Extracellular signal regulated kinase) (Ma et al., 2005) ou RSK1 (Ribosomal S6 Kinase) (Roux et al., 2004). La phosphorylation de TSC2 par ces kinases inactive la fonction GTPase de TSC2, ce qui conduit à l'augmentation du pool de RHEB-GTP et donc à une augmentation de l'activité de mTORC1. D'autres voies de signalisation importantes en oncogenèse convergent vers ce complexe, telles que la voie de la bêta-caténine, qui active TSC2 en abolissant la phosphorylation inhibitrice de TSC2 par GSK3 $\beta$  (Inoki et al., 2006) ou la voie NF $\kappa$ B, puisque IKK (IkB (inhibitor of Nf $\kappa$ B) kinase) peut inactiver TSC1 par phosphorylation (Lee et al., 2007a).

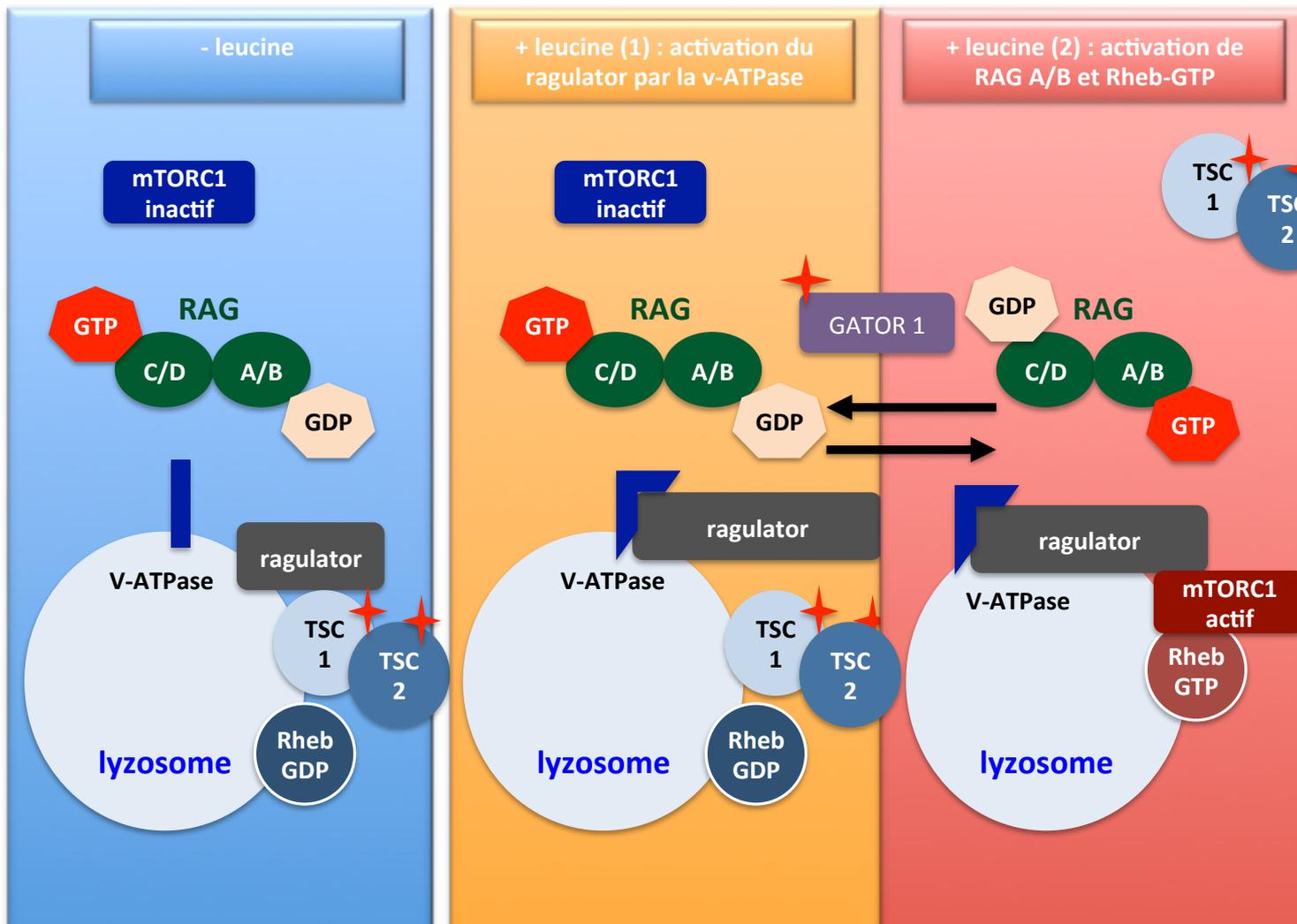
## Régulation par les conditions métaboliques

### Disponibilité en acides aminés

La présence d'acides aminés, en particulier de leucine et d'arginine, est indispensable à l'activation de mTORC1, même lorsque le complexe TSC1/TSC2 est inhibé en aval des récepteurs aux facteurs de croissance (figure 7). Le mécanisme du contrôle de l'activité de mTORC1 par la disponibilité en acides aminés a été partiellement compris récemment, et fait intervenir la famille de GTPases Rag (A-D) (Sancak et al., 2008). Rag A ou B peut former un complexe avec Rag C ou D, et le GTP peut être associé de manière exclusive soit à RagA/B soit à Rag C/D.

En présence d'acides aminés dans la lumière lysosomale, la v-ATPase (vacuolar H<sup>+</sup>-adenoside triphosphatase ATPase) active le ragulator (un complexe comprenant les protéines LAMTOR 1 à 5 (Late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and mTOR activator). Le complexe ragulator porte l'activité GEF pour Rag A/B, et permet donc le chargement de RagA/B avec du GTP (Zoncu et al., 2011) (Bar-Peled et al., 2012). Cela conduit à l'interaction des Rag avec RAPTOR et relocalise mTORC1 à la membrane des lysosomes via le ragulator (Bar-Peled et al., 2012; Sancak et al., 2010). Ainsi, en présence d'acides aminés, mTORC1 est localisé à la membrane du lysosome et peut être activé par RHEB.

Le système des Rag permet également la régulation négative de mTORC1. En l'absence d'acides aminés, les Rag sont sous la forme Rag A/B-GDP Rag C/D-GTP et recrutent TSC2 à la membrane du lysosome, ce qui permet l'inactivation de RHEB et donc de mTORC1 (Demetriades et al., 2014). Il a également été récemment démontré que les protéines DEPDC5, Nprl2 et Nprl3 forment le complexe GATOR 1 (GTPase activity toward Rag), un complexe suppresseur de tumeur stimulant l'activité GTPase de Rag A/B, régulant donc négativement mTORC1 (Bar-Peled et al., 2013). Des mutations inactivatrices de ce complexe ont été observées à une fréquence faible dans certains cancers sporadiques (adénocarcinomes ovariens et glioblastomes) et l'inactivation de ce complexe dans des lignées cellulaires permet le maintien d'une activation de mTORC1 en situation de privation en acides aminés.



**Figure 7. Régulation de mTORC1 par les acides aminés.**

En l'absence d'acides aminés (partie gauche, en bleu), Les RAG A/B sont associées au GDP alors que les RAG C/D sont associées au GTP. Elles recrutent alors TSC1/2 au lysosome, et RHEB et donc lié au GDP : mTORC1 est inactif.

En présence d'acides aminés, la v-ATPase subit un changement conformationnel qui permet l'activation du regulator (partie centrale, en orange) qui permet de charger les RAG A/B en GTP. Cela permet ainsi le recrutement de mTORC1 à proximité de RHEB-GTP et son activation (partie droite, en rouge). Le complexe GATOR 1 porte l'activité GTPase pour les RAG A/B. L'importance de ce réseau de régulation dans le cancer est soulignée par l'existence de mutations de plusieurs des gènes qui le composent (marqués par une étoile rouge), conduisant à l'activation constitutive de mTORC1.

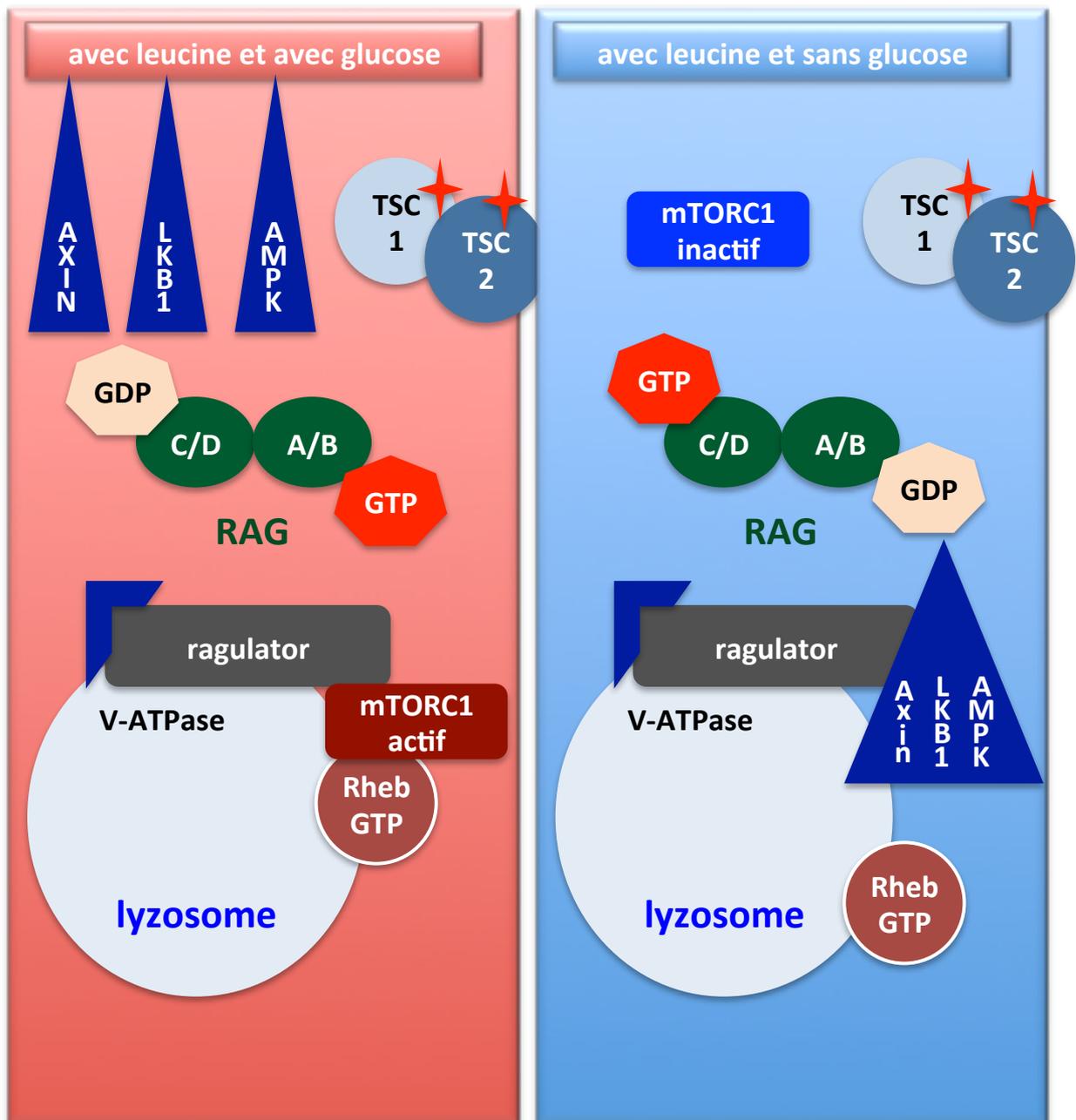
## Disponibilité en glucose

L'activation des Rag A/B par le GTP est également sensible à la concentration en glucose (figure 8). Il a été montré récemment que les souris exprimant une forme constitutivement liée au GTP de RagA mourraient d'hypoglycémie lors du sevrage en raison du maintien de l'activation de mTORC1, empêchant ainsi la production de glucose via le recyclage d'acides aminés provenant de l'autophagie (Efeyan et al., 2013). Les auteurs montrent dans ce travail que le glucose, comme les acides aminés, permet le recrutement de mTORC1 à la membrane lysosomale, sans préciser si ce mécanisme fait également intervenir la v-ATPase. Un travail plus récent a montré qu'en l'absence de glucose, le complexe axin-LKB1-AMPK interagit avec le ragulator et la v-ATPase et empêche alors l'activation de mTORC1 au lysosome, ce qui constitue donc un mécanisme potentiel de contrôle de mTORC1 par le niveau de glucose (Zhang et al.).

## Niveau énergétique

La diminution des réserves énergétiques intracellulaires est perçue par la cellule via l'augmentation du rapport AMP/ATP, qui active de manière conformationnelle l'AMPK, ce qui sera détaillé plus loin. De par le contrôle de l'activation de la traduction, l'activité de mTORC1 représente une des voies anaboliques les plus consommatrices d'énergie (Buttgereit and Brand, 1995). AMPK régule donc finement l'activité de mTORC1 de manière indirecte, en activant TSC2 par phosphorylation du résidu S 1345 (Inoki et al., 2003b) et de manière directe en phosphorylant RAPTOR sur les S 722 et 792, ce qui entraîne l'association de RAPTOR à la protéine 14-3-3 (Gwinn et al., 2008). Ainsi, l'activité de mTORC1 est inhibée en cas de carence énergétique.

Comme évoqué plus haut, il a été montré que le complexe AMPK-LKB1-Axin qui se forme en cas de carence énergétique interagit avec le complexe Ragulator et la v-ATPase. La fixation de l'axin dissocie le complexe mTORC1-ragulator et inhibe la liaison des Rag A/B au GTP, ce qui a pour effet d'inhiber mTORC1 (Zhang et al.). Ce travail permet donc de proposer une troisième voie de contrôle de mTORC1 par AMPK et désigne le lysosome comme le lieu majeur de régulation du métabolisme cellulaire.



**Figure 8. Régulation de mTORC1 par la disponibilité en glucose.**

En cas de privation en glucose, LKB1, AMPK et l'Axin forment un complexe qui interagit avec le ragulator, et empêche alors le recrutement de mTORC1 à la membrane lysosomale, même en présence d'acides aminés. De plus, ce complexe empêche la fixation du GTP sur RAG A/B, ce qui renforce l'inactivation de mTORC1.

## **Concentration en oxygène**

En cas d'hypoxie, le facteur de transcription HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor 1) stimule l'expression de REDD1 (Regulated in development and DNA damage 1). REDD 1 permet la dissociation de TSC2 de la protéine 14-3-3 par un mécanisme mal élucidé, ce qui conduit à l'inhibition de mTORC1 (Brugarolas et al., 2004; DeYoung et al., 2008).

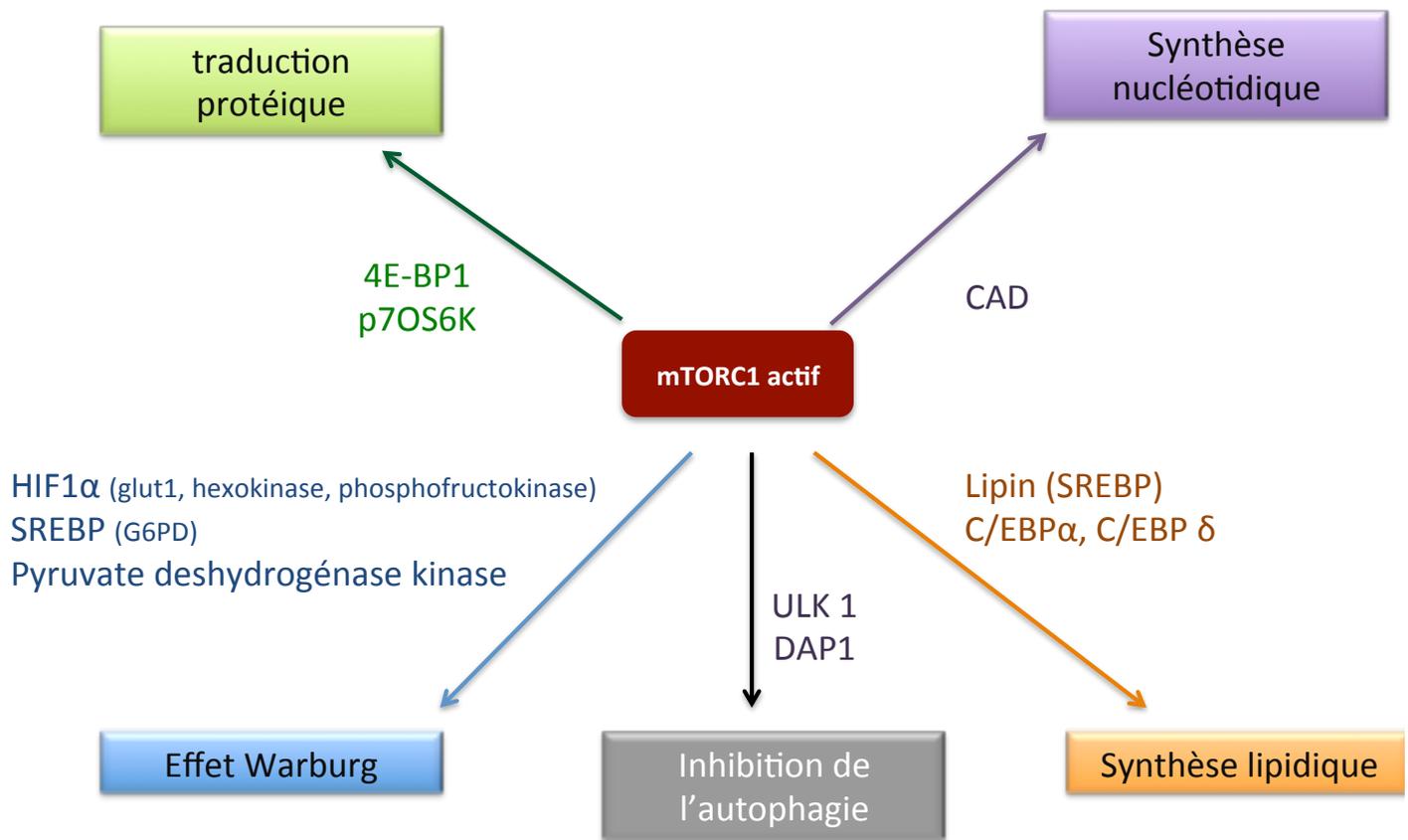
## **Stress oxydatif**

Il a récemment été montré que le stress oxydatif (induit par l'arsenic ou l' $H_2O_2$ ) inhibait mTORC1. Le mécanisme implique une interaction entre RAPTOR et l'astrin, une protéine associée aux granules de stress. Cette interaction se produit en cas de stress, et entraîne la dissociation et l'inactivation du complexe mTORC1, ce qui confère aux cellules un avantage de survie en situation de stress (Thedieck et al., 2013).

L'activation de mTORC1 permet donc aux cellules d'intégrer les signaux fournis par les facteurs de croissance avec la disponibilité en acides aminés, le niveau énergétique et la pression en oxygène. Cependant, il existe selon les types cellulaires de grandes variations dans les mécanismes mis en jeu pour réguler mTORC1, qui doivent être prises en compte dans l'interprétation des résultats expérimentaux. Cela a bien été illustré par un modèle murin d'inactivation de REDD1. Ainsi, si l'hypoxie inhibe mTORC1 via REDD1 dans les thymocytes, les cellules de la crypte intestinale ou les MEF, REDD1 n'est pas nécessaire pour l'inhibition de mTORC1 dans les hépatocytes, où c'est AMPK qui est indispensable à l'inhibition de mTORC1 en cas d'hypoxie. De même, la phosphorylation de RAPTOR par AMPK est suffisante à l'inhibition de mTORC1 dans les hépatocytes, mais pas dans les fibroblastes embryonnaires murins (MEF) ou l'activation de TSC1/2 est également nécessaire (Wolff et al., 2011).

## **Conséquences de l'activation de mTORC1**

L'activation de mTORC1 a des conséquences majeures pour le métabolisme cellulaire, en activant les processus anaboliques aux dépens des processus cataboliques (figure 9).



**Figure 9. Conséquences de l'activation de mTORC1.**

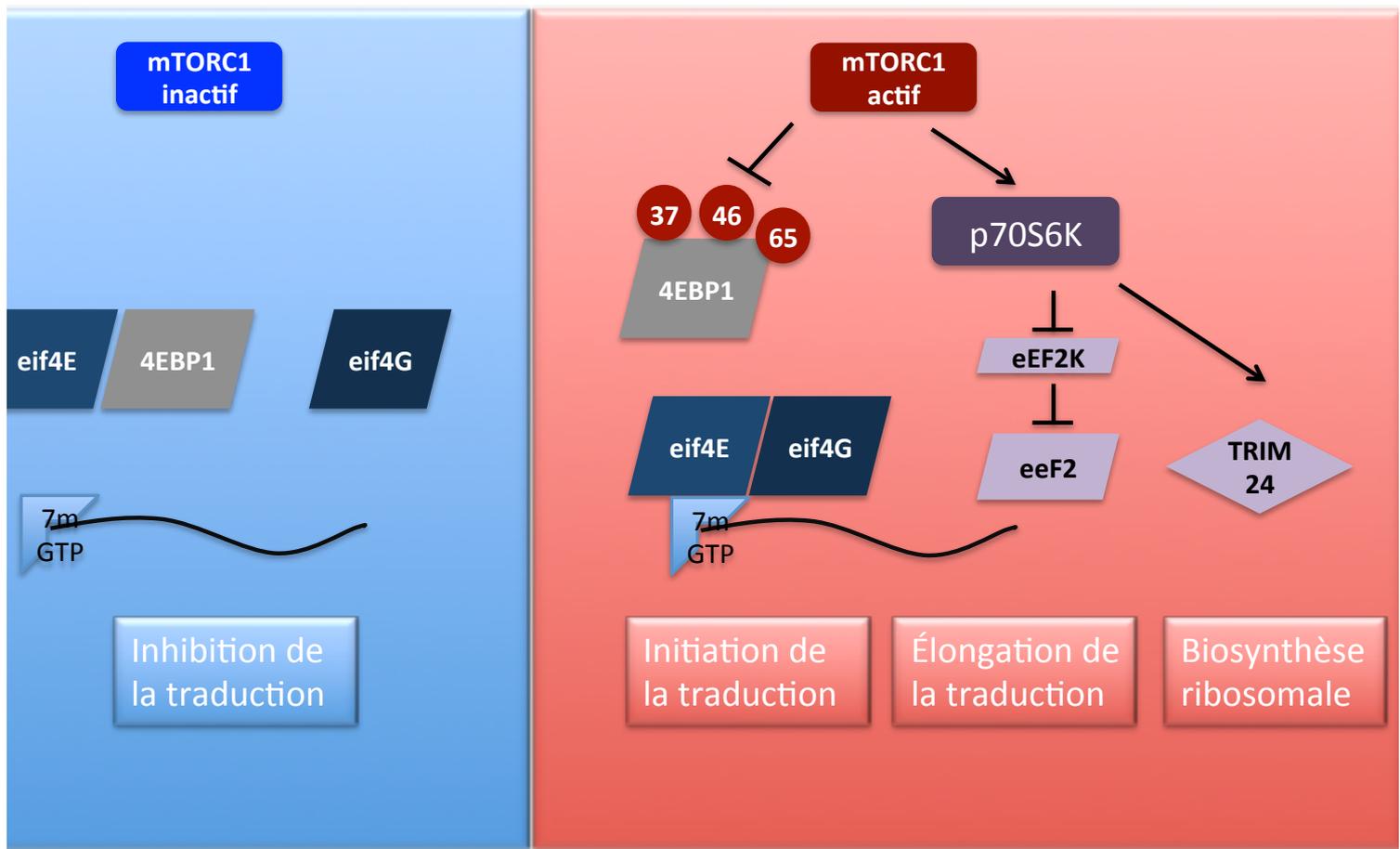
Les principales conséquences de l'activation de mTORC1 sont figurées dans les encadrés de couleur, et les intermédiaires directs ou indirects sont indiqués (se référer au texte pour plus de précisions).

## Métabolisme protidique

L'activation de la traduction protéique est probablement la conséquence la plus étudiée de l'activation de mTORC1 (figure 10). Cela implique deux cibles directes de mTORC1 que sont la p70S6 kinase et 4E-BP1 (eIF4E (eukaryotic translation initiation factor 4E) – binding protein 1).

eIF4E est une protéine qui se lie aux coiffes 5' 7 méthyl-GTP des ARN messagers, où elle s'associe à eIF4G pour former le complexe eIF4F, qui recrutera les autres protéines du complexe d'initiation de la traduction (cf. infra). La liaison d'eIF4E aux ARN messagers est inhibée par la protéine 4E-BP1 à l'état non phosphorylée, eIF4E et 4E-BP1 formant alors des complexes inactifs. mTORC1, en phosphorylant 4E-BP1 sur plusieurs résidus (T37, T46, S65), empêche l'association de 4E-BP1 avec eIF4E et permet donc la formation du complexe d'initiation de la traduction (Brunn et al., 1997). Une analyse des ARNm dont la traduction est contrôlée par mTORC1 a récemment été effectuée par la technique du ribosome footprinting, qui permet d'apprécier quels sont les ARN messagers en cours de traduction (Thoreen et al., 2012). Cette étude a démontré que mTORC1 contrôle la traduction des ARNm contenant une séquence de quelques bases pyrimidiques en position 5' (5' TOP), et confirme le rôle essentiel de 4E-BP1 dans ce processus.

La phosphorylation de p70S6K va également favoriser la traduction, notamment en stimulant la synthèse des ARN ribosomiaux via l'activation de TRIM24 (Tripartite motif-containing 24) qui interagit avec l'ARN polymérase de type 1 (Mayer et al., 2004), ou en activant de manière indirecte des facteurs d'élongation de la traduction comme par exemple eEF2 (eukaryotic elongation factor 2) (Wang et al., 2001).



**Figure 10. Contrôle de la traduction protéique par mTORC1.**

L'activation de mTORC1 favorise la traduction protéique en permettant la formation du complexe d'initiation de la traduction des ARN ayant une coiffe 7-méthyl-GTP (via l'inhibition de 4E-BP1). De plus, mTORC1 active p70S6K, qui favorise l'élongation des peptides via le contrôle indirect d'eEF2 et la biosynthèse ribosomale via TRIM 24.

## **Métabolisme lipidique**

La synthèse de lipides permet aux cellules de synthétiser de nouvelles membranes indispensables à leur prolifération et représente également une forme de stockage énergétique. L'implication de mTORC1 dans la synthèse lipidique a été montrée initialement en réponse à l'insuline. La fixation de l'insuline sur son récepteur stimule en effet la voie PI3K et finalement promeut la translocation nucléaire de SREBP 1c (Sterol responsive element binding protein 1c), un facteur de transcription favorisant l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse lipidique. Il a été démontré que cet effet est aboli par la rapamycine ou par l'inactivation de RAPTOR (Porstmann et al., 2008). Le mécanisme de contrôle des SREBP par mTORC1 fait intervenir la lipin, qui inhibe l'activité transcriptionnelle des SREBP dans le noyau. mTORC1 phosphoryle la lipin, ce qui entraîne sa séquestration dans le cytoplasme et permet donc aux facteurs SREBP d'exercer leur activité transcriptionnelle (Peterson et al., 2011). Par ailleurs, mTORC1 contrôle également via 4E-BP1 le niveau d'expression de C/EBP $\alpha$  et C/EBP $\delta$ , qui favorisent également la transcription de gènes lipogéniques en s'associant à PPAR- $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor) (Laplante and Sabatini, 2009).

## **Métabolisme glucidique**

Grâce à une étude transcriptomique et métabolomique, Düvel et collègues ont pu mettre en évidence les conséquences métaboliques de l'activation de mTORC1 et les mécanismes transcriptionnels sous-jacents (Düvel et al., 2010). En augmentant la traduction du facteur de transcription HIF1 $\alpha$ , mTORC1 favorise l'expression des gènes impliqués dans la captation de glucose (GLUT1) et dans la glycolyse (hexokinases, phosphofructokinases, LDHA). De même, mTORC1 favorise l'expression des gènes impliqués dans la voie des pentoses phosphates (G6PD) via les facteurs de transcription SREBP.

Dans cette même étude, il a été montré un contrôle transcriptionnel de la pyruvate deshydrogénase kinase par mTORC1. Cette enzyme inhibe la pyruvate deshydrogénase et diminue ainsi l'utilisation du pyruvate comme substrat du cycle de Krebs. mTORC1 apparait donc comme une kinase favorisant l'effet Warburg, puisqu'elle stimule la captation de glucose, son utilisation dans la glycolyse et non dans la phosphorylation oxydative, et l'utilisation des intermédiaires de la glycolyse dans la voie des pentoses phosphates.

Cependant, une autre étude a montré que mTORC1 favorisait la biogénèse mitochondriale en permettant l'association de PGC1 $\alpha$  (PPAR- $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$ ) et YY1 (Ying Yang 1) (Cunningham et al., 2007). Notons que ce résultat n'a pas été confirmé, et que la possibilité d'une localisation nucléaire de l'ensemble du complexe mTORC1 reste débattue.

## **Métabolisme nucléotidique**

Deux études récentes ont mis en évidence la phosphorylation de CAD (carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamoylase, dihydroorotase) sur le résidu S 1859 par la p70S6K en aval de mTORC1 (Robitaille et al., 2013; Ben-Sahra et al., 2013). CAD est une protéine portant les trois premières étapes enzymatiques de la synthèse des bases pyrimidiques et la phosphorylation de son résidu 1859 est indispensable à l'activité dihydroorotase, probablement en permettant l'oligomérisation de CAD.

Par ailleurs, et de manière indirecte, l'activation de la voie des pentoses phosphates par mTORC1 fournit aux cellules du ribose, qui permet la synthèse des bases puriques ou pyrimidiques.

## **Inhibition de l'autophagie**

L'autophagie est un processus cellulaire conservé parmi les eucaryotes, par lequel les cellules convoient une partie de leur matériel cytoplasmique (cytosol, organelles, protéines) dans des structures ayant une double-membrane (les autophagosomes) vers les lysosomes, où ce matériel est dégradé. mTORC1 est un inhibiteur de l'autophagie ce qui sera exposé en détail dans le chapitre consacré à l'autophagie.

### ***Inhibition pharmacologique de mTORC1***

#### **Rapamycine**

mTORC1 a été initialement découvert comme étant la cible de la rapamycine. Ce macrolide agit en se liant à la protéine FKBP12 (12kDa FK506-binding protein) pour former un complexe qui inhibe l'activité de mTORC1 en s'associant au domaine FRB (FKBP rapamycin binding) de mTOR (Sabatini et al., 1994). Ce complexe pourrait agir en dissociant le complexe mTORC1 (Yip et al., 2010), ou comme inhibiteur allostérique de l'activité de la kinase mTOR.

Il a été observé dans plusieurs modèles une différence de sensibilité des substrats de mTORC1 à la rapamycine. Par exemple, la rapamycine inhibe totalement la phosphorylation de la p70S6K, mais pas ou peu la phosphorylation de 4EBP1 (Tamburini et al., 2009; Thoreen et al., 2009). L'explication de ce phénomène a été apportée récemment. En effet, l'activité de mTORC1 sur ses différentes cibles est modulée par la séquence peptidique du substrat : mTORC1 phosphoryle préférentiellement les résidus sérine par rapport aux résidus thréonine et mTORC1 phosphoryle d'autant plus son substrat si l'acide aminé en position +1 est une proline ou un résidu hydrophobe. De ce fait, les cibles pour lesquelles mTORC1 a une grande activité sont résistantes à la rapamycine, alors que celles pour lesquelles mTORC1 a une activité moindre y sont sensibles (Kang et al., 2013).

En clinique, la rapamycine et ses dérivés (sirolimus, everolimus) ont un profil de tolérance favorable qui a conduit à leur autorisation de mise sur le marché par la FDA (Food and drug administration) en 2008 comme agent immunosuppresseur chez les patients transplantés. Elle a depuis bénéficié d'autres indications, en particulier comme agent anticancéreux (lymphome du manteau en rechute, cancer du rein en rechute, etc.).

### **Inhibiteurs catalytiques**

Cependant, des mécanismes de résistance à la rapamycine ont pu être mis en évidence dans les cellules cancéreuses. En particulier, l'inhibition de mTORC1 entraîne une activation de la voie PI3K/Akt en supprimant l'inhibition d'IRS1 (insulin receptor substrate 1) par la p70S6K (Harrington et al., 2004). Comme l'activation d'Akt est également contrôlée par mTORC2, cette observation a justifié le développement d'inhibiteurs catalytiques de mTOR (capables d'inhiber les deux complexes mTORC1 et mTORC2) afin de supprimer l'activation de la voie PI3K secondaire à l'inhibition de mTORC1. Différents inhibiteurs ont été testés in vitro, dont la Torin-1 (Thoreen et al., 2009), les composés PP242 et PP30 (Feldman et al., 2009), le Ku-0063794 (García-Martínez et al., 2009), ou l'AZD8055 (Chresta et al., 2010). Ces composés inhibent mieux l'activité de mTORC1 puisqu'ils inhibent également les cibles résistantes à la rapamycine (Kang et al., 2013) et inhibent comme attendu l'activité de mTORC2. Parmi ces différents composés, seul l'AZD8055 est en cours de développement clinique précoce en oncologie.

## ***mTORC1 et LAM***

L'activation constitutive de mTORC1, mesurée par le niveau de phosphorylation de p70S6K et/ou de 4EBP1 en situation de privation en sérum a été décrite dans quasiment tous les échantillons primaires de LAM (Récher et al., 2005; Xu et al., 2005).

Le mécanisme d'activation de mTORC1 dans cette pathologie n'est pas encore connu. En effet, il n'existe pas de mutation récurrente des gènes régulant la voie mTORC1 dans les LAM comme cela a pu être montré dans d'autres cancers (Kandoth et al., 2013). Même si la voie PI3K/Akt est activée dans de nombreux échantillons, celle-ci ne semble pas responsable de l'activation de mTORC1 puisque l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la PI3K (IC87114) n'entraîne pas d'inhibition de mTORC1 (Tamburini et al., 2008). De manière intéressante, la src-kinase Lyn a été retrouvée activée dans les échantillons primaires de LAM et son inhibition par un composé chimique (P42) ou par siRNA entraînait une inhibition de mTORC1 (Dos Santos et al., 2008). Les mécanismes en jeu ne sont en revanche pas élucidés à ce jour.

Le rôle physiopathologique de l'activation de mTORC1 dans les LAM a pu être apprécié par des modèles d'inhibition ou d'invalidation génétique. Dans les échantillons primaires, l'inhibition de mTORC1 par la rapamycine inhibe la prolifération et la clonogénicité, sans entraîner d'apoptose (Récher et al., 2005) et sans diminuer le niveau de traduction (Tamburini et al., 2009). Cependant, la rapamycine ne permet pas d'apprécier l'ensemble des processus contrôlés par mTORC1 puisque elle n'inhibe que partiellement ce complexe (cf. supra). De plus, les éventuels effets apoptotiques de l'inhibition de mTORC1 sont probablement atténués par un effet de rétrocontrôle positif sur la voie PI3K via une boucle autocrine IGF1 (insulin growth factor 1) / IGF1R (insulin growth factor 1 receptor) (Chapuis et al., 2010). En effet, l'utilisation d'inhibiteurs ciblant à la fois mTORC1 et PI3K (PI-103) (Park et al., 2008) ou ciblant mTORC1 et mTORC2 (AZD8055) (Willems et al., 2012) entraîne des taux d'apoptose significatifs parmi les cellules primaires de LAM en culture.

L'invalidation conditionnelle de RAPTOR dans un modèle murin de LAM a permis de mieux cerner le rôle de mTORC1 dans cette pathologie (Hoshii et al., 2012). Dans un modèle de transformation de cellules souches hématopoïétiques LSK (Lin<sup>-</sup>, Sca1<sup>+</sup>, c-kit<sup>+</sup>) par le gène de fusion *MLL-AF9*, des auteurs ont inactivé RAPTOR in vivo grâce à une recombinaise Cre inducible. Même si la délétion de RAPTOR conduit à une augmentation de la survie des souris, soulignant le bénéfice thérapeutique potentiel de l'inhibition de mTORC1, l'envahissement médullaire persiste, composé de cellules leucémiques plus immatures (c-Kit positives). Dans ces cellules leucémiques immatures,

l'inhibition de mTORC1 est complète après délétion de RAPTOR mais ne conduit ni à une diminution de taille des cellules, ni à une inhibition de la traduction. Enfin, malgré un effet sur la prolifération des cellules leucémiques, la délétion de RAPTOR ne compromet pas les capacités d'autorenouvellement des cellules souches leucémiques, suggérant que l'inhibition de mTORC1 ne serait pas suffisante à elle seule pour obtenir une guérison dans les LAM.

Les modèles conduisant à une activation de mTORC1 dans les cellules souches hématopoïétiques nous apportent également des informations sur le rôle de cette voie de signalisation dans ce compartiment cellulaire. Plusieurs stratégies ont été décrites, telles que l'activation de la voie PI3K/Akt par l'invalidation de PTEN (Yilmaz et al., 2006) ou l'utilisation d'une forme constitutivement active d'Akt par myristoylation (myr-Akt) (Kharas et al., 2010), l'invalidation des inhibiteurs de mTOR tels que TSC1 (Chen et al., 2008; Gan et al., 2008) ou LKB1 (Gurumurthy et al., 2010; Nakada et al., 2010, Gan et al., 2010). Il faut noter qu'aucun de ces modèles ne réalise une activation isolée de mTORC1 et c'est pourquoi chacune de ces études a recours à la rapamycine pour apprécier la part du phénotype liée à l'activation de mTORC1. De manière très intéressante, il est rapporté dans chacune de ces études une mise en cycle des cellules souches hématopoïétiques, conduisant à leur épuisement caractérisé par une insuffisance médullaire et une diminution des capacités à reconstituer l'hématopoïèse chez les souris après irradiation. Le rôle de mTORC1 est majeur, puisque le traitement par rapamycine corrige le phénotype, à l'exception notable des modèles d'invalidation de LKB1 où la rapamycine est sans effet sur l'hématopoïèse. Enfin, le rôle oncogénique de l'activation de mTORC1 dans les cellules souches hématopoïétiques est suggéré dans les modèles qui activent la voie PI3K/Akt (délétion de PTEN ou utilisation du myr-Akt). En effet, les deux études décrivent l'apparition de syndromes myéloprolifératifs, et également de lymphomes T dans le modèle myr-Akt. Le rôle de mTORC1 dans l'oncogenèse y est fortement suggéré par l'effet protecteur de la rapamycine.

## La voie AMPK

AMPK (AMP-Activated protein kinase) est un complexe hétérotrimérique activé en cas de diminution des réserves énergétiques intracellulaires. Cette activité kinase a été identifiée en 1987 dans le laboratoire de DG Hardie comme étant la kinase régulant l'activité d'ACC (acétyl-CoA carboxylase) et de l'HMGR (3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coA réductase) (Carling et al., 1987). L'importance de ce complexe dans les cellules eucaryotes est soulignée par sa conservation à travers les espèces à l'exception d'*Encephalitozoon cuniculi* (un parasite intracellulaire obligatoire caractérisé également par l'absence de mitochondrie) (Hardie, 2011). L'activation d'AMPK conduit globalement à promouvoir les processus cataboliques et à réprimer les processus anaboliques, ce qui a pour effet de maintenir le niveau énergétique des cellules. Nous allons présenter les mécanismes d'activation d'AMPK et les outils pharmacologiques permettant d'activer ce complexe, les conséquences de son activation sur la signalisation intracellulaire et le métabolisme et son rôle dans l'oncogenèse.

### **Structure du complexe AMPK**

AMPK est composé d'une sous unité catalytique  $\alpha$  pour laquelle il existe deux isoformes ( $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ ), d'une sous unité adaptatrice  $\beta$  pour laquelle il existe 2 isoformes ( $\beta 1$  et  $\beta 2$ ), et d'une sous unité régulatrice  $\gamma$  pour laquelle il existe 3 isoformes ( $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  et  $\gamma 3$ ). Les cellules hématopoïétiques n'expriment que l'isoforme catalytique  $\alpha 1$ .

Au plan structurel, les sous unités  $\alpha$  sont composées d'un domaine kinase en N-terminal, contenant dans sa boucle d'activation une thréonine (T 172) dont la phosphorylation est essentielle à l'activation d'AMPK (Hawley et al., 1996), et d'une région C-terminale qui permet la liaison aux autres sous unités du complexe. Les sous unités  $\beta$  contiennent un domaine C terminal qui permet la liaison aux sous unités  $\alpha$  et  $\gamma$ , un domaine CBM (Carbohydrate Binding Module) qui permet l'association au glycogène et un domaine N-terminal pouvant être myristoylé, ce qui inhibe AMPK en l'absence d'AMP (Oakhill et al., 2010), ou phosphorylé sur la S 108, ce qui active AMPK (Warden et al., 2001). Les sous unités  $\gamma$  contiennent quatre domaines CBS (Cystathionin-  $\beta$ -synthase) capables de lier des nucléotides à adénine, dont les domaines 1 et 3 qui peuvent lier ces nucléotides de façon

réversible (Xiao et al., 2007). Le domaine 2 ne semble pas lier de nucléotide, alors que le domaine 4 est constitutivement associé à l'AMP.

### **Mécanismes d'activation d'AMPK**

L'activation d'AMPK fait intervenir deux voies qui sont d'une part les nucléotides à adénine reflétant le niveau énergétique et d'autre part les kinases LKB1 et CaMKK $\beta$  (calcium/calmodulin dependent protein kinase kinase  $\beta$ ) (figure 11).

#### **Activation par les nucléotides à adénine**

L'hydrolyse de l'ATP (adénosine triphosphate) en ADP (adénosine diphosphate) étant le principal substrat énergétique des cellules, il n'est pas étonnant que l'évolution ait sélectionné un système enzymatique régulateur du métabolisme sensible à ces variations. Il a longtemps été considéré que le ratio AMP/ATP était le principal régulateur de l'activité d'AMPK, puisque l'on pensait que les concentrations en ADP étaient négligeables du fait de l'activité adénylate kinase qui transforme deux molécules d'ADP en une molécule d'ATP et une molécule d'AMP (adénosine monophosphate). Plus récemment il a été démontré que l'ADP peut également activer AMPK (Oakhill et al., 2011; Xiao et al., 2011) et l'effet de ce nucléotide pourrait en fait être plus important que celui de l'AMP dans les conditions physiologiques (Bland and Birnbaum, 2011).

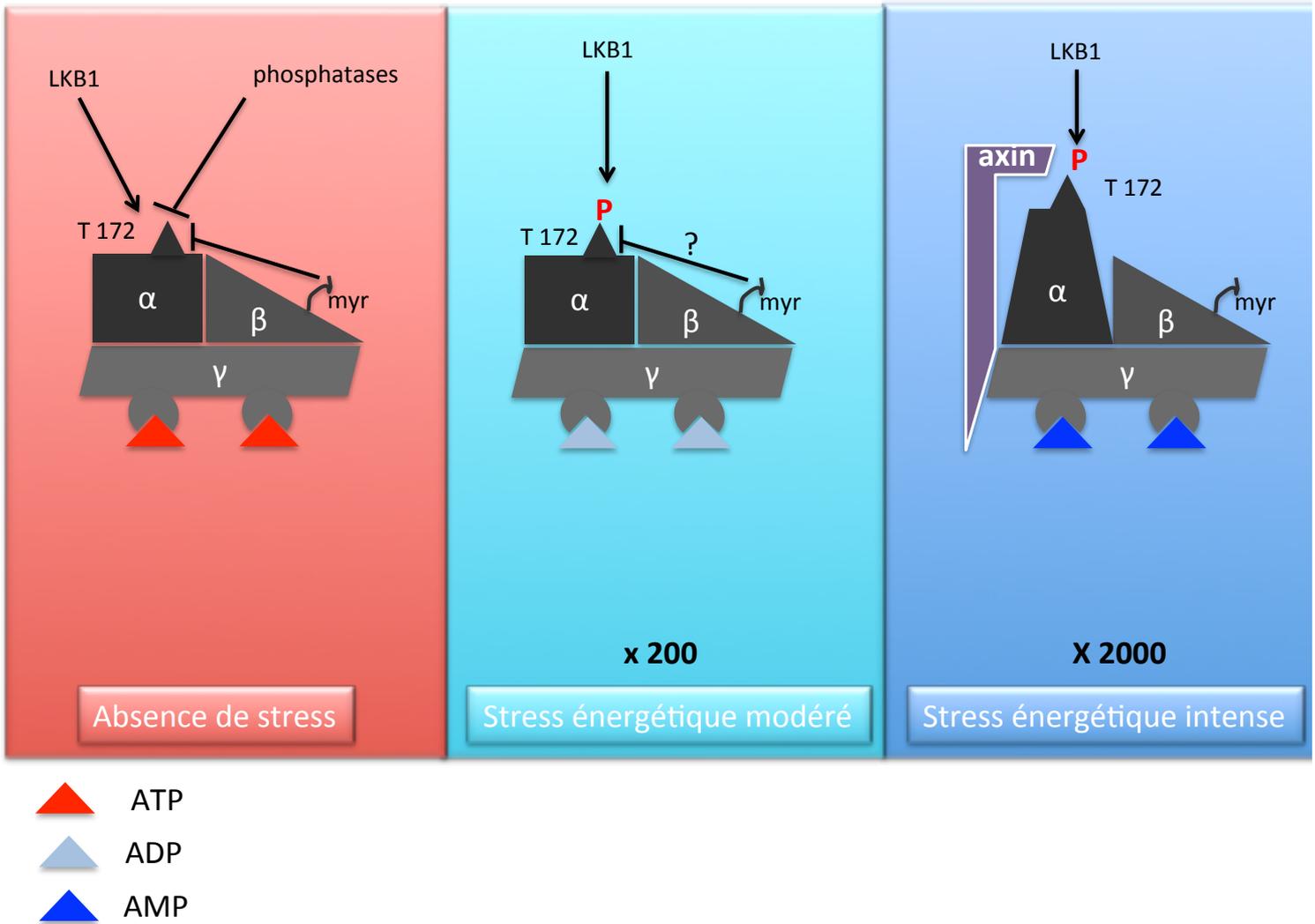
En situation normale, la concentration intracellulaire en ATP étant supérieure à celle en AMP, les domaines CBS 1 et 3 sont liés à l'ATP et le complexe AMPK est inactif. En situation de stress énergétique (augmentation du rapport AMP/ATP et ADP/ATP), l'AMP se fixe aux domaines CBS, ce qui va conduire à l'activation d'AMPK selon quatre mécanismes :

- activation allostérique augmentant d'un facteur 2 à 3 l'activité d'AMPK (Suter et al., 2006)
- levée de l'inhibition de la phosphorylation de la T 172 d'AMPK  $\alpha$  associée à la myristoylation de la sous unité  $\beta$  (Oakhill et al., 2010)
- protection de la T 172 d'AMPK  $\alpha$  vis-à-vis des phosphatases (PP2c dans les tests *in vitro*) (Oakhill et al., 2010)
- Récemment, il a également été montré que l'AMP (et non l'ADP) augmente l'affinité d'AMPK pour l'axin, et permet ainsi la colocalisation de LKB1 et AMPK via un

complexe AMPK-Axin-LKB1. Ce complexe est essentiel à l'activation d'AMPK en cas de carence énergétique puisque l'inactivation de l'axin compromet l'activation d'AMPK en réponse au 2 déoxyglucose (2 DG) ou à l'AICAR (aminoimidazole carboxamide ribonucleotide) (Zhang et al., 2013)

On estime que la phosphorylation de la T 172 permet une activation d'AMPK d'un facteur 200 et que l'activation allostérique par l'AMP multiplie cette activation par un facteur 10, ce qui permet au total une variation très importante du niveau d'activité du complexe (Hardie, 2011).

La découverte de la fixation de l'ADP aux domaines CBS a permis d'affiner ce modèle (Bland and Birnbaum, 2011). En effet, l'ADP n'est pas un activateur allostérique de l'AMPK, mais protège la T 172 de la déphosphorylation, réalisant une activation partielle d'AMPK. Ainsi, en situation de stress énergétique modéré, c'est probablement l'ADP qui se lie préférentiellement aux domaines CBS, activant partiellement AMPK. En situation de stress majeur, la fixation d'AMP aux domaines CBS permet l'activation maximale de l'AMPK.



**Figure 11. Activation de l'AMPK en conditions de stress énergétique.**

La phosphorylation d'AMPK  $\alpha$  (T 172) est assurée par l'activité constante de la kinase LKB1. En l'absence de stress énergétique (en rouge, à gauche), les domaines CBS de la sous-unité  $\gamma$  sont occupés par l'ATP. La phosphorylation de la sous unité  $\alpha$  (T172) est inhibée par des phosphatases et par la myristoylation de la sous unité  $\beta$ .

En cas de stress modéré (bleu clair, au milieu), la fixation d'ADP sur les domaines CBS inhibe l'action des phosphatases permettant une augmentation de la phosphorylation d'AMPK  $\alpha$  (T172), ce qui l'active d'un facteur 200 environ.

En cas de stress énergétique intense (en bleu foncé, à droite), la fixation d'AMP aux domaines CBS active AMPK de manière allostérique (figurée par le changement de forme de la sous-unité  $\alpha$ ), augmente la phosphorylation d'AMPK  $\alpha$  (T172) en levant l'effet inhibiteur de la sous-unité  $\beta$  myristoylée, et permet la formation du complexe AMPK-LKB1-AXIN, réalisant une activation maximale d'AMPK.

## Activation par les kinases LKB1 et CaMKK $\beta$

Il existe deux kinases qui phosphorylent AMPK  $\alpha$  sur le résidu T 172 : LKB1, dont l'activité est essentielle en cas de variation du rapport AMP/ATP et CaMKK  $\beta$  qui s'active en réponse à l'augmentation du calcium cytosolique. TAK1 (TGF  $\beta$  activated kinase) représente une troisième kinase d'AMPK qui a été initialement identifiée dans un crible génétique chez la levure (Momcilovic et al., 2006), puis décrite comme la kinase d'AMPK en réponse au TRAIL (Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand) (Herrero-Martín et al., 2009), mais la relevance de cette observation est probablement limitée à certains types cellulaires.

### LKB1

LKB1 (Liver Kinase B1) a été identifiée comme le gène suppresseur de tumeur responsable du syndrome de Peutz-Jeghers, une phacomatose qui associe la présence d'hamartomes gastro-intestinaux, une prédisposition au cancer et des anomalies de la pigmentation (Hemminki et al., 1998). Par la suite, des mutations de ce gène ont été identifiées dans des cancers sporadiques, en particulier les cancers du poumon non à petites cellules (environ 30% des cas) (Sanchez-Cespedes et al., 2002) ou les cancers du col utérin (environ 20% des cas) (Wingo et al., 2009).

LKB1 forme un complexe avec la pseudo-kinase STRAD (STE20-related adaptor) et la protéine adaptatrice MO25 (Mouse proteine 25), qui permet sa localisation cytoplasmique (Dorfman and Macara, 2008) et son activation constitutive (Zeqiraj et al., 2009). Son rôle dans l'activation d'AMPK a été mis en évidence par plusieurs équipes (Hawley et al., 2003; Shaw et al., 2004; Woods et al., 2003).

Il faut noter que LKB1 a de nombreux autres substrats (Lizcano et al., 2004), qui permettent d'expliquer des divergences de phénotype entre les invalidations de LKB1 et d'AMPK. Ces AMPK related kinases (ARK) ont des similarités structurelles (Sun et al., 2013), et comprennent plusieurs familles :

- NUAK 1 (ou ARK5) et NUAK 2 (SNARK). Il a été proposé un rôle oncogénique pour NUAK 1 dans un modèle de mélanome (Namiki et al., 2011) et NUAK 2 aurait un rôle indispensable à la survie des cellules au stress métabolique induit par la transformation par c-myc (Liu et al., 2012).
- Les MARK (Microtubule associated protein regulating kinase) comprennent 4 membres (1 à 4), impliqués dans la mise en place de la polarité cellulaire via la protéine Tau et le réseau de microtubules (Drewes et al., 1997).
- BRSK 1 et 2 (Brain specific kinase, aussi appelées SAD A et B), qui jouent un rôle essentiel dans la polarisation neuronale (Kishi et al., 2005)
- SIK 1 à 3 (Salt Inducible Kinase). SIK 1 joue un rôle important dans l'apoptose induite par le détachement des cellules (anoïkis), via p53 (Cheng et al., 2009). Les protéines SIK jouent également un rôle dans le contrôle de la néoglucogénèse hépatique, puisque leur inhibition stimule la néoglucogénèse de la même manière que l'inactivation hépatique de LKB1 (Patel et al., 2014).

MELK (maternal embryonic leucine zipper kinase) fait partie des AMPK related kinase du fait d'une structure proche des autres membres de la famille, mais n'est pas activée par LKB1 in vitro. Elle semble être oncogénique dans de nombreux cancers (Cheng et al., 2009) et pourrait également jouer un rôle important dans la survie des cellules souches cancéreuses (Joshi et al., 2013).

L'étude des modèles murins d'inactivation de LKB1 a permis de mieux comprendre son rôle. Alors que la délétion homozygote est létale au stade embryonnaire, l'inactivation hétérozygote chez la souris réalise un tableau clinique proche du syndrome de Peutz-Jeghers (Bardeesy et al., 2002). De façon intéressante, les fibroblastes issus de ces souris sont paradoxalement particulièrement résistants à la transformation par l'oncogène H-ras, suggérant que le rôle suppresseur de tumeur de LKB1 est complexe, dépendant du stade atteint au cours du processus de transformation. Dans les cellules souches hématopoïétiques, trois équipes ont publié simultanément le phénotype de l'inactivation de LKB1 dans ce compartiment (Gan et al., 2010; Gurumurthy et al., 2010; Nakada et al., 2010), qui rappelle celui observé dans les modèles d'activation de mTORC1 : sortie de quiescence des cellules souches hématopoïétiques conduisant à la disparition de ces cellules et à l'insuffisance médullaire. Le mécanisme reste mal élucidé, mais il apparaît clair que cela ne fait pas intervenir AMPK puisque l'inactivation d'AMPK n'a pas d'effet sur la maintenance des cellules souches hématopoïétiques (Nakada et al., 2010), ni mTORC1 puisque la rapamycine ne corrige pas le phénotype.

## CaMKK $\beta$

En l'absence de modification du rapport AMP/ATP ou ADP/ATP, AMPK peut être activé par la CaMKK $\beta$  lorsque la concentration en calcium cytosolique augmente (Hawley et al., 2005). Ce mécanisme semble particulièrement important dans certains types cellulaires, tels que les neurones, les cellules endothéliales ou les lymphocytes T. Il a été suggéré de manière finaliste que l'élévation de la concentration en calcium pourrait être un reflet de processus métaboliques consommateurs d'énergie et donc un système permettant d'anticiper la réduction des stocks énergétiques intracellulaires (Hardie, 2011).

### Activation pharmacologique

Il existe de nombreux agents capables d'activer AMPK, selon des mécanismes d'action très différents. Grâce à l'utilisation d'un mutant d'AMPK  $\gamma$  R531G dont l'activité est indépendante de la fixation d'AMP sur les sous unités CBS, on a pu identifier que certaines molécules activent AMPK via la fixation d'AMP aux domaines CBS puisqu'ils sont inactifs sur ce mutant. C'est le cas des biguanides, du resveratrol (augmentation du rapport AMP/ATP) ou de l'AICAR (métabolisé en ZMP, un AMP-mimétique), ou du composé 13 (agoniste de l'AMP). D'autres agents gardent toute leur efficacité sur les mutants R531G, et activent donc AMPK de manière indépendante du domaine CBS, tels que l'A769662 ou le salicylate. Enfin, l'activation d'AMPK par un inophore du calcium (A23187) est inhibée par le STO609, attestant que les effets de cet activateur sont médiés par la CaMKK  $\beta$ .

### Biguanides

Les biguanides (metformine, phenformine) sont une classe thérapeutique majeure, puisque la metformine est l'antidiabétique oral le plus prescrit dans le monde et cela depuis longtemps puisque *Galega officinalis* était déjà utilisée pour traiter le diabète au moyen âge. Son principe actif est la galégine (isoamylène guanidine), un dérivé de la guanidine, et les biguanides sont des molécules de synthèse combinant deux guanidines. La metformine entre dans la cellule par un transporteur actif OCT1 ou 2 (organic transporter cation), alors que la phenformine entre de manière passive (Hawley et al., 2010). Leur mécanisme d'action le mieux décrit est l'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (El-Mir et al., 2000; Owen et al., 2000), ce qui conduit à l'augmentation du rapport AMP/ATP et donc à l'activation

d'AMPK. Cependant, leur mode d'action est complexe et de nouvelles cibles enzymatiques de ces molécules ont encore été identifiées très récemment, comme l'AMP déaminase (Ouyang et al., 2011) ou la glycerophosphate deshydrogénase mitochondriale (Madiraju et al., 2014).

Il faut également noter que de nombreux effets des biguanides qui étaient initialement attribués à leur effet activateur d'AMPK peuvent en fait être expliqués par d'autres relais de signalisation. Ainsi, il a été démontré que l'inhibition de mTORC1 par la metformine pourrait faire intervenir les RAG GTPases (Kalender et al., 2010), ou REDD1 (Ben Sahra et al., 2011) indépendamment d'AMPK.

Des études épidémiologiques de patients traités par metformine ont permis de mettre en évidence une réduction significative de l'incidence de certains cancers (Bowker et al., 2006; Evans et al., 2005) et plusieurs mécanismes ont pu être évoqués pour expliquer cette observation (Hardie, 2013) : (1) les biguanides entraînent une diminution des taux de facteurs de croissance oncogéniques circulants, tels l'IGF 1 ou l'insuline, (2) les biguanides activent AMPK, qui a des propriétés de suppresseur de tumeur et (3) les biguanides entraînent un stress énergétique qui est délétère pour les cellules cancéreuses. C'est la troisième hypothèse qui est actuellement privilégiée, depuis des travaux qui ont démontré une sensibilité exquise à la phenformine des cancers délétés pour LKB1, du fait d'une incapacité de ces cancers à s'adapter au stress métabolique lié à l'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale (Shackelford et al., 2013).

## **Resveratrol**

Le resveratrol est un composé antioxydant initialement isolé du vin rouge, qui inhibe l'ATP synthase et active donc AMPK en diminuant la production d'ATP mitochondriale (Gledhill et al., 2007).

## **AICAR**

L'AICAR est un analogue de l'adénosine, convertit par l'adénosine kinase en ZMP, qui peut activer AMPK selon les trois mécanismes observés avec l'AMP, bien que de façon moins importante (Corton et al., 1995). L'AICAR étant un métabolisé en un analogue de l'AMP, il est également capable d'inhiber d'autres enzymes dépendantes de l'AMP, telle que la fructose-1-6 bisphosphatase 1 (Vincent et al., 1991). L'AICAR a été testé dans un essai de phase I/II (Van Den Neste et al., 2013) chez des patients atteints de leucémie lymphoïde

chronique, ce qui a permis de déterminer la dose maximale tolérée et d'observer quelques réponses partielles. Notons enfin que les chimiothérapies anti-folates utilisées en cancérologie telles que le méthotrexate et le pemetrexed inhibent l'AICAR transformylase, enzyme qui dégrade le ZMP produit par les cellules lors de la synthèse des nucléotides puriques. Il n'est donc pas exclu qu'une partie des effets anticancéreux de ces chimiothérapies soit expliquée par l'activation d'AMPK par le ZMP ainsi accumulé (Allegra et al., 1985).

## **Composé 13**

Le composé 13 a été récemment décrit comme un analogue de l'AMP, qui active AMPK  $\alpha 1$  de manière allostérique et en protégeant la T 172 de la déphosphorylation. La spécificité de ce composé pour la sous-unité  $\alpha 1$  provient de la séquence peptidique reliant le domaine auto-inhibiteur au domaine C terminal, puisque l'insertion de cette séquence sur AMPK  $\alpha 2$  est suffisante pour que le composé 13 soit actif sur AMPK  $\alpha 2$ . (Hunter et al., 2014).

## **A769662**

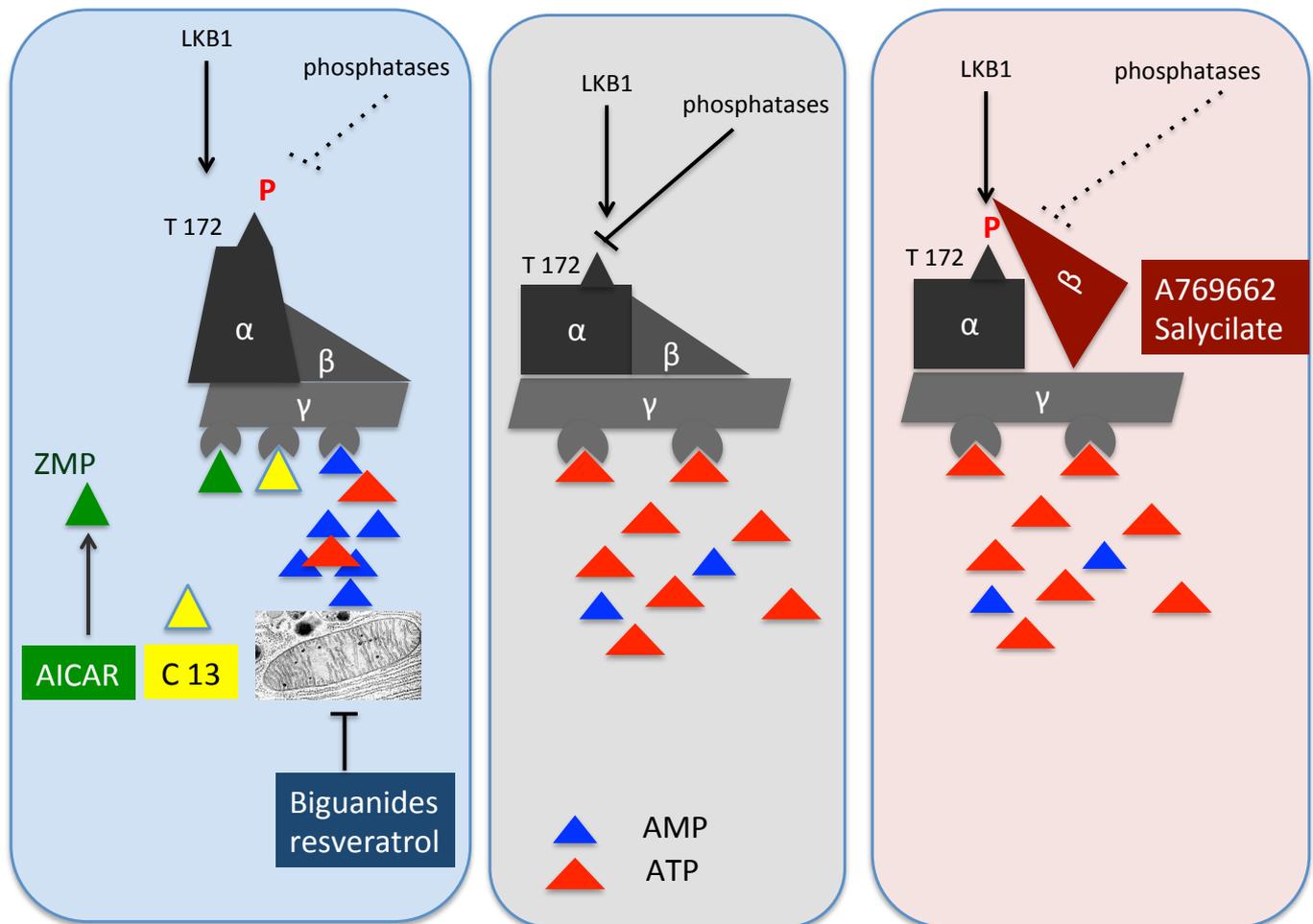
Le premier activateur direct d'AMPK mis au point fut le composé A769662 (Cool et al., 2006). Il s'agit d'un activateur  $\beta 1$  sélectif, puisqu'il n'active pas la signalisation AMPK dans les cellules n'exprimant pas  $\beta 1$  (Scott et al., 2008). Ce composé active AMPK de manière allostérique d'une part (Scott et al., 2014) et également en inhibant la déphosphorylation de la T 172 (Sanders et al., 2007). C'est pourquoi l'activation complète d'AMPK par ce composé requiert la présence de l'une des kinases LKB1 ou CaMKK $\beta$  (Goransson et al., 2007).

Son mécanisme d'action nécessite la présence du domaine CBM de la sous-unité  $\beta$ , même s'il n'y a pas de liaison directe du composé à ce domaine (Scott et al., 2008). Très récemment, une étude cristallographique a permis de proposer que le composé A769662 protège la T 172 de la déphosphorylation en favorisant l'interaction du domaine CBM de la sous-unité  $\beta$  avec le domaine kinase de la sous-unité  $\alpha$  (Xiao et al., 2013).

## **Salicylate**

Il a récemment été montré que le salicylate, à des concentrations comparables à celles obtenues dans le sérum de patients traités par de fortes doses d'aspirine, active de manière directe l'AMPK en se liant au même site que l'A769662 (Hawley et al., 2012). Même s'il est certain que cette molécule n'est pas spécifique d'AMPK, l'abolition de ses effets

hypolipémiants chez les souris n'exprimant pas AMPK atteste de l'importance d'AMPK dans certains effets de l'aspirine.



**Figure 12. Mécanisme d'action des activateurs pharmacologiques d'AMPK.**

A l'état basal (au centre), et en l'absence de stress énergétique, AMPK n'est pas activé. Les molécules d'AMP sont symbolisées par des triangles bleus, celles d'ATP par des triangles rouges.

Les activateurs allostériques d'AMPK dépendants des domaines CBS sont décrits dans la partie gauche du schéma. Les biguanides et le resveratrol activent AMPK en inhibant la synthèse mitochondriale d'ATP et en augmentant ainsi le rapport AMP/ATP. L'AICAR est métabolisé en ZMP (triangles verts) qui est une mimétique de l'AMP qui peut se fixer aux domaines CBS. Le composé 13 (C13, triangle jaune) est un agoniste de l'AMP  $\alpha$ 1 sélectif. Ces composés entraînent une activation allostérique d'AMPK $\alpha$  (figurée par le changement de forme de la sous-unité  $\alpha$ ), suppriment l'effet inhibiteur de la myristoylation de la sous-unité  $\beta$  sur la phosphorylation de la T 172 et protègent ce résidu de l'action des phosphatases.

Les activateurs d'AMPK indépendants des domaines CBS sont décrits dans la partie droite du schéma (en rouge). L'A769662 et le salicylate entraînent un changement conformationnel de la sous-unité  $\beta$  qui protège la T 172 des phosphatases.

## **Conséquences de l'activation d'AMPK**

L'activation d'AMPK a de multiples conséquences sur le fonctionnement cellulaire, qui conduisent à favoriser les processus cataboliques qui permettent de produire de l'énergie et d'inhiber les processus anaboliques consommateurs d'énergie (figure 13).

AMPK exerce ces effets via la phosphorylation de ses cibles sur des résidus sérine ou thréonine situés dans un contexte bien défini (Hardie, 2011):

- résidu basique en P-3 ou P-4 (R, K ou H) qui s'associe à des résidus acides du domaine kinase d'AMPK  $\alpha$
- résidu hydrophobe en P-5 et P+4 (L, M, I, V ou F en P-5, et aussi Q ou N en P+4) qui s'associent avec une poche hydrophobe du domaine kinase d'AMPK  $\alpha$ .

De plus, AMPK contrôle un programme transcriptionnel via plusieurs intermédiaires :

- AMPK inhibe en les phosphorylant certains facteurs de transcriptions tels SREBP-1c (Li et al., 2011b), CRTC2 (CREB-regulated transcription coactivator-2) (Lerner et al., 2009; Shaw et al., 2005), un coactivateur de CREB (cyclic AMP response element binding protein), ou ChREBP (carbohydrate responsive element binding protein) (Kawaguchi et al., 2002).
- AMPK peut avoir des actions sur des régulateurs épigénétiques, par exemple en phosphorylant des histones déacétylases de classe II (HDAC-4, -5 et -7), ce qui a pour effet d'empêcher leur localisation nucléaire (Mihaylova et al., 2011).
- AMPK phosphoryle directement la S 36 de l'histone H2B, ce qui semble essentiel à la survie des cellules en condition de stress énergétique (Bungard et al., 2010).

Nous allons voir plus en détail les différents processus cellulaires modulés par AMPK, en rappelant les différentes voies activées par AMPK sont largement dépendantes du type cellulaire et des conditions expérimentales. Les différentes conséquences de l'activation d'AMPK décrites ci-dessous ne sont bien entendu jamais réalisées entièrement dans un type cellulaire donné.

## Régulation du métabolisme

L'activation d'AMPK a pour effet de favoriser la captation et le catabolisme du glucose, et d'inhiber les aspects anaboliques du métabolisme glucidique :

- Augmentation de la captation du glucose via l'expression membranaire des transporteurs GLUT 1 (Barnes et al., 2002), sans que le mécanisme moléculaire précis ne soit parfaitement connu. De même, AMPK phosphoryle TBC1D1 qui exerce alors une activité GAP vis-à-vis de la GTPase Rab favorisant l'expression membranaire des transporteurs GLUT4 (Frøsig et al., 2010) dans les tissus exprimant GLUT4 (cœur, muscle, foie).
- Activation par phosphorylation directe de l'isoforme 2 (exprimée dans le cœur) de la 6 phosphofructo-2-kinase, une enzyme régulatrice de la glycolyse (Marsin et al., 2000)
- Inhibition par phosphorylation de la glycogène synthase (Bultot et al., 2012)
- Inhibition transcriptionnelle de la néoglucogénèse (Koo et al., 2005; Mihaylova et al., 2011)

De même, AMPK promeut le catabolisme lipidique de plusieurs manières :

- augmentation de la captation d'acides gras via la translocation du transporteur CD36 (Bonen et al., 2007)
- inhibition de la synthèse des acides gras et augmentation de l'oxydation des acides gras. En effet, AMPK inhibe par phosphorylation directe (S79) ACC 1 et 2, qui réalisent la première étape de la synthèse des acides gras en transformant l'acétyl-CoA en malonyl-CoA. Le malonyl-CoA étant un régulateur négatif de l'oxydation des acides gras (via l'inhibition de la carnityl-palmitoyl transférase), l'inhibition d'ACC permet également de favoriser l'oxydation des acides gras.
- Inhibition de la synthèse du cholestérol par phosphorylation directe de l'HMG-CoA réductase
- Inhibition de SREBP, et donc du programme transcriptionnel permettant la synthèse d'acides gras.

Enfin, l'activation d'AMPK aboutit à une inhibition de la traduction protéique en agissant sur l'élongation de la traduction via la phosphorylation d'eEF2K, qui elle-même contrôle le facteur d'élongation eEF2 (Horman et al., 2002) et sur l'initiation de la traduction via le complexe mTORC1. Comme nous l'avons mentionné précédemment, AMPK inhibe

mTORC1 de manière indirecte, en activant TSC2 par phosphorylation du résidu S1345 (Inoki et al., 2003b) et de manière directe en phosphorylant RAPTOR sur les S722 et 792, ce qui entraîne l'association de RAPTOR à la protéine 14-3-3 (Gwinn et al., 2008).

## Régulation de la biosynthèse mitochondriale

L'activation d'AMPK promeut la biosynthèse des mitochondries, ce qui a d'ailleurs conduit les agences anti-dopage à interdire l'usage des agonistes d'AMPK pour les sportifs (<http://list.wada-ama.org/>). AMPK contrôle en effet l'activité de PGC-1 $\alpha$  suivant un mécanisme encore mal compris : AMPK pourrait phosphoryler PGC-1 $\alpha$  directement, conduisant à son auto-induction transcriptionnelle (Jäger et al., 2007), ou pourrait activer ce facteur de transcription en favorisant sa déacétylation par la sirtuine SIRT 1 (Canto et al., 2010).

## Régulation de l'autophagie

L'activation d'AMPK promeut l'autophagie de manière indirecte via l'inhibition de mTORC1 ou la stabilisation de p27<sup>KIP1</sup>, et directement via l'activation d'ULK1 (unc-51-like kinase). Nous reviendrons plus en détail sur ces mécanismes dans la partie consacrée à l'autophagie.

## Régulation du cycle cellulaire

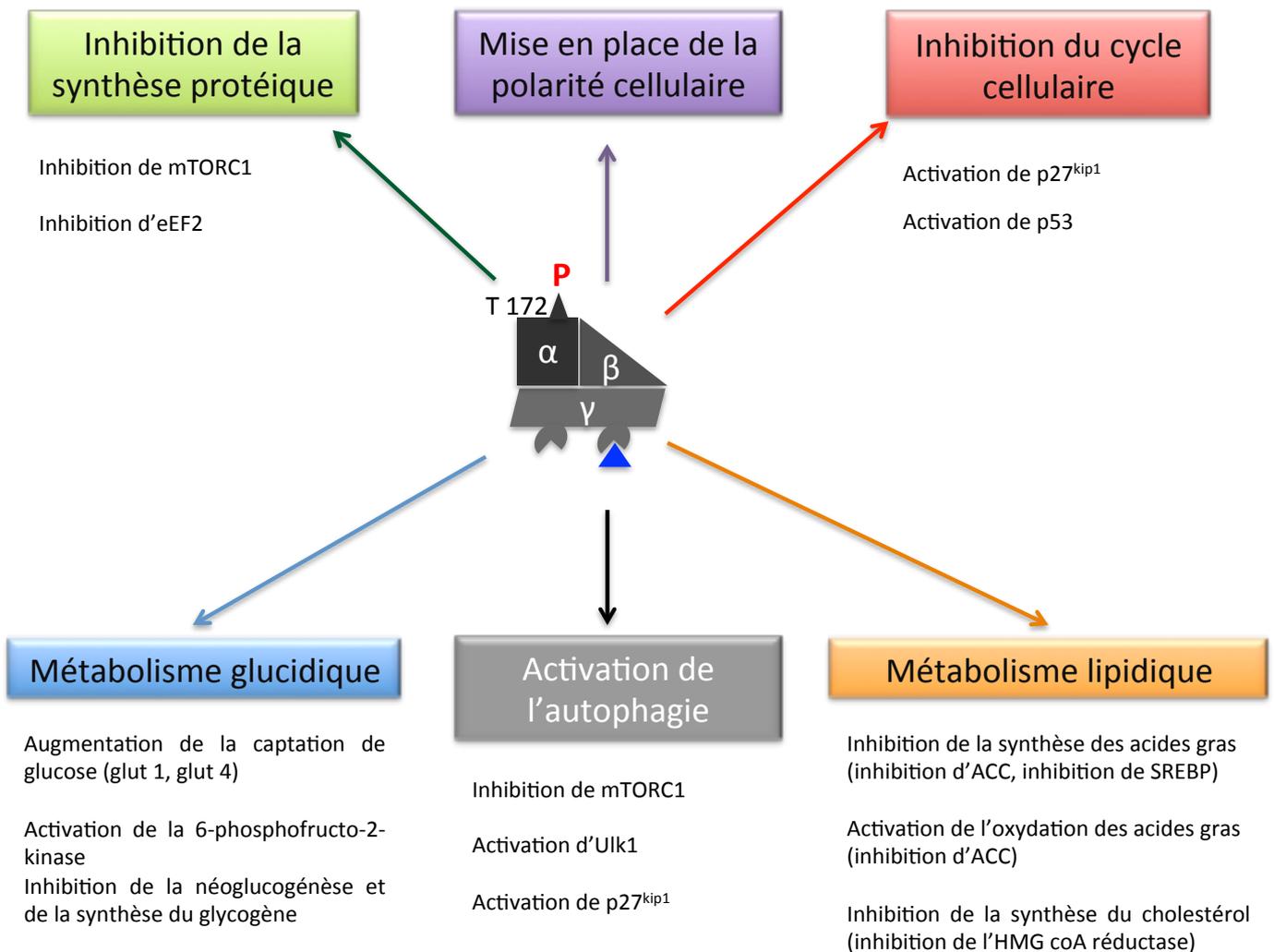
L'activation d'AMPK a pour effet de freiner la progression des cellules dans le cycle cellulaire, un processus nécessitant de grandes quantités d'énergie. Ainsi, un contrôle direct de p53 par AMPK a été observé, via la phosphorylation de p53 sur la S 15, qui est le résidu phosphorylé par ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3-related) et DNAPK (DNA-dependent protein kinase) (Jones et al., 2005). Par ailleurs, AMPK peut être activé en aval de p53 en formant un complexe avec les sestrin 1 et 2, qui sont régulées au niveau transcriptionnel par p53 (Budanov and Karin, 2008).

AMPK stabilise également par phosphorylation directe la protéine p27<sup>KIP1</sup> et bloque ainsi la progression du cycle cellulaire. Dans les cellules où cet axe AMPK/p27<sup>KIP1</sup> est inactivé, les stimuli activant AMPK (AICAR, privation en glucose) conduisent à l'apoptose des cellules,

soulignant l'importance du contrôle du cycle cellulaire pour la survie des cellules en cas de stress (Liang et al., 2007). Plus récemment, une étude phosphoprotéomique a mis en évidence d'autres cibles directes d'AMPK impliquées dans la mitose, comme PAK2 (p21 activated protein kinase) et PP1R12C (Protein Phosphatase 1 regulatory subunit 12C) (Banko et al., 2011).

### **Régulation de la polarité cellulaire**

La polarisation des cellules épithéliales est un des effets majeurs de la kinase LKB1, puisque sa seule expression peut suffire à induire la formation d'un pôle apical avec une bordure en brosse (Baas et al., 2004). AMPK joue un rôle important dans ce phénotype, puisque l'expression d'un mutant dominant activé d'AMPK peut le corriger et que l'activation d'AMPK par un stress métabolique tel que le 2DG qui inhibe la glycolyse suffit à induire une polarisation apico-basale (Lee et al., 2007b).



**Figure 13. Conséquences de l'activation d'AMPK.**

L'activation d'AMPK peut avoir des effets sur la plupart des aspects du métabolisme, ainsi que sur certains processus particulièrement consommateurs d'énergie comme la progression dans le cycle cellulaire ou la traduction des protéines. Il s'agit ici de représenter les différentes cibles décrites d'AMPK, mais ce schéma ne tient pas compte des spécificités tissulaires des conséquences de l'activation d'AMPK.

## **AMPK et cancer**

### **Rôle suppresseur de tumeur d'AMPK**

Les conséquences fonctionnelles de l'activation d'AMPK (inhibition des processus anaboliques et activation des processus cataboliques, inhibition du cycle cellulaire, inhibition de l'effet Warburg), ainsi que son activation en aval du gène suppresseur de tumeur LKB1, plaident en faveur d'un rôle suppresseur de tumeur d'AMPK.

L'une des meilleures démonstrations du rôle suppresseur de tumeur d'AMPK provient d'un modèle de lymphome B induit par *c-myc*. Dans ce modèle, l'inactivation d'AMPK entraîne le développement de tumeurs plus agressives que dans les animaux sauvages et cela est expliqué par le fait qu'AMPK agit comme une kinase « anti-Warburg », en inhibant le facteur de transcription HIF1 $\alpha$  (Faubert et al., 2013).

Cependant, les mutations d'AMPK sont rares dans les cancers (moins de 3% pour chaque sous-unité) (Liang and Mills, 2013) et il n'existe pas de syndrome de prédisposition au cancer lié à une mutation inactivatrice hétérozygote d'AMPK, contrairement à ce que l'on observe habituellement pour les gènes suppresseur de tumeur. Ce paradoxe est expliqué par plusieurs travaux récents qui montrent que dans des conditions de stress métabolique, AMPK promeut au contraire la survie des cellules cancéreuses et devient alors indispensable à la progression tumorale (Hardie, 2013; Liang and Mills, 2013).

### **Rôle oncogénique d'AMPK**

Comme cela avait été observé avec les MEF ayant subi une délétion de LKB1 (Bardeesy et al., 2002), les MEF invalidées pour AMPK présentent une certaine résistance à la transformation par H-ras, puisque la croissance des tumeurs établies à partir de MEF transformées par H-ras est drastiquement inhibée dans les cellules n'exprimant pas AMPK (Laderoute et al., 2006).

Plus récemment, Jeon et collègues ont montré qu'AMPK favorise la survie des cellules transformées en leur permettant de mieux contrôler le niveau d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Jeon et al., 2012). En effet, en aval de l'activité d'AMPK, l'inhibition des processus anaboliques consommateurs de NADPH et la stimulation de la lipolyse productrice de NADPH permet d'augmenter le stock de NADPH et ainsi de diminuer le niveau de ROS.

De même, Shackelford et collègues ont montré que l'intégrité de l'axe LKB1-AMPK était indispensable à la survie des cellules tumorales en réponse à un stress métabolique tel que l'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale par la phenformine (Shackelford et al., 2013).

### **Activation d'AMPK dans les hémopathies malignes**

Le rôle d'AMPK dans la progression tumorale semble donc être complexe, puisque l'activation d'AMPK semble exercer un rôle suppresseur de tumeur, mais que la perte totale de l'activité AMPK est incompatible avec le développement d'une tumeur, ce complexe étant important pour la survie des cellules cancéreuses en situation de stress énergétique. Plusieurs travaux ont proposé d'utiliser des activateurs d'AMPK pour le traitement du cancer, y compris des hémopathies malignes.

Ainsi, une étude effectuée dans mon laboratoire d'accueil a montré que la metformine possède des propriétés antileucémiques *in vitro* et *in vivo* (dans le modèle de greffe sous-cutanée de la lignée MOLM-14 à la souris NUDE) et inhibe mTORC1 et la traduction des ARN messagers (Green et al., 2010). Ce travail a été confirmé par la suite, dans une étude qui précisait que l'effet anti-leucémique de la metformine est indépendant de la voie AMPK et était particulièrement marqué dans les cellules peu glycolytiques (Scotland et al., 2013).

D'autres études ont pu montrer des résultats similaires dans différents types d'hémopathies, comme les leucémies aiguës lymphoblastiques T (Grimaldi et al., 2012; Rosilio et al., 2013), la leucémie myéloïde chronique (Vakana et al., 2011), les lymphomes B et T (Shi et al., 2012) ou de façon moins convaincante dans les leucémies aiguës promyélocyaires (Huai et al., 2012).

Malgré ces études précliniques encourageantes, la metformine peut poser des problèmes pharmacocinétiques, puisque les concentrations utilisées *in vitro* sont de l'ordre du millimolaire, alors que les concentrations sériques chez les patients sont de l'ordre de la dizaine de micromolaire. Quelques essais cliniques ont tout de même été ouverts, notamment en association à la chimiothérapie dans les LAM réfractaires (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01849276?term=NCT01849276&rank=1>), les leucémies aiguës lymphoblastiques pédiatriques en rechute

(<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01324180?term=NCT01324180&rank=1>) ou la leucémie lymphoïde chronique (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01750567?term=NCT01750567&rank=1>).

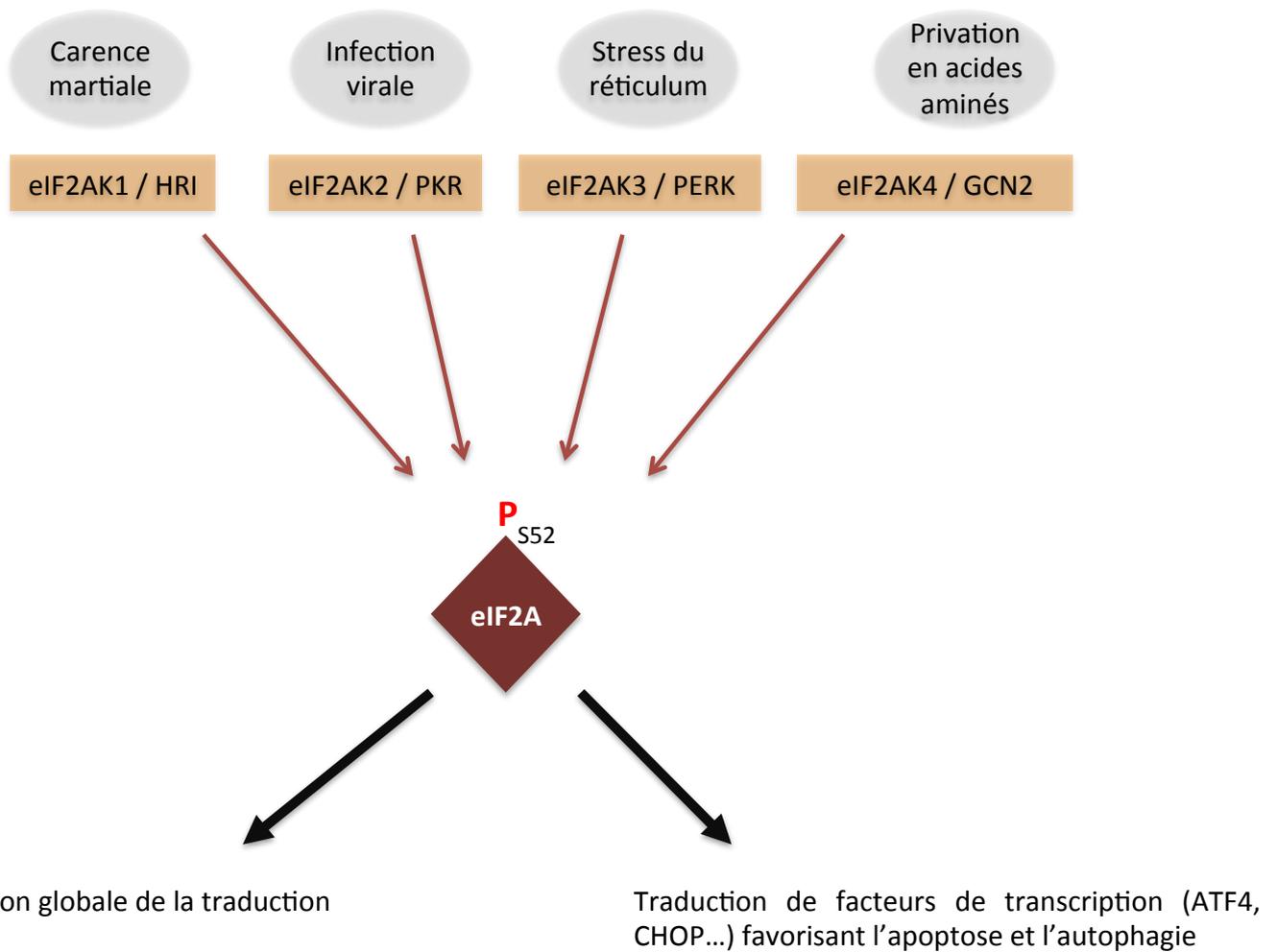
Au plan fondamental, ces études ne permettent pas de répondre à la question du rôle oncogénique ou suppresseur de tumeur d'AMPK dans les hémopathies, puisqu'elles reposent essentiellement sur l'utilisation de la metformine, dont il est maintenant clairement démontré que ses effets anticancéreux sont largement AMPK indépendants. C'est dans ce contexte que nous avons décidé d'étudier les effets d'un agoniste direct d'AMPK dans les LAM.

## La voie de réponse intégrée au stress

### *Activation de la voie*

L'environnement cellulaire comprend des paramètres physiques (température, irradiation, soumission à des forces de friction, etc.), chimiques (pH, potentiel d'oxydoréduction, concentration en métabolites) et biologiques (contacts cellulaires, présence de cytokines, etc.), soumis à une fluctuation constante. Le concept de stress peut être compris comme une fluctuation de l'environnement cellulaire au-delà d'un seuil qui menace alors la survie cellulaire (Kroemer et al., 2010) et auquel la cellule tente de s'adapter.

Le concept de voie de réponse intégrée au stress (ISR) dans les cellules de mammifères a été proposé en 2000 dans une publication qui démontrait le contrôle de la traduction par la phosphorylation de la protéine eIF2A (eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$ ) en réponse à différents stimuli de stress : déplétion en acide aminé ou stress du réticulum endoplasmique (Harding et al., 2000). La phosphorylation d'eIF2A sur le résidu S 51 (chez la souris) ou S 52 (chez l'homme) peut être réalisée par 4 kinases (eIF2AK 1 à 4) ayant une homologie structurelle du domaine kinase et qui s'activent en réponse à un stimulus de stress de nature différente (Baird and Wek, 2012) (figure 14).



**Figure 14. La voie de réponse intégrée au stress.**

Différents stress (en gris) peuvent activer chacune des kinases d'eIF2A (en orange), qui phosphorylent alors eIF2A sur le résidu S 52. La phosphorylation d'eIF2A va empêcher le recyclage du complexe d'initiation de la traduction et entraîner une inhibition globale de la traduction, mais va paradoxalement permettre la traduction de facteurs de transcription tels que CHOP ou ATF4, qui permettent l'expression d'un programme d'autophagie et d'apoptose.

### **EIF2AK1 : HRI**

HRI pour Heme-regulated eIF2A kinase est exprimée essentiellement durant l'érythropoïèse. Cette kinase possède deux domaines de fixation de l'hème, dont l'un situé dans le domaine kinase et qui réprime cette activité (Rafie-Kolpin et al., 2000). En cas de carence martiale, la diminution de production d'hème stimule donc l'activité kinase d'HRI, qui via la phosphorylation d'eIF2a inhibe alors la traduction, en particulier celle des chaînes de globines. Chez les souris dont le gène HRI est inactivé, la carence martiale entraîne une anémie normocytaire (au lieu de l'anémie microcytaire des souris contrôle), avec des inclusions cytoplasmiques dans la lignée érythroïde qui correspondent à la précipitation des chaînes de globine produites en excès (Han et al., 2001).

### **EIF2AK2 : PKR**

PKR (Protein Kinase R) est la kinase qui phosphoryle eIF2A en cas d'infection virale. PKR possède en effet deux domaines de liaison de l'ARN double brin qui régulent son activité (Williams, 2001) et son niveau d'expression est augmenté en cas d'exposition aux interférons de type I (Kuhlen and Samuel, 1999). La liaison d'ARN double brin active PKR, qui phosphoryle alors eIF2A, ce qui a pour effet de limiter la réplication virale via l'inhibition de la traduction. Par ailleurs, il a été montré que PKR peut être activée par d'autres stress, comme par exemple en cas de stress du réticulum endoplasmique (Nakamura et al., 2010).

### **EIF2AK3 : PERK**

PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase (PERK, parfois appelée aussi Pancreatic eIF2A Kinase) est la kinase qui phosphoryle eIF2A en réponse au stress du réticulum endoplasmique. La délétion de PERK est responsable du syndrome de Wolcott Rallison, qui associe un tableau malformatif et un diabète néonatal avec atrophie du pancréas exocrine (Delépine et al., 2000).

Il s'agit d'une protéine transmembranaire, contenant un domaine kinase cytoplasmique et un domaine régulateur situé dans la lumière du réticulum endoplasmique, auquel s'associe la protéine chaperonne GRP78 (78 kDa glucose regulated protein). Le stress du réticulum endoplasmique correspond à la présence d'un excès de protéines ayant une conformation anormale, conséquence soit d'une production globale de protéines excessive, soit de divers stress métaboliques comme le stress oxydatif (qui perturbe la formation de ponts disulfures), la privation en glucose (qui compromet la glycosylation des protéines), etc. Ces protéines mal repliées entrent alors en compétition avec PERK pour la liaison de la chaperonne GRP78, ce

qui permet une homodimérisation et une autoactivation (par transphosphorylation sur de multiples résidus du domaine kinase) de PERK (Walter and Ron, 2011).

PERK appartient donc au système UPR (Unfolded Protein Response), qui comprend également deux autres voies canoniques activées en cas de stress du réticulum endoplasmique :

- IRE1 (Inositol Requiring Enzyme 1) est la voie la plus conservée, y compris chez la levure. Une fois activée par la dissociation de GRP78 ou alternativement par la liaison directe de protéines mal repliées (Gardner and Walter, 2011), IRE1 phosphoryle JNK (c-JUN N-terminal kinase). IRE1 possède également une activité endoribonucléase qui permet d'une part l'épissage de XBP-1 (X-box binding protein 1) (Calfon et al., 2002) et d'autre part la dégradation des ARN messagers liés au réticulum selon un processus dénommé Regulated IRE1-Dependent Decay (RIDD). La forme épissée de XBP-1 peut alors transloquer dans le noyau, où elle favorise la transcription de gènes codant pour des protéines chaperonnes (Lee et al., 2003). XBP-1 a un rôle particulièrement important dans la différenciation plasmocytaire (Reimold et al., 2001), en particulier pour permettre la production massive d'immunoglobulines. De façon intéressante, l'inhibition de l'épissage de XBP-1 permet aux cellules de myélome de résister aux inhibiteurs du protéasome, via un phénomène de dédifférenciation et la répression de la synthèse d'immunoglobulines, permettant de diminuer le niveau de stress du réticulum endoplasmique après exposition au bortezomib (Leung-Hagesteijn et al., 2013).

- ATF6 (Activating Transcription Factor 6) est une protéine résidente du réticulum endoplasmique, qui est transportée dans l'appareil de Golgi en cas de stress du réticulum endoplasmique par un mécanisme mal connu. Elle y est clivée par deux protéases (S1P et S2P), ce qui libère un fragment N terminal pouvant être transporté dans le noyau où il stimule la transcription de gènes codant pour des chaperonnes (GRP78, GRP 94).

Les trois voies du système UPR permettent ainsi une réponse coordonnée des cellules au stress du réticulum endoplasmique, en diminuant la charge protéique dans le réticulum endoplasmique par inhibition de la traduction et/ou dégradation des protéines via le protéasome (Endoplasmic Reticulum Associated Degradation, ERAD), en augmentant les capacités de repliement des protéines et en favorisant l'expansion du réticulum endoplasmique (Walter and Ron, 2011). La réponse UPR peut permettre aux cellules de survivre à un stress métabolique, mais l'activation prolongée de la réponse UPR peut conduire également à

l'apoptose, en particulier lorsque l'activation de la voie PERK/eIF2A persiste en l'absence de l'activation des autres voies (Lin et al., 2007).

### **EIF2AK4 : GCN2**

GCN2 (general control non derepressible 2) est la plus conservée des kinases d'eIF2A. Elle est activée en cas de privation en nutriments, en particulier en acides aminés, quand la quantité d'ARN de transfert (ARNt) non chargés de leur acide aminé augmente. Ces ARNt non chargés se fixent alors sur un domaine de GCN2 ayant une homologie avec les Histidyl-ARNt-synthétases, ce qui conduit à l'activation par autophosphorylation de GCN2. Alors que les souris invalidées pour GCN2 n'ont pas de phénotype en conditions normales, elles sont particulièrement sensibles à un régime dépourvu de leucine qui est létal dans presque 50% des cas, ce qui n'est pas observé chez les souris sauvages (Anthony et al., 2004). Ce phénotype, lié à une incapacité à inhiber la synthèse protéique hépatique en cas de privation en leucine qui conduit à la diminution de la masse musculaire, souligne in vivo le rôle de GCN2 en réponse au stress nutritionnel.

Au-delà de la privation en acides aminés, l'activation de GCN2 a été rapportée après exposition à d'autres stress tels que la privation en glucose chez la levure (Yang et al., 2000), l'irradiation par les ultra-violets (Deng et al., 2002), ou l'inhibition du protéasome (Jiang and Wek, 2005).

## ***Conséquences de l'activation de la voie ISR***

### **Contrôle de la traduction par eIF2A**

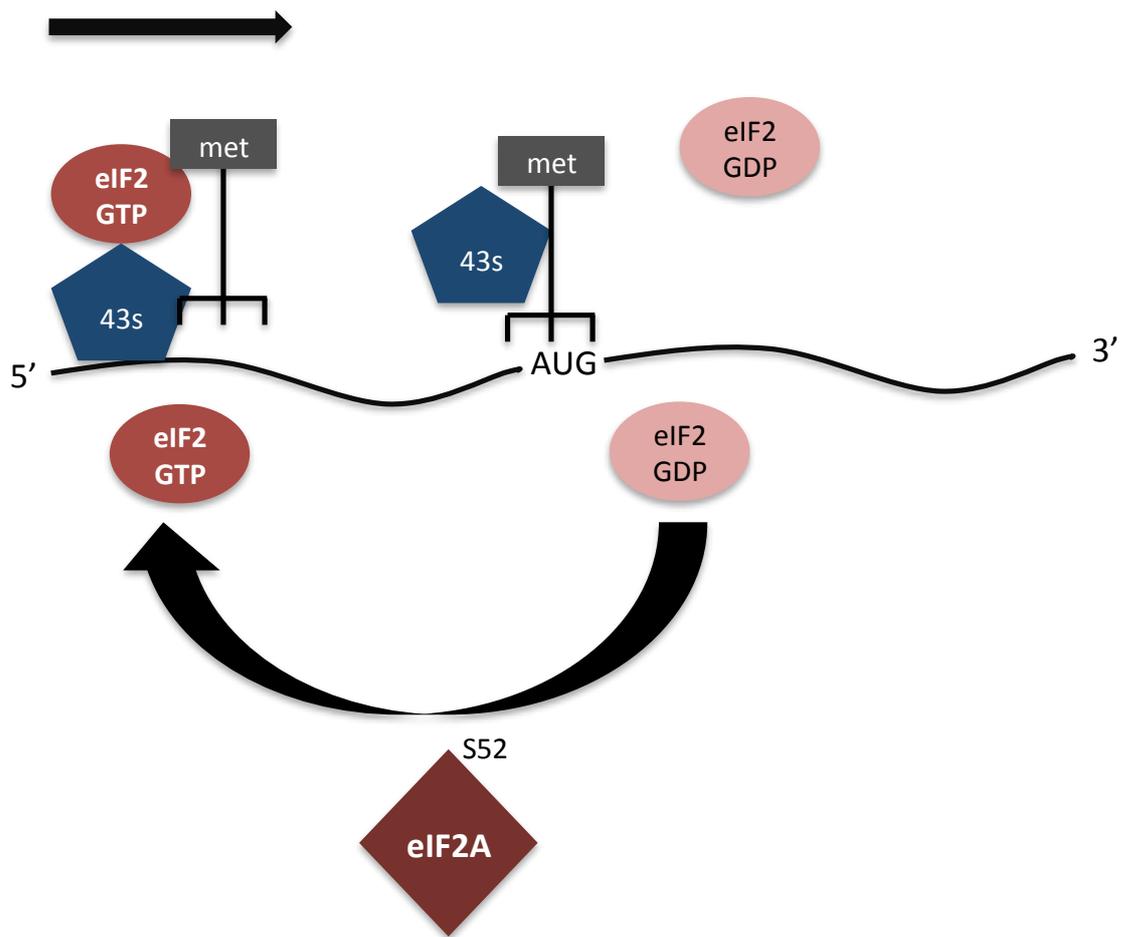
L'initiation de la traduction est une étape finement régulée par deux systèmes principaux. La première étape est l'association d'eIF4F à la coiffe 7-méthyl guanosine située en 5' de l'ARN messenger et cette étape est largement contrôlée par le complexe mTORC1 via la régulation de la phosphorylation de 4E-BP1 (cf. supra et figure 11). eIF4F forme alors le complexe 43s, en recrutant la sous-unité 40s du ribosome, les autres membres du complexe d'initiation de la traduction eIF1, eIF4A, eIF5 et eIF2-GTP, cette dernière étant associée à l'ARN de transfert pour la méthionine (figure 15). Cette structure va ensuite scanner l'ARN messenger de 5' en 3' jusqu'au codon d'initiation de la traduction et l'hydrolyse du GTP associé à eIF2 permet l'association de l'ARN de transfert méthionine avec le codon d'initiation de la traduction.

eIF2-GDP est alors libéré et doit être rechargée avec du GTP pour permettre sa réassociation avec un ARN de transfert et la formation d'un nouveau complexe 43s qui permettra la réinitiation de la traduction. Cette étape est catalysée par eIF2B, un complexe multiprotéique qui assure une activité GEF vis-à-vis d'eIF2. Quand eIF2A est phosphorylée sur la S 51, elle inhibe eIF2B : l'association d'eIF2 au GTP n'est donc plus assurée, ce qui inhibe globalement la traduction (Baird and Wek, 2012).

Alors que la phosphorylation d'eIF2A conduit donc à une diminution globale du niveau de traduction des ARN messagers, certaines protéines voient au contraire leur traduction augmenter, selon deux mécanismes principaux (figure 16)

### **Modèle de retard à la réinitiation**

C'est le modèle qui explique l'augmentation de la traduction d'ATF4 quand eIF2A est phosphorylée (Vattem and Wek, 2004). En effet, il existe 2 cadres ouverts de lecture situés en 5' du cadre ouvert de lecture codant ATF4 sur l'ARN messenger d'ATF4. Le premier cadre de lecture est lu, la grande sous unité du ribosome 60s se dissocie de la petite, puis la petite sous unité 40s continue de scanner l'ARN messenger jusqu'au prochain codon d'initiation. En situation normale, le niveau d'eIF2-GTP est élevé et le complexe d'initiation de la traduction est donc réassemblé lorsque la petite sous-unité arrive au deuxième cadre de lecture. Ce deuxième cadre de lecture est chevauchant et décalé avec celui codant ATF4, et il n'y a donc pas de traduction d'ATF4. Lorsque eIF2a est phosphorylé, le niveau d'eIF2-GTP est diminué, et le complexe d'initiation de la traduction n'est pas réassemblé lorsque la petite sous-unité arrive au deuxième cadre de lecture. Elle continue alors de scanner l'ARN messenger jusqu'au cadre de lecture codant ATF4, ce qui lui laisse le temps de s'associer au complexe d'initiation de la traduction et permet donc la traduction d'ATF4.



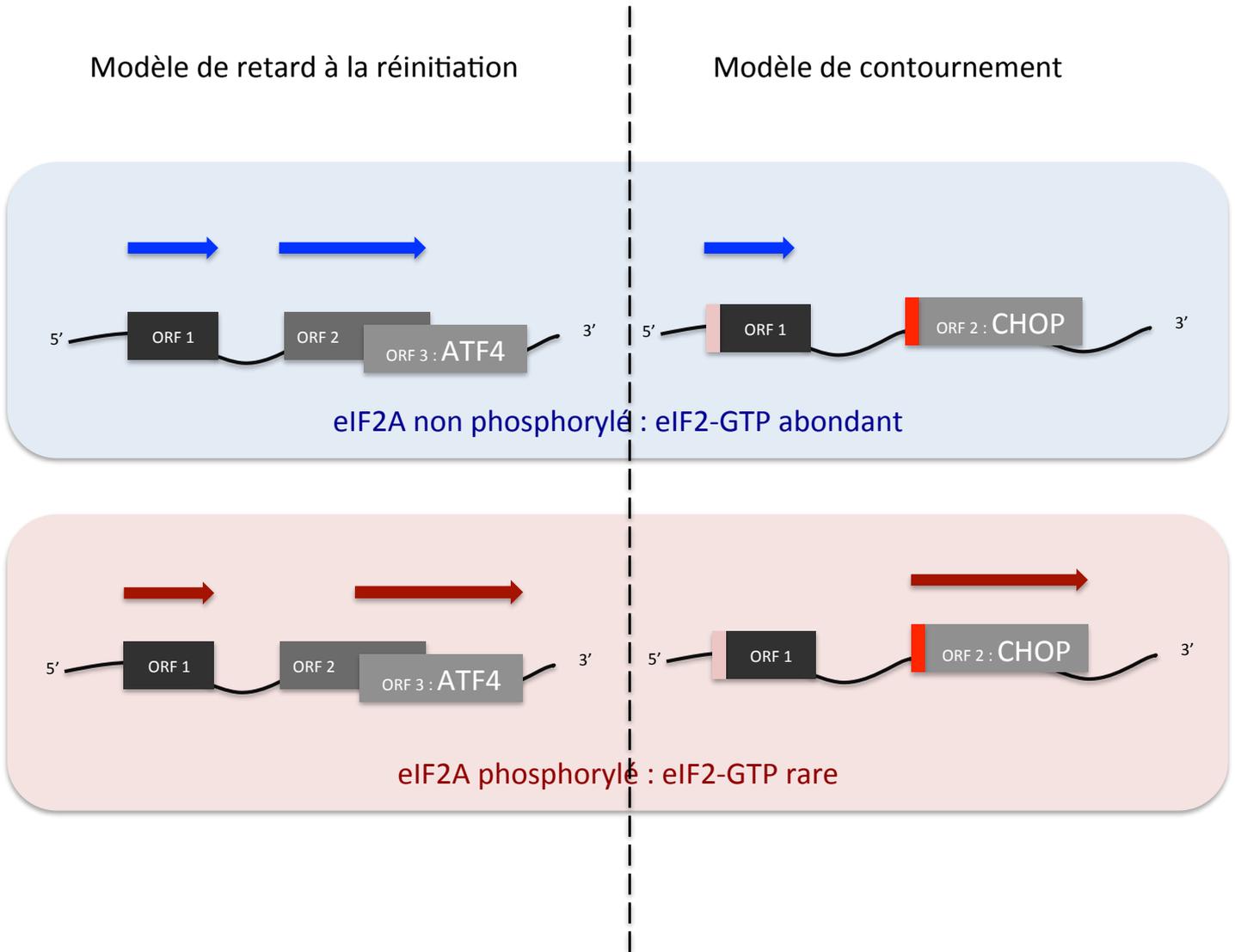
**Figure 15. Contrôle de l'initiation de la traduction par eIF2A.**

Le complexe 43s comprend eIF4F, eIF1, eIFA, eIF5, la sous-unité 40s du ribosome et eIF2-GTP qui recrute l'ARN de transfert pour la méthionine. Ce complexe scanne l'ARN messager de 5' en 3', jusqu'au codon d'initiation de la traduction, où l'hydrolyse du GTP lié à eIF2 permet le chargement de la méthionine. La reconstitution du complexe nécessite l'activité GEF (GTP exchange Factor) d'eIF2A, qui est inhibée quand eIF2A est phosphorylée sur le résidu S 52.

## **Modèle de contournement (bypass)**

C'est le modèle qui explique l'augmentation de la traduction de CHOP (C/EBP homologous protein) quand eIF2A est phosphorylé. L'ARN messager de CHOP contient en effet un cadre de lecture de 34 acides aminés ayant une séquence Kozak peu favorable, suivi du cadre de lecture codant pour la protéine CHOP. En situation normale, la traduction du premier cadre de lecture a pour conséquence un arrêt de la lecture de l'ARN messager par le ribosome et il n'y a donc pas de traduction de la protéine CHOP. En cas de phosphorylation d'eIF2A, et donc de faible abondance d'eIF2-GTP, il n'y a pas d'initiation de la traduction au niveau du premier cadre de lecture du fait de la séquence Kozak défavorable et donc pas d'inhibition de la traduction du cadre de lecture de CHOP, qui possède une séquence Kozak favorable.

D'autres ARN messagers sont également préférentiellement traduits lorsqu'eIF2A est phosphorylé : c'est le cas notamment de GADD34, une phosphatase d'eIF2A qui exerce donc un rétrocontrôle négatif, ou de facteurs de transcription tels qu'ATF5 (Zhou et al., 2008). De plus, les ARN messagers à traduction cap-indépendante de type IRES (Internal Ribosomal Entry Site) pourraient également être moins sensibles au niveau de phosphorylation d'eIF2A (Fernandez et al., 2002).



**Figure 16. Mécanismes moléculaires expliquant l'augmentation de la traduction de certains ARNm en cas de phosphorylation d'eIF2A.**

La situation où eIF2A n'est pas phosphorylé est figurée dans l'encadré bleu (en haut), et celle où eIF2A est phosphorylé est figurée dans l'encadré rouge (en bas).

Les flèches pleines correspondent aux cadres ouverts de lecture (ORF) effectivement traduits dans chaque situation.

Dans le modèle de retard à la réinitiation (cas d'ATF4), l'absence de recyclage d'eIF2 retarde le réassemblage des sous unités du ribosome : le 2<sup>ème</sup> cadre ouvert de lecture (ORF) chevauchant avec l'ORF d'ATF4 n'est pas lu, et l'ORF codant ATF4 est traduit. Dans le modèle de contournement (cas de CHOP), l'ORF codant CHOP est précédé d'une séquence Kozak favorable (rectangle rouge), et d'un ORF précédé d'une séquence Kozak défavorable (rectangle rose). En situation basale, la lecture du premier ORF entraîne la dissociation du ribosome et de l'ARNm : l'ORF codant CHOP n'est pas traduit. Quand eIF2-GTP n'est pas recyclé, le premier ORF n'est pas traduit du fait de sa séquence Kozak défavorable, et c'est l'ORF codant CHOP qui est alors traduit.

## Conséquences de l'induction d'ATF4/CHOP

L'activation de la voie de l'ISR par l'une des kinases d'eIF2A va donc entraîner l'accumulation de certaines protéines, parmi lesquelles ATF4 et CHOP sont les mieux caractérisées.

ATF4 est un facteur de transcription de type basic leucine zipper (bZIP), qui peut former des homodimères ou des hétérodimères avec d'autres facteurs de transcription, comme les facteurs de transcription de la famille C/EBP, c-jun, c-fos, NRF2, ou CHOP. Les complexes ainsi formés se fixent à des séquences CARE de l'ADN et vont activer la transcription de gènes tels que l'asparagine synthétase ou la phosphatase GADD34 (Brush et al., 2003). Globalement, l'analyse du profil d'expression génique lié à ATF4 montre l'activation d'un programme transcriptionnel impliqué dans la réponse aux stress : gènes impliqués dans la synthèse ou l'import d'acides aminés, la dégradation des protéines, le contrôle du stress oxydatif, l'autophagie et l'apoptose (Teske et al., 2011).

Les souris invalidées pour le gène ATF4 présentent un phénotype complexe, caractérisé entre autre par l'absence de développement du cristallin et des anomalies importantes de l'hématopoïèse fœtale hépatique, conduisant au développement d'anémie sévère (Masuoka and Townes, 2002).

CHOP est également un facteur de transcription de type basic leucine zipper, qui a été largement impliqué dans l'apoptose survenant en réponse à un stress prolongé. Dès 1998, il a été montré sur des cellules tubulaires rénales ou sur des fibroblastes embryonnaires murins que l'inactivation de *ddit3* (le gène codant CHOP) protège les cellules de l'apoptose induite par la tunicamycine (Zinszner et al., 1998). Les mécanismes expliquant l'apoptose induite lors de l'expression de CHOP sont multiples :

- inhibition transcriptionnelle de Bcl2 (B cell lymphoma 2) (McCullough et al., 2001),
- induction transcriptionnelle des protéines proapoptotiques Bim (Puthalakath et al., 2007) ou Bax (Fu et al., 2010),
- induction d'un stress oxydatif via la surexpression d'ERO1 $\alpha$  (endoplasmic reticulum oxydase 1 $\alpha$ ), qui pourrait activer indirectement la Calcium/calmodulin dependent protein kinase II (CaMKII), elle même induisant des facteurs proapoptotiques tels que Fas (Timmins et al., 2009).

La stabilisation de CHOP est également inductrice d'autophagie, via la régulation transcriptionnelle de nombreux gènes impliqués dans ce processus. Nous reviendrons plus en détail sur ce point dans la partie consacrée à l'autophagie.

## ***Voie ISR et cancer***

### **Rôle oncogénique de la voie ISR**

Le microenvironnement tumoral, du fait d'une néovascularisation pathologique, présente de nombreuses caractéristiques pouvant expliquer l'apparition de stress du reticulum endoplasmique, comme par exemple une hypoxie, des anomalies de la glycosylation des protéines (résultant de faibles taux de glucose extracellulaires ou de l'acidité du milieu extracellulaire), ou un niveau de traduction protéique élevé. De fait, des études immunohistochimiques ont pu mettre en évidence la surexpression de GRP 78 par exemple dans les cancers mammaires (Fernandez et al., 2000) ou les hépatocarcinomes (Shuda et al., 2003). Ainsi, les voies UPR dont fait partie la voie ISR pourraient avoir un rôle pro-oncogénique, en permettant aux cellules cancéreuses de s'adapter et de survivre à leur environnement. Plusieurs arguments expérimentaux vont dans ce sens :

- l'inactivation de GRP 78 empêche la progression tumorale dans des modèles murins de fibrosarcome (Jamora et al., 1996)
- l'inactivation de GCN2 ou d'ATF4 dans des lignées rendent celles-ci plus sensibles aux stress métaboliques (privation en glucose, en glutamine) et compromet leur croissance après injection à la souris NUDE (Ye et al., 2010).
- l'inactivation de PERK ou une mutation d'eIF2A empêchant sa phosphorylation sur S 51 compromet la croissance tumorale et la résistance à l'hypoxie dans un modèle de MEF transformées par ras V12 (Bi et al., 2005). L'inactivation de PERK est également délétère pour la croissance des modèles d'adénocarcinome mammaire, du fait d'une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (Bobrovnikova-Marjon et al., 2010). De manière intéressante, il a été montré que PERK favorise l'expression de gènes proangiogéniques en réponse à l'hypoxie (Blais et al., 2006), dont par exemple le gène codant pour le VEGF sur le

promoteur duquel la fixation d'ATF4 a été confirmée par immunoprécipitation chromatinienne (Wang et al., 2012), confirmant le rôle important de cette voie dans la croissance tumorale.

Ces observations prédisent que les molécules qui inhibent les voies UPR auront une action antitumorale, comme cela a pu être décrit avec un inhibiteur de PERK, le GSK2656157, qui a démontré une action antitumorale dans plusieurs modèles de lignées cancéreuses humaines injectées à la souris NUDE (Atkins et al., 2013).

### **Rôle suppresseur de tumeur de la voie ISR : une cible thérapeutique ?**

Cependant, la voie ISR peut également être décrite comme suppresseur de tumeur, puisqu'une activation excessive de ces systèmes d'adaptation au stress peut entraîner l'apoptose des cellules cancéreuses.

Ainsi, l'activation des voies UPR par la tunicamycine ou la thapsigargine a un effet proapoptotique sur des cellules primaires de leucémie lymphoïde chronique (Rosati et al., 2010), ou a été impliquée dans l'apoptose d'une lignée de LAM (U937) après exposition au sorafenib (Rahmani et al., 2007). De même, l'activation de la réponse UPR observée après blocage du protéasome par le bortezomib explique en partie l'apoptose des cellules myélomateuses et le succès clinique de cet agent (Obeng et al., 2006).

Ces observations prédisent dans différentes hémopathies que l'activation du stress du reticulum endoplasmique pourrait constituer une cible thérapeutique selon le modèle de la létalité synthétique.

## Relations entre les voies mTORC1, AMPK ET ISR

### *mTORC1 et ISR*

#### **Contrôle du niveau de la voie ISR par mTORC1**

Il existe de nombreux arguments expérimentaux démontrant les liens entre la voie mTORC1 et le système UPR (Unfolded Protein Response), dont la voie ISR est une des branches.

Les travaux d'Ozcan et collègues sur des modèles *in vitro* et *in vivo* d'activation de mTORC1 par KO de TSC1 ou TSC2 ont montré une corrélation entre niveau d'activation de mTORC1 et activation de la voie eIF2a/ATF4/CHOP (Ozcan et al., 2008). De façon intéressante, un traitement d'au moins 6 heures par la rapamycine permettait d'abolir l'activation des voies UPR dans les cellules TSC2 KO. Cette étude montrait également que l'hyperactivation de mTORC1 sensibilisait les cellules à l'apoptose induite par la tunicamycine, un agent induisant un stress du réticulum endoplasmique. Ce travail a été confirmé chez des souris invalidées pour TSC2, dans le cerveau desquelles était montré une surexpression de CHOP qui disparaissait en cas de traitement par la rapamycine (Nardo et al., 2009). L'hypothèse avancée par les auteurs était que l'activation de mTORC1 stimulait la traduction et entraînait ainsi une surcharge en protéines stressant le réticulum endoplasmique.

Une autre étude a montré que les cellules n'exprimant pas PTEN avaient un niveau de phosphorylation d'eIF2A plus important, via une répression transcriptionnelle de la phosphatase CReP (Constitutive Repressor of eIF2A Phosphorylation) par la voie PI3K/Akt (Zeng et al., 2011). Cependant, cette étude n'apportait pas d'information sur le rôle de mTORC1 en aval d'Akt dans ce modèle.

Un autre mécanisme a été récemment proposé par Babcock et collègues, qui ont montré que le niveau d'activation de mTORC1 module la sensibilité au stress du réticulum endoplasmique induit par le bortezomib (Babcock et al., 2013). Cette étude démontrait élégamment que le prétraitement par rapamycine de cellules TSC2 KO diminue leur sensibilité au bortezomib et que cela corrèle avec une absence d'induction de l'expression des protéines ATF4 et CHOP dans les cellules prétraitées. Les auteurs mettent en évidence une régulation transcriptionnelle

d'ATF4 par la rapamycine, via la fixation de c-myc sur le promoteur d'ATF4. Après inhibition de mTORC1, c-myc ne se localise plus dans le noyau ce qui diminue la transcription d'ATF4 dépendante de c-myc. Cette étude propose donc un mécanisme indépendant de la traduction pour relier mTORC1 et stress du reticulum endoplasmique, via le contrôle transcriptionnel d'ATF4. L'importance du contrôle transcriptionnel d'ATF4 avait déjà été suggérée dans la réponse au stress induit par l'irradiation aux ultra-violets (UV) (Dey et al., 2010). Contrairement à ce qui était observé avec la thapsigargine, un inducteur de stress du reticulum endoplasmique, il avait en effet été constaté que les UV entraînent une phosphorylation d'eIF2A, mais pas de surexpression d'ATF4, et cela était lié à une absence de stimulation transcriptionnelle d'ATF4 en réponse aux UV.

Chez la levure, un contrôle négatif de la voie ISR par TORC1 a été montré (Cherkasova and Hinnebusch, 2003). En effet, TOR contrôle indirectement la phosphorylation inhibitrice de GCN2 sur le résidu S 577 et l'inhibition de TOR par la rapamycin entraîne dans ce modèle une phosphorylation plus importante d'eIF2A. Cependant, cette observation n'a pas été rapportée chez les eucaryotes supérieurs.

### **Contrôle de mTORC1 par la voie ISR**

Il existe également des observations d'un contrôle de mTORC1 en aval de l'activation de la voie ISR, même si les résultats semblent largement dépendants du modèle expérimental.

Ainsi, il a été démontré que l'expression de REDD1, un inhibiteur de mTORC1, est augmentée en cas de stimulation des voies UPR par la thapsigargin ou la tunicamycin et que cet effet disparaît dans les cellules KO pour PERK ou ATF4 (Kimball and Jefferson, 2012; Whitney et al., 2009). De même, Il a été démontré que TRB3, qui est une cible transcriptionnelle de CHOP (Ohoka et al., 2005), inhibe Akt par une interaction directe (Du et al., 2003) et pourrait donc inhiber mTORC1 en aval d'Akt.

D'autres travaux suggèrent au contraire que mTORC1 peut être activé en aval de la voie PI3K en cas de stress pharmacologique du reticulum endoplasmique (Yamazaki et al., 2009), au moins à des temps courts de stimulation.

## ***mTORC1 et AMPK***

Nous avons déjà évoqué le contrôle inhibiteur de mTORC1 par AMPK, directement via la phosphorylation de RAPTOR qui dissocie le complexe mTORC1 et indirectement via l'activation de TSC2 d'une part, et la compétition pour le ragulator d'autre part.

Il est intéressant de noter également qu'une étude a proposé un rétrocontrôle de l'activité d'AMPK par mTORC1. Ainsi, il a été observé dans l'hypothalamus de souris que p70S6K phosphoryle AMPK $\alpha$ 2 sur le résidu S 491, ce qui a pour effet d'inhiber AMPK (Dagon et al., 2012). Cette phosphorylation est importante pour l'inhibition d'AMPK en réponse à la leptine et le contrôle de la prise alimentaire.

## ***AMPK et ISR***

Il existe plusieurs études suggérant une activation de la voie de l'ISR en aval d'AMPK, mais d'autres études proposent au contraire une inhibition des voies UPR par AMPK. Il est probable que ces discordances proviennent largement de l'utilisation d'activateurs non spécifiques d'AMPK, tels que les biguanides.

### **Activation de la voie ISR en aval d'AMPK**

Chez la levure, eIF2A est phosphorylée par GCN2 en cas de privation en histidine. Il a été montré que l'activation de cette voie était diminuée en l'absence de Snf1, l'orthologue d'AMPK, avec alors une diminution de l'autophorylation activatrice de GCN2. De plus, en l'absence de glucose, Snf1 favorise la phosphorylation d'eIF2A en inhibant les deux phosphatases Glc7 et Sit4 (Cherkasova et al., 2010).

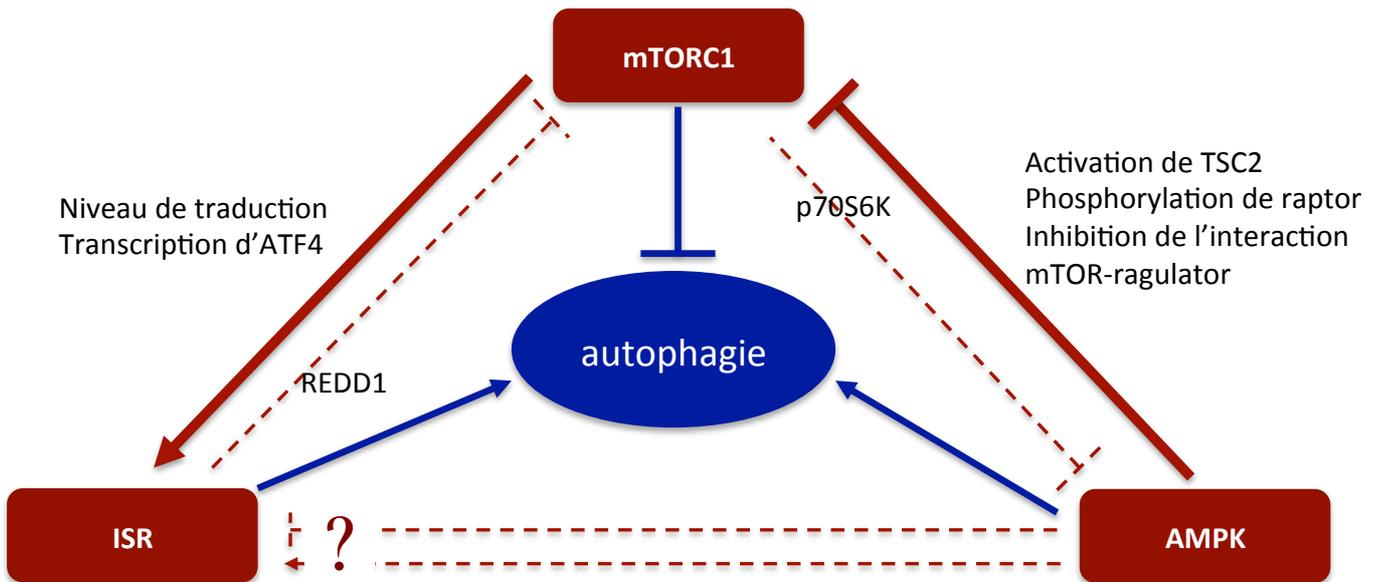
Dans les cellules de mammifères, il est connu depuis longtemps que la privation en glucose active les voies du système UPR et certains auteurs ont proposé que ce stimulus puisse activer exclusivement la voie PERK (Gomez et al., 2008). Plus récemment, des auteurs ont démontré l'activation de PERK et IRE1 en réponse à la phenformine, de façon dépendante d'AMPK (Yang et al., 2013). Citons également un travail montrant l'activation spécifique de la voie PERK/eIF2a par la metformine dans les cardiomyocytes (Quentin et al., 2012).

Aucune de ces études ne propose de mécanisme moléculaire pour expliquer l'effet de l'AMPK sur les voies UPR et en particulier sur la voie PERK. Dans un travail sur les leucémies aiguës lymphoblastiques, il a été montré de façon préliminaire que la metformine inhibe l'expression de la chaperonne GRP 78 et induit l'activation des voies IRE1 et PERK de façon AMPK dépendante (Leclerc et al., 2013).

### **Inhibition de la voie ISR en aval d'AMPK**

D'autres travaux proposent au contraire une inhibition de la voie ISR en aval d'AMPK. Ainsi, il a été montré sur des cardiomyocytes de rat que l'activation d'AMPK par l'AICAR diminuait l'activation des voies UPR en réponse à l'hypoxie (Terai et al., 2005). Des résultats similaires ont été retrouvés dans des cellules épithéliales tubulaires rénales, où la metformine diminuait l'induction des voies UPR (mesurées par l'induction de CHOP et GRP94) en réponse à divers agents tels que la glucosamine ou le 2 déoxyglucose (Thériault et al., 2011). Cependant, ces observations n'étaient pas confirmées avec la tunicamycine et ne semblaient pas dépendre d'AMPK.

On constate donc que de nombreuses relations existent entre la voie anabolique majeure que constitue mTORC1 et les deux voies cataboliques de réponse au stress AMPK et ISR (figure 17). Ces trois voies convergeant entre autre vers le processus macromoléculaire d'autophagie, nous allons revenir plus en détail sur ce processus.



**Figure 17. Relations entre les voies mTORC1, ISR et AMPK**

Les connections activatrices sont symbolisées par des flèches, et celles inhibitrices par des barres. Les connections les mieux caractérisées (au plan moléculaire et dans différents modèles) sont figurées en traits épais, et celles les moins bien décrites en pointillés.

## **L'autophagie**

L'autophagie est un processus cellulaire par lequel une partie du matériel cellulaire est séquestrée par une vésicule à double membrane, puis adressée au lysosome pour y être digérée. Ce terme comprend différentes formes d'autophagie, dont l'autophagie médiée par les chaperonnes (où les protéines cytoplasmiques transloquent dans le lysosome), la microautophagie (où la membrane lysosomale s'invagine, ce qui permet la digestion de petites quantités de cytoplasme) et la macroautophagie dont il sera question ici en utilisant le terme « autophagie ». C'est un processus qui permet aux cellules d'assurer l'élimination des organites ou macromolécules dysfonctionnels, et ainsi de recycler des macromolécules ou des acides aminés. En conditions de stress, la suractivation du processus d'autophagie peut alors permettre aux cellules de survivre. Cependant, une activation excessive et dérégulée de l'autophagie peut aussi conduire à la mort cellulaire, bien que cette notion de mort cellulaire par autophagie ait probablement été utilisée excessivement (Kroemer and Levine, 2008).

Le processus d'autophagie est connecté au système ubiquitine-protéasome qui est l'autre système majeur de dégradation des protéines. Au plan moléculaire, les deux systèmes reposent sur l'identification des substrats pas la conjugaison de molécules d'ubiquitine, même si les résidus utilisés pour la polyubiquitinylation ne sont pas les même pour l'adressage au protéasome (K 49) ou pour l'adressage aux autophagosomes (K 63 ou monoubiquitinylation) (Kirkin et al., 2009). Au plan fonctionnel, il a été observé dans de nombreux modèles que l'inhibition du protéasome entraîne une activation de l'autophagie, en partie via l'augmentation du stress du réticulum endoplasmique et l'activation des voies UPR (Ding et al., 2007). Au contraire, l'inhibition de l'autophagie compromet le fonctionnement du protéasome, probablement du fait de l'accumulation de p62/SQSTM1 qui pourrait empêcher la reconnaissance des protéines ubiquitinylées par le protéasome (Korolchuk et al., 2009).

### ***Description moléculaire***

L'autophagie est un processus complexe qui comprend plusieurs étapes successives :

- formation et expansion d'une double membrane appelée phagophore ou membrane d'isolation. L'origine du phagophore est probablement une région spéciale du réticulum endoplasmique située à proximité des mitochondries, nommée MAM pour mitochondria associated endoplasmic reticulum membrane (Lamb et al., 2013).

- fusion des deux extrémités du phagophore pour former un autophagosome, qui contient du matériel cytoplasmique (cytosol et organites)
- fusion de l'autophagosome avec le lysosome pour former l'autophagolysosome, après transport de l'autophagosome le long des microtubules faisant intervenir la dynéine (Ravikumar et al., 2005)
- dégradation du contenu de l'autophagosome par les hydrolases lysosomales et export des macromolécules produites vers le cytoplasme.

Le contenu des autophagosomes peut être non spécifique (cytoplasme), ou peut intéresser spécifiquement certains organites comme par exemple les mitochondries (mitophagie) (Lu et al., 2013a). Dans ces cas d'autophagie sélective, les organites cibles sont marqués par le système ubiquitine, et reconnus par la protéine LC3 via des intermédiaires moléculaires tels que p62/SQSTM1, ou NBR1 (neighbour of BRCA1 gene 1) possédant un domaine LIR (LC3 interacting region) (Kirkin et al., 2009). Qu'elle soit spécifique ou non, l'autophagie nécessite la formation d'autophagosomes, selon plusieurs étapes qui font intervenir une vingtaine de gènes très conservés parmi les espèces, que l'on peut regrouper en quatre complexes (figure 18). Ces gènes ont été initialement décrits chez la levure et leurs différents orthologues chez l'humain seront indiqués systématiquement lorsqu'ils sont connus:

- l'initiation fait intervenir le complexe Atg13 / Atg7 (orthologue FIP200 (Focal adhesion kinase family interacting protein of 200kDa)) / Atg1 (orthologues ULK1 et ULK2), complexe qui interagit avec les membranes via le domaine C-terminal d'ULK1 (Chan et al., 2009). mTORC1 phosphoryle directement ULK1 sur le résidu S 757, ce qui inhibe cette kinase et AMPK la phosphoryle sur les résidus S 317 et 777, ce qui l'active (Kim et al., 2011). Le rôle de ce complexe dans l'autophagie varie selon les types cellulaires, puisque l'inactivation d'ULK1 par ARN interférence dans les cellules HEK-293T inhibe l'autophagie (Jung et al., 2009), mais l'inactivation génétique de ULK1 chez la souris n'empêche pas l'autophagie dans la plupart des tissus (Kundu et al., 2008).
- La nucléation est assurée par les complexes impliquant Vps34. Vps34 est une phosphatidylinositol-3-kinase de classe III, qui permet la formation de phosphatidylinositol-3-phosphate. Le phosphatidylinositol-3-phosphate va alors recruter des effecteurs, parmi lesquels les protéines WIPI (WD repeat domain phosphoinositide interacting) qui favorisent la formation des autophagosomes. Vps34

s'associe à Atg6 (orthologue Beclin 1) et Vps15 (orthologue p150), et à d'autres partenaires au sein de différents complexes ayant des rôles distincts dans l'autophagie :

- l'association à Atg14 (orthologue Atg14L) et AMBRA1 (activating molecule in beclin 1 related autophagy 1) forme le complexe I, qui régule les premières étapes de formation de l'autophagosome et promeut l'autophagie
- l'association à UVRAG (ultraviolet irradiation resistance associated gene), définit le complexe II, impliqué dans des étapes de maturation des autophagosomes
- l'association à UVRAG et Rubicon forme le complexe III, qui inhibe la formation des autophagosomes (Matsunaga et al., 2009).

La formation et l'activation de ces complexes sont régulées par de nombreuses voies de signalisation. Ainsi, Bcl2 interagit avec Beclin 1 et empêche ainsi son interaction avec Vps34 (Patingre et al., 2005). La phosphorylation de Bcl2 par JNK1 (Wei et al., 2008) ou par DAPK (Death Associated protein Kinase) (Zalckvar et al., 2009) entraîne la dissociation du complexe Bcl2-Beclin1, et permet donc l'association de Beclin 1 avec Vps34.

- L'élongation du phagophore fait intervenir les complexes Atg8 (orthologue LC3 (microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3)) et Atg12 qui sont deux systèmes de conjugaison. LC3 et Atg12 sont des protéines ayant une structure proche de celle de l'ubiquitine, qui sont conjuguées par des systèmes enzymatiques successifs proches du système des ubiquitine ligases. LC3 est ainsi clivée par la protéase Atg4 pour devenir LC3-I, activée par Atg7, puis conjuguée au phosphatidyléthanolamine (LC3-II) par Atg3. Atg12 est conjuguée à Atg5 par une réaction faisant intervenir Atg7 et Atg10, puis s'associe à Atg16L. Ces deux complexes de conjugaison interagissent et sont nécessaires à l'activation complète de l'autre complexe (Yang and Klionsky, 2010).
- Après la fusion avec le lysosome, le contenu de l'autophagosome est dégradé par les hydrolases lysosomale. Les macromolécules et acides aminés ainsi générés sont exportés dans le cytoplasme par des perméases de la membrane lysosomale, comme Atg22 par exemple. Le recyclage des protéines de l'autophagie implique la protéine

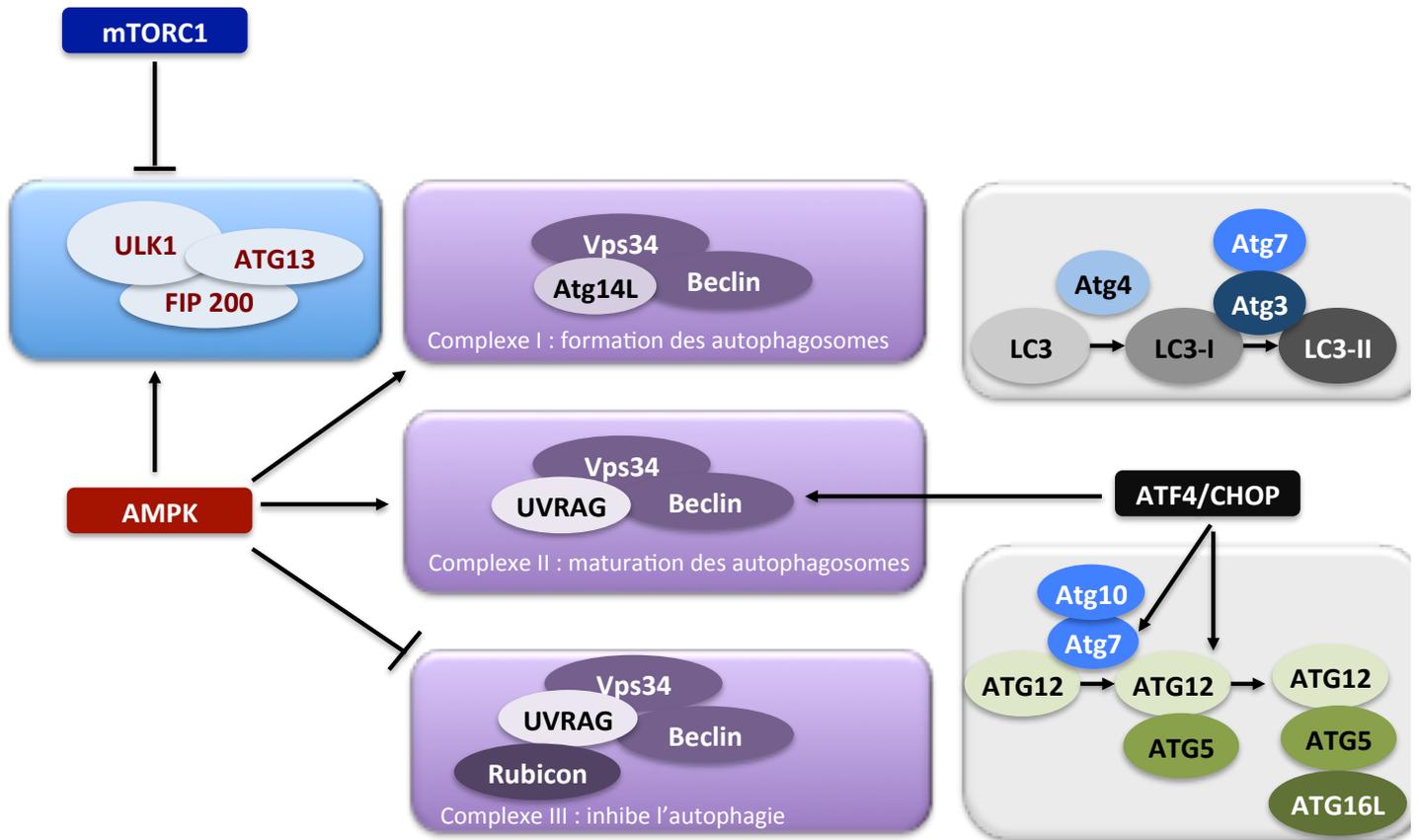
transmembranaire Atg9 (orthologue mAtg9), qui permet également de fournir des membranes pour les étapes d'élongation du phagophore (Yamamoto et al., 2012).

Ces différentes étapes constituent ce que certains auteurs ont proposé d'appeler la voie canonique de l'autophagie, par opposition à des voies non canoniques de l'autophagie pouvant être définies par exemple par l'absence de rôle de certains des complexes définis ci-dessus (Codogno et al., 2012).

Ainsi, une induction d'autophagie indépendante des complexes Beclin-Vps34 mais dépendante d'Atg7 et Atg5-Atg12 a été décrite en réponse au resveratrol, un inhibiteur de l'ATP synthase qui active indirectement AMPK (Mauthe et al., 2011; Scarlatti et al., 2008). Cette autophagie indépendante de Beclin1 a été également décrite dans des modèles de neurones exposés à divers agents (staurosporin, etoposide) (Grishchuk et al., 2011).

De même, il a été également décrit une autophagie ULK 1 indépendante (Cheong et al., 2011) : les MEF invalidées pour ULK 1 et 2 ne peuvent pas activer l'autophagie en cas de privation en acides aminés, mais sont capables de le faire en cas de privation en glucose ou d'inhibition de la glycolyse ou en réponse à l'élévation de la concentration en ammoniac.

Enfin, des observations d'autophagie en l'absence d'Atg5 ou Atg7 ont été décrites : dans ces situations, il n'y a pas de lipitation de LC3 et les membranes des autophagosomes proviennent alors probablement de l'appareil de Golgi (Nishida et al., 2009).



**Figure 18. Description moléculaire de la voie canonique de l'autophagie.**

Les différents complexes moléculaires impliqués successivement dans la formation des autophagosomes sont représentés schématiquement. Le contrôle de ces différents complexes par les voies mTORC1, AMPK et ISR est également illustré.

## ***Régulation de l'autophagie par les voies mTORC1, AMPK et ISR***

### **Inhibition de l'autophagie par mTORC1**

mTORC1 a été parfaitement identifié comme étant un inhibiteur de l'autophagie chez la levure (Noda and Ohsumi, 1998) comme chez les eucaryotes supérieurs (Ravikumar et al., 2004). Le mécanisme implique le contrôle par mTORC1 du complexe ULK1 – ATG13– FIP200. En effet, mTORC1 inhibe ULK par phosphorylation directe du résidu S 757 (Jung et al., 2009) et l'inhibition de cette phosphorylation (par la privation en acides aminés ou le traitement par rapamycine) active l'autophagie.

D'autres mécanismes expliquent l'inhibition de l'autophagie par mTORC1. Ainsi, mTORC1 phosphoryle DAP1 (Death Associated protein 1) sur les résidus S 3 et 51, ce qui active cette protéine elle-même inhibitrice de l'autophagie (Koren et al., 2010).

De façon contradictoire, il est possible que l'activation de mTORC1 puisse favoriser l'autophagie dans certains contextes cellulaires ou en réponse à certains stimuli. C'est le cas notamment dans des lignées de cancer colique, où la thioguanine favorise l'autophagie. Dans ces lignées, l'inhibition concomitante de mTORC1 par la rapamycine empêche l'induction d'autophagie (Zeng and Kinsella, 2008).

### **Induction de l'autophagie par AMPK**

Une partie des effets d'activation de l'autophagie en aval d'AMPK est médiée par l'inhibition de mTORC1 par AMPK (cf. supra).

Un mécanisme direct d'activation de l'autophagie a été démontré plus récemment, puisque AMPK est capable de phosphoryler ULK1 (S 555), ce qui active cette kinase qui est essentielle aux premières étapes de la formation des autophagosomes (Egan et al., 2011). En particulier, l'autophagie induite par cet axe AMPK/ULK1 semble particulièrement importante pour la mitophagie, puisque l'inactivation de cet axe conduit à une accumulation de mitochondries malformées (Egan et al., 2011).

AMPK régule aussi l'autophagie au niveau des complexes Vps34. En effet, AMPK phosphoryle directement Beclin1 (phosphorylation activatrice) et Vps34 (phosphorylation inhibitrice). En présence d'Atg14L, la phosphorylation de Beclin 1 est favorisée et celle de Vps34 est inhibée, ce qui explique qu'AMPK active les complexes contenant Atg14L favorisant l'autophagie, aux dépens des complexes contenant Rubicon inhibant l'autophagie (Kiem et al., 2013). De façon importante, ce mécanisme d'activation permet à AMPK d'activer l'autophagie de façon indépendante d'ULK1.

Enfin, un autre mécanisme a été décrit pour expliquer l'induction d'autophagie par AMPK. En effet, la stabilisation de p27<sup>kip1</sup> par AMPK non seulement bloque la progression dans le cycle cellulaire, mais promeut l'autophagie. L'expression du mutant de p27 phosphomimétique du site phosphorylé par AMPK (T198D) est suffisante pour induire l'autophagie (Liang et al., 2007).

### **Induction de l'autophagie par la voie ISR**

De nombreux travaux ont montré que l'activation des voies UPR favorise l'autophagie (Høyer-Hansen and Jäättelä, 2007). Concernant la voie ISR plus particulièrement, il a été montré que la voie PERK/eIF2A contrôle au niveau transcriptionnel le niveau d'expression d'ATG12, et favorise l'autophagie en réponse à des peptides de polyglutamine (Kouroku et al., 2006). De même, la phosphorylation d'eIF2A par PKR contrôle l'autophagie induite par l'infection par herpes simplex (Tállóczy et al., 2002). D'autres travaux ont montré que CHOP active la transcription de nombreux gènes de l'autophagie tels que LC3 et ATG5 (Rouschop et al., 2010). Plus récemment, ce travail a été confirmé et généralisé, avec la mise en évidence d'une activation transcriptionnelle par CHOP et ATF4 d'un réseau de gènes essentiels à l'autophagie tels que p62/SQSTM1, ATG7, ATG12, Beclin 1 et la démonstration de la fixation de dimères CHOP/ATF4 sur une séquence AARE (amino acid response element) du promoteur de p62/SQSTM1 (B'chir et al., 2013).

## ***Autophagie et cancer***

Comme nous l'avons vu avec la voie AMPK ou la voie de l'ISR, le rôle de l'autophagie dans le cancer est complexe et ce processus ne peut pas être considéré de manière univoque comme suppresseur de tumeur ou oncogénique.

### **Rôle suppresseur de tumeur de l'autophagie**

Plusieurs arguments permettent de proposer un rôle essentiellement suppresseur de tumeur de l'autophagie (Lorin et al., 2013). Ainsi, l'existence de mutations inactivatrices de gènes importants pour l'autophagie dans des cancers sporadiques, comme c'est le cas par exemple pour le gène codant Beclin1 dans environ 50% des cancers du sein ou de l'ovaire. L'inactivation génétique hétérozygote de Beclin1 chez la souris favorise la survenue de tumeurs spontanées (Qu et al., 2003), même s'il faut noter qu'il n'a pas été observé d'inactivation du deuxième allèle dans les modèles murins. Ces données suggèrent que l'haploinsuffisance de Beclin1 est oncogénique, mais que son invalidation totale n'apporte pas d'avantage sélectif supplémentaire ou pourrait être délétère à la progression tumorale.

Plusieurs mécanismes sont proposés pour expliquer comment l'autophagie exercerait ce rôle suppresseur de tumeur, comme par exemple la régulation du facteur de transcription NRF2 (nuclear factor erythroid 2 [NF-E2]-related factor 2) (White, 2012). NRF2 est un facteur de transcription qui favorise l'expression des gènes impliqués dans la réponse anti-oxydante et qui est dégradé par son interaction avec l'E3 Ubiquitin ligase KEAP1 (Kelch like-ECH-associated protein 1). p62/SQSTM1, un des substrats de l'autophagie, peut se lier à KEAP 1 et ainsi protéger NRF2 de la dégradation. En l'absence d'autophagie, l'accumulation de p62/SQSTM1 permet donc l'expression du programme transcriptionnel antioxydant en aval de NRF2, qui permet aux cellules cancéreuses de survivre au stress oxydatif souvent élevé dans l'environnement tumoral.

### **Rôle oncogénique de l'autophagie**

Alors que nous avons présenté l'existence de mutations de Beclin1 ou d'autres gènes de l'autophagie dans les cancers sporadiques comme un argument en faveur du rôle suppresseur de tumeur de ce processus, on peut également souligner que l'absence de perte d'hétérozygotie

démontre l'importance de l'autophagie dans le développement tumoral. De plus, l'autophagie pourrait être importante pour permettre aux cellules de s'adapter et survivre au stress oncogénique, comme en atteste par exemple l'induction d'autophagie dans les cellules transformées par H- ou K- ras V12 et la résistance à la transformation par H- ou K-ras V12 des cellules où l'autophagie est inhibée (Guo et al., 2011).

Il est probable que l'autophagie soit essentielle aux cellules cancéreuses pour lutter contre les différents stress auxquelles elles sont soumises, comme par exemple l'hypoxie. En effet, il a été noté une plus grande abondance d'autophagosomes dans les zones hypoxiques des tumeurs (Degenhardt et al., 2006). En cas d'hypoxie, le facteur de transcription HIF1 $\alpha$  n'est plus dégradé et peut favoriser la transcription de ces gènes cibles, parmi lesquels BNIP3, une protéine à domaine BH3 qui va libérer Beclin1 de son interaction avec Bcl2 et ainsi promouvoir l'autophagie (Mazure and Pouyssegur, 2009).

Ainsi, le rôle de l'autophagie dans la transformation et la croissance tumorale semble complexe et probablement largement dépendant du contexte tissulaire et moléculaire du cancer. Compte tenu de ces remarques, il est probable que l'autophagie puisse représenter une cible thérapeutique en oncologie, même si les deux stratégies d'inhibition ou d'activation de ce processus pourraient être défendues.

## **OBJECTIFS DE LA THESE**

Mon travail de thèse a consisté en l'étude des effets du composé GSK621, un activateur direct d'AMPK dans les LAM. Cet activateur direct a été développé par les laboratoires GlaxoSmithKline comme agent antidiabétique et nous a permis d'évaluer le potentiel thérapeutique de l'activation d'AMPK dans les LAM. Les objectifs de ce travail étaient donc 1/ de caractériser l'effet anti-leucémique du composé GSK621 dans différents modèles de LAM et en particulier dans des cellules primaires (en comparant des cellules issues de patients atteints de LAM et des cellules hématopoïétiques normales issues de donneurs sains) ; 2/ de confirmer la spécificité de ce composé vis à vis de l'AMPK ; 3/ de comprendre les mécanismes moléculaires expliquant la mort des cellules leucémiques après l'activation pharmacologique d'AMPK.

## RESULTATS

Les résultats obtenus au cours de mon travail de thèse ont été regroupés pour leur majeure partie au sein d'un manuscrit écrit en anglais et destiné à être soumis prochainement à la revue Nature Medicine. Ce manuscrit est fourni dans son intégralité dans mon mémoire de thèse, et sera suivi d'un résumé en français des principaux résultats qui y sont décrits. Je présenterai ensuite les résultats expérimentaux suggérant qu'une nouvelle cible d'AMPK, la kinase PERK, pourrait jouer un rôle dans les effets antileucémiques produits par l'activation d'AMPK. Ces derniers résultats ne sont pas encore assez aboutis pour justifier une publication et seront donc décrits en français dans une seconde partie.

## **Première partie : article soumis**

### **Co-activation of AMPK and mTORC1 is synthetically lethal in acute myeloid leukemia**

Pierre Sujobert<sup>1,2,3</sup>, Etienne Paubelle<sup>4,5,6,7</sup>, Adrien Grenier<sup>1,2,3</sup>, Florence Zylbersztejn<sup>4,5,6,7</sup>, Mireille Lambert<sup>1,2,3</sup>, Laury Poulain<sup>1,2,3</sup>, Elizabeth Townsend<sup>8</sup>, Jean-Marie Brusq<sup>9</sup>, Edwige Nicodeme<sup>9</sup>, Justine Decroocq<sup>4,5,6,7</sup>, Ina Nepstad<sup>9</sup>, Alexa Green<sup>1,2,3</sup>, Marie-Anne Hospital<sup>1,2,3</sup>, Nathalie Jacque<sup>1,2,3</sup>, Olivier Hermine<sup>4,5,6,7</sup>, Marc Foretz<sup>1,2</sup>, Benoit Viollet<sup>1,2</sup>, Catherine Lacombe<sup>1,2,3</sup>, David M. Weinstock<sup>8</sup>, Patrick Mayeux<sup>1,2,3</sup>, Ivan C. Moura<sup>4,5,6,7</sup>, Didier Bouscary<sup>1,2,3</sup> and Jerome Tamburini<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Institut Cochin, Département d'Immuno-Hématologie, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Unité Mixte de Recherche (UMR) 8104, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1016, Paris

<sup>2</sup> Université Paris Descartes, Faculté de Médecine Sorbonne Paris Cité, Paris, France

<sup>3</sup> Equipe Labellisée Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC), Paris, France

<sup>4</sup> INSERM UMR 1163, Laboratory of cellular and molecular mechanisms of hematological disorders and therapeutic implications, Paris, France.

<sup>5</sup> Paris Descartes – Sorbonne Paris Cité University, Imagine Institute, Paris, France.

<sup>6</sup> CNRS ERL 8254, Paris, France.

<sup>7</sup> Laboratory of Excellence GR-Ex, Paris, France.

<sup>8</sup> Department of Medical Oncology, Dana-Farber Cancer Institute and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA

<sup>9</sup> GlaxoSmithKline research and development center (Les Ulis, France)

<sup>10</sup> Haukeland University Hospital, Division for Hematology, Department of Medicine, N-5021 Bergen, Norway

Contact Informations : Dr Jerome Tamburini, Cochin Institute, 22 rue Mechain, 75014 Paris, France. Tel : +33158412122 ; Fax : +33140516510 ; email : jerome.tamburini@inserm.fr

## ABSTRACT

New strategies specifically targeting leukemic cells while sparing normal tissues, including the hematopoietic compartment, are desperately needed to treat acute myeloid leukemia (AML) patients. AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) is a master regulator of cellular metabolism<sup>1</sup> that turn off energy-consuming cellular processes upon energy starvation. Among important AMPK relays is the mammalian Target of Rapamycin Complex 1 (mTORC1), which controls protein synthesis, lipid and glucose metabolism and displays a critical role in the regulation of autophagy<sup>2</sup>. We report here that specific AMPK activation (using GSK621) selectively kills AML cells but spares normal hematopoietic progenitors. Cytotoxicity of GSK621 against AML cells involves the activation of autophagy that is independent of mTORC1 inhibition. Conversely, this differential sensitivity to GSK621 is dependent on a constitutive mTORC1 activity in AML cells. Strikingly, AMPK and mTORC1 are involved in a unique synthetic lethal interaction that is abrogated in AML cells by chemical or genetic ablation of mTORC1 signaling. The same synthetic lethality can be established in CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitors by constitutive activation of AKT or enhanced in AML cells by deletion of *TSC2*. The amplitude of mTORC1 activation thus determines cytotoxicity induced by AMPK in AML.

To directly and potently target AMPK, we developed a thienopyridone-derived<sup>3</sup> compound hereby referred to as GSK621 (Figure 1A) that consistently activated AMPK recombinant heterotrimers in vitro (Supplemental Figure 1A). GSK621 was significantly more potent than the tool compound A-769662<sup>4</sup> at inducing AMPK activation, as measured by the level of acetyl-CoA carboxylase (ACC) phosphorylation (Figure 1B). Hence, we explored AMPK-dependent signaling pathways in GSK621-treated AML cell lines (MOLM-14, HL-60 and OCI-AML3) and in primary AML samples. As shown in Figure 1C, GSK621 markedly increased phosphorylation at AMPK $\alpha$  T172, a marker of AMPK activation, and also stimulated the phosphorylation of well-characterized direct AMPK substrates (ACC S79 and ULK-1 S555)<sup>5</sup>. To clarify whether these effects are dependent on AMPK, we utilized mouse embryonic fibroblasts (MEFs) from AMPK  $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 2 homozygous knockout animals<sup>6</sup>. In contrast with wild-type MEFs, GSK621 was unable to induce AMPK substrate phosphorylation in knockout MEFs (*Ampk*<sup>-/-</sup> MEFs) (Supplemental Figure 1B). Significantly, GSK621 decreased the viability of wild-type (*Ampk*<sup>+/+</sup>) MEFs but had minimal effects on the viability of *Ampk*<sup>-/-</sup> MEFs (p<0,001, Figure 1D). The specific toxicity of GSK621 in cells with AMPK was not the case for other putative AMPK activators, including A-769662, which were toxic to both wild-type and *Ampk*<sup>-/-</sup> MEFs (Supplemental Figure 1C). To confirm GSK621 specificity in AML cells, we depleted MOLM-14 cells of AMPK $\alpha$ 1, which is the only AMPK catalytic subunit isoform expressed in hematopoietic cells (Supplemental Figures 1D-E). We incubated AMPK $\alpha$ 1 knockdown MOLM-14 cells (generated using lentivirally-transduced shRNAs) with vehicle or GSK621. AMPK $\alpha$ 1-depleted cells had reduced annexin V positivity after treatment with GSK621 (43.9% versus 73% for scrambled shRNA, P<0,01; Supplemental Figure 1F). To confirm these results, we deleted the *PRKAA1* gene that encodes AMPK $\alpha$ 1 by CRISPR/Cas9 genome editing<sup>7</sup>. As observed with knockdown, *PRKAA1*-deleted cells were significantly protected from GSK621-induced apoptosis (Figure 1E). Repeated exposure to GSK621 in *PRKAA1*-deleted cells led to the gradual selection of GSK621-

resistant cells consistent with a further reduction in AMPK $\alpha$ 1 protein expression (Figure 1E). In contrast, cells transduced with a non-targeted (SCR for scrambled) RNA guide were unable to enrich for resistance upon repeated exposure to GSK621. We conclude from these results that GSK621 is a highly specific AMPK activator in AML cells.

To determine the anti-leukemic activity of GSK621, we assayed a set of 20 AML cell lines that capture diverse molecular abnormalities (Supplemental Table 1). IC<sub>50</sub> of GSK621 for each cell line ranged from 13-30 $\mu$ M (Figure 2A and Supplemental Figure 2A). GSK621 (30 $\mu$ M) reduced the proliferation of all 20 lines and induced apoptosis (defined by positivity of annexin V and negativity of 7-AAD staining by flow cytometry) in 85% of them (17/20) (Figure 2B and Supplemental Figures 2B-C). We also exposed 16 primary AML samples corresponding to different AML subtypes (Supplemental Table 2) to 30 $\mu$ M GSK621 and consistently observed a significant induction of annexin V ( $p < 0.01$  compared to vehicle treatment, Figure 2C). In contrast, the same concentration of GSK621 had no effect on annexin V positivity in normal human CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells ( $n=9$ ,  $p=0.84$ , Figure 2C). To assess the impact of GSK621 on leukemic progenitor cells, we generated murine leukemias by transduction of bone marrow hematopoietic cells with either MLL-ENL<sup>8</sup> or FLT3-ITD<sup>9</sup>. After treatment with vehicle or GSK621, leukemic cells were tested for serial replating capacity (Figure 2D, model), which is a well established indicator of stemness in vitro<sup>10</sup>. GSK621 significantly reduced colony formation after each replating (Figure 2D), suggesting that AMPK activation by GSK621 depletes not only the bulk but also the leukemic progenitor population in AML. We next determined GSK621 in vivo activity by xenografting MOLM-14 cells in NUDE mice and treating with intraperitoneal injections of vehicle or GSK621. As shown in Figure 2E, GSK621 given twice-daily at 10mg/kg or 30mg/kg induced a dose-dependent reduction in leukemia growth compared to vehicle-treated animals. Moreover, 30mg/kg but not 10mg/kg GSK621 significantly extended survival (Figure 2F). As expected, GSK621 concentrations in mouse sera were significantly higher when dosed with

30mg/kg compared to 10mg/kg (Figure 2G). These results correlated to enhanced AMPK activity, as demonstrated by increased AMPK $\alpha$  T172 phosphorylation, and induction of apoptosis, as measured by TUNEL staining (Figure 2H). We conclude from these results that GSK621 achieves in vivo anti-AML activity.

We then aimed to understand the mechanisms modulating AML cell death induced by GSK621. As previously suggested, AMPK activation may promote autophagy to restore energy balance<sup>5,11</sup>. Using electron microscopy<sup>12</sup>, we observed that GSK621 induced the formation of numerous autophagosomes (Figure 3A). Surprisingly, such features were absent in rapamycin-treated AML cells (Figure 3A). Indeed, mTORC1 is a well documented inhibitor of autophagy<sup>13</sup> and mTORC1 inhibition by AMPK has been linked to autophagy induction essentially in HEK293 or MEF cells<sup>14</sup>. However, the effects of mTORC1 inhibition on autophagy depend on both cell type<sup>15-17</sup> and cellular context<sup>18</sup>. We observed here in AML cell lines (MOLM-14, HL-60 and OCI-AML3) and in primary AML samples that rapamycin had no impact on autophagosome formation as attested by the absence of LC3B-II accumulation by western blotting, contrasting with the effects of GSK621 (Figure 3B). Addition of chloroquine which blocks the degradation of autophagosomes<sup>16</sup> confirmed that GSK621 increased the autophagic flux (Supplemental Figure 3A)<sup>12,16</sup>. We confirmed autophagy induction in GSK621-treated cells by flow cytometry for monodansylcadaverin (MDC)<sup>19</sup> (Figures 3C-D), and by immunofluorescence analysis of LC3B protein, which showed a shift from a diffuse intracellular localization to a dot-shaped distribution after GSK621 exposure (Figures 3E-F). Autophagy related (ATG) 5 and 7 play a critical role in the formation of autophagosomes<sup>13</sup>. Significantly, GSK621-induced apoptosis was reduced upon ATG5 or ATG7 knockdown (Figures 3H-I and Supplemental Figure 3B). ATG7-depleted MOLM-14 cells also had a significant growth advantage in the presence of GSK621 in a methylcellulose growth assay compared with controls (Supplemental Figure 3C). Both caspase and autophagy inhibition (by qVD and chloroquine<sup>20</sup>, respectively) partially protected

MOLM-14 cells from GSK621-induced apoptosis while combined inhibition totally reversed GSK621 cytotoxicity (Supplemental Figure 3D). While autophagy inhibition with chloroquine reduced caspase-3 and PARP cleavage (Supplemental Figures 3E-F), caspase inhibition did not modify GSK621-induced autophagy, suggesting that autophagy was not the consequence of caspase activation. Together these results suggest that activation of AMPK is an efficient way to induce autophagy and cell death in AML cells, which is probably unrelated to mTORC1 inhibition in this model.

We hypothesized 2 different models for the role of mTORC1 activity in the context of AMPK activation (figure 4A). In the first model (oncogene addiction), AMPK activation suppresses mTORC1 - as shown in different models including HEK293 (Supplemental Figure 4A) and MEF cells<sup>21</sup> - which in turn contributes to AML cell death. Arguing against this hypothesis, GSK621 did not inhibit mTORC1, as attested by a persistent phosphorylation of p70S6K (T389) in AML cell lines (MOLM-14, HL-60 and OCI-AML3) and primary AML samples (Figure 4B), suggesting a dissociation between AMPK activation and mTORC1 suppression in AML. In the second model (synthetic lethality), sustained mTORC1 activity is required for the cytotoxic response to AMPK activation. To test this hypothesis, we first ectopically expressed a constitutively active AKT (myrAKT)<sup>22</sup> in normal human CD34+ hematopoietic progenitors. myrAKT activates mTORC1 in these cells, as evidenced by phosphorylation of the direct mTORC1 substrates p70S6K (T389) and 4E-BP1 (S65) (Figure 4B, right panel). GSK621 induced apoptosis only in myrAKT-transduced CD34+ cells and not in control cells (Figure 4B, left panel). Strikingly, this effect was reversed by co-treatment with the mTORC1 inhibitor rapamycin, indicating that the GSK621 effect requires mTORC1 activation (Figure 4B, left panel). We overactivated mTORC1 in the MOLM-14 cell line by deleting *TSC2*<sup>23,24</sup> gene by CRISPR/Cas9 (Figure 4B). In those cells, mTORC1 overactivation attested by enhanced p70S6K (T389) phosphorylation correlated to enhanced GSK621 cytotoxicity (Figure 4C). In support of this, mTORC1 inhibition by shRNA targeting raptor or

mTOR (Figure 4D and Supplemental Figure 4B) or by rapamycin (Supplemental Figures 4C-F) also protected AML cells from GSK621-induced apoptosis. We conclude from these data that the amplitude of mTORC1 activation governs the cytotoxic response to GSK621 and explains the therapeutic window of AMPK activation in normal hematopoietic cells.

We compared GSK621 gene expression signature in *Ampk*<sup>+/+</sup> and *Ampk*<sup>-/-</sup> leukemic cells to capture the effects specifically resulting from AMPK activation by GSK621. Among the most significantly modified pathways (Supplemental Figure 4G) was the eukaryotic translation initiation factor 2-alpha (eIF2 $\alpha$ ) pathway (Figure 4F), which is tightly controlled by mTORC1<sup>25,26,27</sup>. We showed that GSK621 enhanced the expression of terminal effectors of the eIF2 $\alpha$  pathway (ATF4 and CHOP)<sup>28</sup> in AML cell lines and primary samples (Figure 4G and Supplemental Figures 4H-I). Rapamycin reduced baseline and GSK621-induced ATF4 mRNA (Figure 4H and Supplemental Figure 4K, respectively) and protein expression (Figure 4G), as reported in other models<sup>26</sup>. Conversely, mTORC1 overactivation driven by *TSC2* deletion increased baseline and GSK621-induced ATF4 protein expression which is fully inhibited by rapamycin in MOLM-14 cells (Figure 4G). We used thapsigargin to induce endoplasmic reticulum stress, which is a well-describe way to activate the eIF2 $\alpha$  pathway<sup>28</sup>. In MOLM-14 cells, thapsigargin blunted the protective effect of rapamycin on GSK621-induced apoptosis which correlated to a release of CHOP mRNA expression (Figure 4I). From these data we concluded that terminal effectors of the eIF2 $\alpha$  pathway are controlled by mTORC1 and contribute to the synthetic lethal interaction between AMPK and mTORC1 co-activation in AML.

While an increasing body of evidence emphasizes metabolic dysregulation as a cancer hallmark<sup>29</sup>, the role of AMPK in cancer biology is controversial. AMPK appears to act as either a tumor suppressor or promote oncogenesis, dependent on context<sup>30-34</sup>. In AML, the anti-leukemic potential of AMPK activation has been suggested through the use of metformin, an indirect AMPK activator<sup>35</sup>. However, the biological activity of biguanides (including

metformin and phenformin) in cancer mostly involves AMPK-unrelated mechanisms that depend on the general consequences of mitochondrial respiratory chain inhibition<sup>33,36-38</sup>. We show here using a highly-specific AMPK agonist (GSK621) that AMPK activation produces anti-leukemic effects in AML through an original mechanism involving autophagy induction and a synthetic lethal interaction with mTORC1 activity. In contrast to the current view of an oncogenic addiction to mTORC1 in AML<sup>39</sup>, our results suggest an unexpected role of mTORC1 in the cytotoxic response to metabolic stress and provide the molecular basis as well as the preclinical rationale for testing new AMPK activators in clinical trials in AML.

## **Methods**

### **Cell Lines**

We used K562, HEL, THP-1, U937, KG1A, UT7, Mo7e, TF-1, OCI-AML3, Kasumi-1, SKM-1, HL-60, OCI-AML2, EOL-1, NOMOp28, MOLM-14, MV4-11, MOLM-13, SET-2 and NB4 AML cell lines, whose main characteristics are listed in Supplemental Table 1. Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) with genetic deletion of AMPK $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 2 were previously reported <sup>6</sup>.

### **Human Primary Samples**

Patients and healthy donors provided a written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. Bone marrow (BM) or peripheral blood (PB) samples with > 70% blast cell content were obtained from sixteen patients with newly diagnosed AML. Blood or bone marrow samples from AML patients were submitted to a Ficoll-Hypaque density gradient (1800rpm during 0,5h). Mononuclear cells were collected by pipetting, washed once in phosphate buffer saline (PBS), then incubated with a red cell lysis buffer (155mM NH<sub>4</sub>Cl, 10mM KHCO<sub>3</sub>, 0.1mM EDTA) during 5 minutes, washed once again in PBS and placed in alpha-modified Minimum Essential Medium (aMEM) supplemented with 10% decomplemented fetal bovine serum (FBS) and 2mM glutamine. Samples from the bone marrow or umbilical cord blood of healthy donors were submitted to Ficoll density gradient and mononuclear cells were enriched in the CD34-positive-containing fraction using human CD34 microbead kit and MIDIMACS immunoaffinity columns (both from Milteny Biotech, Bergish Badgash, Germany). Cells were then cultured in aMEM supplemented with 10% decomplemented fetal bovine serum (FBS) and 2mM glutamine

### **Reagents and Constructs**

GSK621 is a pyrrolo[3,2-d]pyrimidin-3-yl derivate obtained by a multistep chemical synthesis and chosen as the most potent AMPK activator in an in vitro AMPK enzymatic assay<sup>40</sup>.

GSK621 was solubilized in DMSO, stored at -20°C and then diluted in 10% FBS aMEM prior to its addition to cell culture. We also used A-769662 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), rapamycin and chloroquine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Oligomycin, puromycin, monodansylcadaverin (MDC) and doxycycline (Dox) were from Sigma-Aldrich. We utilized a myrAKT plasmid from Addgene (number 31790, Cambridge, MA, USA) that was cloned into a pLKO.1 vector for lentiviral expression using the Gateway system (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) with pLenti PGK Puro DEST (Addgene plasmid 19068)<sup>41</sup>.

### **ACC Phosphorylation Assay**

HEPG2 cells were treated with increasing doses of A-769662 or GSK621, and ACC S79 phosphorylation was assessed as a surrogate marker for AMPK activation using a commercially available ELISA kit (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA).

### **RNA Interference**

PLKO and Tet-pLKO-puro plasmids (Addgene plasmids 8453 and 21915, respectively<sup>42,43</sup>) were used to generate lentivirus able to stably express constitutive or doxycycline-inducible shRNA in AML cell lines after puromycin selection. We also used the pTRIPZ plasmid (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) to produce doxycycline-inducible ATG5 shRNA lentiviral vectors.

### **CRISPR/Cas9 Genome Editing**

*PRKAA1* and *TSC2* specific guide RNA were designed using the Optimized Crispr Design application from the laboratory of Dr. Feng Zhang (<http://crispr.mit.edu/>). We retained two guides for *PRKAA1* (encoding AMPK $\alpha$ 1): AMPK#1: CAAGGGTATGGCGTGCCCT and AMPK#2: GAATGGTACTCTTTCAGGAT. For knocking out *TSC2*, we used the following guide: AACAATCGCATCCGGATGAT. We used the following non-targeted guide as a control: GTAGGCGCGCCGCTCTCTAC (referred as to CTR for control). These guides were

then cloned into the lentiCRISPR plasmid (Addgene plasmid 49535)<sup>7</sup> allowing subsequent lentiviral infection of AML cell lines.

### **Lentivirus Production and AML Cell Line Infection**

We used 293-T packaging cells to produce all of the constructs through co-transfection of these cells with plasmids encoding lentiviral proteins. Supernatants were collected and ultracentrifuged for 48 h after transfection over two consecutive days, and then stored at -80°C. AML cell lines were plated at  $2 \times 10^6$ /ml and 10  $\mu$ l of lentiviral supernatants were added for 3 h. Cells were then grown in 10% FCS medium and further selected with puromycin or cell sorted with an ARIA 3 cytometer. In experiments using inducible shRNAs, 200  $\mu$ g/ml doxycycline was added to the culture medium.

### **Retrovirus Production and Mouse Hematopoietic Cell Infection**

Retroviral production was performed by transient transfection of retroviral packaging cells (Plat-E, Cell Biolabs, San Diego, CA, USA) using Lipofectamine LTX Plus (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Retroviral infection of murine hematopoietic cells was facilitated by the use of retronectin-coated plaques (Takara Bio, Ōtsu, Shiga, Japan).

### **Western Blots**

Protein extracts were solubilised in Laemmli sample buffer and separated by SDS-PAGE. Primary antibodies were diluted in a 5% bovine serum albumin (BSA) TBS-tween solution overnight. Proteins were visualized using a secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase and chemiluminescence detection (ECL Select Western blotting detection reagent, GE Healthcare). Images were captured using a CCD camera (LAS3000 from FujiFilm) and processed using Multigauge software from Fujifilm. Antibodies used are detailed in Supplemental Table 2.

## Cell Viability Assays

**Uptiblue®:** *Ampk*<sup>-/-</sup> or *Ampk*<sup>+/+</sup> MEFs cells were plated in triplicate at  $5 \times 10^3$  in 100  $\mu$ l 10% FBS-supplemented MEM without or with GSK621 for 12 h. The UptiBlue™ viable cell counting reagent (Interchim, Montlucon, France) was then added during 3h and the fluorescence was measured using a Typhoon 8600 scanner.

**CellTiter-Glo®:** Twenty AML cell lines were plated at a concentration of  $4 \times 10^4$ /ml in 50  $\mu$ l ( $2 \times 10^3$  cells per well) in 10% FBS-supplemented MEM prior to addition of GSK621. Cells were cultured in the presence of GSK621 for 48h at 37°C. Viability was quantified by the luminescence-based CellTiter Glo assay (Promega, Fitchburg, WI) as previously described<sup>44</sup>. Luminescence was measured with the Envision Plate Reader (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Luminescence values were normalized to DMSO-treated controls for each AML cell line. IC<sub>50</sub> values were calculated using a four parameter non-linear regression with Graph Pad Prism v6 (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

## Flow Cytometry

We used FlowJo 7.6.5 software (Tree Star, Ashland, OR, USA) for all flow cytometry analyses.

**Apoptosis:** Apoptosis was assessed using Annexin V–phycoerythrin (PE) and 7-amino-actinomycin D (7-AAD) staining (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

**Monodansylcadaverine:** AML cells were cultured with vehicle or 30  $\mu$ M GSK621 for 12 h and then washed in PBS. Cells were then incubated 0,5 h at 37°C with 5  $\mu$ M monodansylcadaverin, then washed three times and analyzed on a LSRII cytometer (excitation and emission wavelengths 353 nm and 512 nm, respectively).

## AML Xenografts in NUDE Mice

Briefly,  $5 \times 10^6$  cells of the MOLM-14 cell line were mixed with Matrigel (1:1, vol/vol) and subcutaneously injected into 8-week-old female athymic nude mice (Janvier SAS, France).

The mice (n=4 in each group) were then treated with vehicle or with 10 or 30mg/kg/d GSK621 starting one day after AML xenotransplantation. Tumor growth was measured thrice weekly, and tumor volume was calculated by the equation:  $V = L \times (S^2)\pi/6$ , where L is the longer and S is the shorter of the two dimensions. Plasma concentration of GSK621 was measured in samples collected 5 h after drug administration (n=3). All experiments were conducted in accordance with the guidelines of the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International and after approval of the local ethics committee. At the end of the experiment, the mice were sacrificed and the tumors excised. Samples were fixed in 4% formalin for immunohistochemical analysis.

### **Clonogenic Potential of Murine Leukemia Cells**

Colony forming potential was assayed in bone marrow cells from C57BL/6 mice retrovirally transduced with the *MLL-ENL* or *FLT3-ITD* oncogenes. Cells were cultured in StemPro medium (Life Technologies) supplemented with 10ng/ml murine IL-6 and 50ng/ml murine SCF (Peprotech, Rocky Hills, NJ) for one week. After puromycin selection (*MLL-ENL*) or GFP sorting (*FLT3-ITD*),  $5 \times 10^4$  cells were plated in MethoCult GF M3434 medium (Stemcell Technologies) in the presence of vehicle or 30  $\mu\text{mol/l}$  GSK621. Colonies were counted at 7 days. For re-plating experiments, cells were collected from methylcellulose and washed once in PBS buffer. From each condition,  $5 \times 10^4$  viable cells (determined by trypan blue exclusion assay) were cultured in methylcellulose as described above.

### **Transmission Electron Microscopy**

AML cells ( $10^6$ ) were fixed for 1 hour in 3% glutaraldehyde in 0.1M sodium phosphate buffer (pH 7.4), post-fixed for 1.5 hours with 1% osmium tetroxide, dehydrated by successive ethanol washes (70%, 90%, 100%, 100%) and impregnated with epoxy resin. After polymerization, 80- to 90-nm sections were prepared using a Reichert Ultracut S ultramicrotome (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), stained with 2% uranyl acetate plus

Reynold's lead citrate, and visualized under a JEOL 1011 transmission electron microscope (JEOL, Peabody, MA, USA) with a GATAN Erlangshen CCD camera (Gatan, Pleasanton, CA, USA).

### **Immunofluorescence**

MOLM-14 cells ( $2 \times 10^5$ ) were fixed in methanol after cytocentrifugation. After washing in phosphate buffered saline (PBS) and blocking in PBS with 3% bovine serum albumin, cells were incubated for 1h with an anti-LC3 primary antibody followed by a GFP-coupled anti-rabbit secondary antibody. Cells were visualized on a Zeiss inverted microscope, and LC3 dots were automatically quantified with the open-source software CellProfiler [ENREF\\_26](#)<sup>45</sup> with the Enhance Features and Identify Primary Objects modules.

### **Gene Expression Profiling**

*MLL-ENL*-driven leukemic cells from *Ampk*<sup>-/-</sup> (n=3) or *Ampk*<sup>+/+</sup> (n=3) mice were exposed to 30 $\mu$ M GSK621 or vehicle for 6 h, and total RNA was extracted with DNase I digestion (RNeasy Mini Kit used with the Bio-robot QIAcube). Biotinylated cDNAs were prepared from 100ng total RNA using the GeneChip® Whole Transcript Sense Target Labeling Assay Kit according to the standard Affymetrix protocol (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Following fragmentation, 10ug of cDNA were hybridized for 16h at 45°C on GeneChip® Mouse Gene 2.0 ST arrays (Affymetrix), washed and stained in the Affymetrix Fluidics Station 450. GeneChips were scanned using the GCS 3000 scanner (Affymetrix).

Raw data were normalized using the Robust Multichip Algorithm (RMA) in Bioconductor R, and all quality controls and statistics were performed using Partek® Genomics Suite software (Partek, St. Louis, MO, USA). Hierarchical clustering (Pearson's dissimilarity and average linkage) and principal components analysis were conducted in an unsupervised fashion to control for experimental bias or outlier samples. To identify differentially expressed genes, we applied a classical analysis of variance (ANOVA) for each gene and made pairwise

Tukey's post hoc comparisons between groups. We then used p-values and fold changes to filter and select differentially expressed genes. Pathway analysis was performed with Ingenuity IPA software (Ingenuity® Systems, Redwood City, CA, USA).

### **Quantitative PCR**

Total RNA was extracted using an automated solid phase extraction method (RNeasy Mini Kit used with the Bio-robot QIAcube, both from Qiagen, Redwood City, CA, USA), and 1 µg of RNA was used as a template for reverse transcription with the Maxima First Strand cDNA synthesis kit (Thermo Fisher Scientific). Quantitative PCR was then performed on a Lightcycler 480 (Roche, Basel, Switzerland). The human primers that were used follow (forward: for; reverse: rev). CHOP for: CAGAGCTGGAACCTGAGGAG; CHOP rev: TGGATCAGTCTGGAAAAGCA; ATF4 for: AAGCCTAGGTCTCTTAGATG; ATF4 rev: TTCCAGGTCATCTATACC; GAPDH for: TGCACCACCAACTGCTTAGC; GAPDH rev: GGCATGGACTGTGGTCATGAG; UBC for: ATTTGGGTCGCAGTTCTT; UBC rev: CTTGACATTCTCGATGGT.

### **Statistics**

Differences between the mean values obtained for the experimental groups were analyzed using the 2-tailed Student's t test. Statistical analyses were performed using Prism software (GraphPad, La Jolla, CA).

## References

1. Hardie, D.G., Ross, F.A. & Hawley, S.A. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature reviews. Molecular cell biology* **13**, 251-262 (2012).
2. Laplante, M. & Sabatini, D.M. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* **149**, 274-293 (2012).
3. Scott, J.W., *et al.* Thienopyridone drugs are selective activators of AMP-activated protein kinase beta1-containing complexes. *Chemistry & biology* **15**, 1220-1230 (2008).
4. Cool, B., *et al.* Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Cell metabolism* **3**, 403-416 (2006).
5. Egan, D.F., *et al.* Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* **331**, 456-461 (2011).
6. Laderoute, K.R., *et al.* 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) is induced by low-oxygen and glucose deprivation conditions found in solid-tumor microenvironments. *Molecular and cellular biology* **26**, 5336-5347 (2006).
7. Shalem, O., *et al.* Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science* **343**, 84-87 (2014).
8. Barabe, F., Kennedy, J.A., Hope, K.J. & Dick, J.E. Modeling the initiation and progression of human acute leukemia in mice. *Science* **316**, 600-604 (2007).
9. Mizuki, M., *et al.* Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. *Blood* **96**, 3907-3914 (2000).
10. Yeung, J., *et al.* beta-Catenin mediates the establishment and drug resistance of MLL leukemic stem cells. *Cancer cell* **18**, 606-618 (2010).
11. Sui, X., *et al.* Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell death & disease* **4**, e838 (2013).
12. Klionsky, D.J., *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* **8**, 445-544 (2012).
13. Lamb, C.A., Yoshimori, T. & Tooze, S.A. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nature reviews. Molecular cell biology* **14**, 759-774 (2013).
14. Kim, J., Kundu, M., Viollet, B. & Guan, K.L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature cell biology* **13**, 132-141 (2011).
15. Budovskaya, Y.V., Stephan, J.S., Reggiori, F., Klionsky, D.J. & Herman, P.K. The Ras/cAMP-dependent protein kinase signaling pathway regulates an early step of the autophagy process in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* **279**, 20663-20671 (2004).
16. Mizushima, N., Yoshimori, T. & Levine, B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* **140**, 313-326 (2010).
17. Takeuchi, H., *et al.* Synergistic augmentation of rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells by phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B inhibitors. *Cancer research* **65**, 3336-3346 (2005).
18. Sheen, J.H., Zoncu, R., Kim, D. & Sabatini, D.M. Defective regulation of autophagy upon leucine deprivation reveals a targetable liability of human melanoma cells in vitro and in vivo. *Cancer cell* **19**, 613-628 (2011).
19. Vazquez, C.L. & Colombo, M.I. Assays to assess autophagy induction and fusion of autophagic vacuoles with a degradative compartment, using monodansylcadaverine (MDC) and DQ-BSA. *Methods in enzymology* **452**, 85-95 (2009).
20. Janku, F., McConkey, D.J., Hong, D.S. & Kurzrock, R. Autophagy as a target for anticancer therapy. *Nature reviews. Clinical oncology* **8**, 528-539 (2011).

21. Gwinn, D.M., *et al.* AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Molecular cell* **30**, 214-226 (2008).
22. Kharas, M.G., *et al.* Constitutively active AKT depletes hematopoietic stem cells and induces leukemia in mice. *Blood* **115**, 1406-1415 (2010).
23. Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J. & Guan, K.L. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature cell biology* **4**, 648-657 (2002).
24. Inoki, K., Zhu, T. & Guan, K.L. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* **115**, 577-590 (2003).
25. Appenzeller-Herzog, C. & Hall, M.N. Bidirectional crosstalk between endoplasmic reticulum stress and mTOR signaling. *Trends in cell biology* **22**, 274-282 (2012).
26. Duvel, K., *et al.* Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Molecular cell* **39**, 171-183 (2010).
27. Boyce, M., *et al.* A selective inhibitor of eIF2alpha dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science* **307**, 935-939 (2005).
28. Kim, I., Xu, W. & Reed, J.C. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nature reviews. Drug discovery* **7**, 1013-1030 (2008).
29. Kroemer, G. & Pouyssegur, J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer cell* **13**, 472-482 (2008).
30. Faubert, B., *et al.* AMPK is a negative regulator of the Warburg effect and suppresses tumor growth in vivo. *Cell metabolism* **17**, 113-124 (2013).
31. Hardie, D.G. The LKB1-AMPK pathway-friend or foe in cancer? *Cancer cell* **23**, 131-132 (2013).
32. Jeon, S.M., Chandel, N.S. & Hay, N. AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress. *Nature* **485**, 661-665 (2012).
33. Shackelford, D.B., *et al.* LKB1 inactivation dictates therapeutic response of non-small cell lung cancer to the metabolism drug phenformin. *Cancer cell* **23**, 143-158 (2013).
34. Shackelford, D.B., *et al.* mTOR and HIF-1alpha-mediated tumor metabolism in an LKB1 mouse model of Peutz-Jeghers syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 11137-11142 (2009).
35. Green, A.S., *et al.* The LKB1/AMPK signaling pathway has tumor suppressor activity in acute myeloid leukemia through the repression of mTOR-dependent oncogenic mRNA translation. *Blood* **116**, 4262-4273 (2010).
36. Ben Sahra, I., *et al.* Metformin, independent of AMPK, induces mTOR inhibition and cell-cycle arrest through REDD1. *Cancer research* **71**, 4366-4372 (2011).
37. Kalender, A., *et al.* Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner. *Cell metabolism* **11**, 390-401 (2010).
38. Scotland, S., *et al.* Mitochondrial energetic and AKT status mediate metabolic effects and apoptosis of metformin in human leukemic cells. *Leukemia* **27**, 2129-2138 (2013).
39. Kelsey, I. & Manning, B.D. mTORC1 status dictates tumor response to targeted therapeutics. *Science signaling* **6**, pe31 (2013).
40. Mirguet, O. & Bouillot, A. Patent WO 2011138307A1 Pyrrolo [3, 2 -d] pyrimidin-3 -yl derivatives used as activators of ampk. (2011).
41. Campeau, E., *et al.* A versatile viral system for expression and depletion of proteins in mammalian cells. *PloS one* **4**, e6529 (2009).
42. Stewart, S.A., *et al.* Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *Rna* **9**, 493-501 (2003).
43. Wiederschain, D., *et al.* Single-vector inducible lentiviral RNAi system for oncology target validation. *Cell cycle* **8**, 498-504 (2009).
44. Chapuy, B., *et al.* Discovery and characterization of super-enhancer-associated dependencies in diffuse large B cell lymphoma. *Cancer cell* **24**, 777-790 (2013).

45. Kamentsky, L., *et al.* Improved structure, function and compatibility for CellProfiler: modular high-throughput image analysis software. *Bioinformatics* **27**, 1179-1180 (2011).

## **Acknowledgments**

The authors would like to thank Olivier Mirguet and Anne Bouillot for the discovery and synthesis of GSK621, Véronique Bénéton for quantification of GSK621 levels in mouse sera, Pascal Grondin and Alizon Riou-Aymard for the *in vitro* AMPK screen assay. We also thank Alain Schmitt (Electron Microscopy Facility, Cochin Institute) for help with electron microscopy experiments and analysis; Franck Letourneur and Florent Dumont (transcriptomic Facility, Cochin Institute) for transcriptomic analysis. The authors also thank Dr Bob Weinberg and Dr Dmitri Wiederschain for sharing the pLKO and Tet-pLKO-puro plasmids, respectively, Dr Eric Campeau for sharing the pLenti PGK Puro DEST (w529-2) plasmid and Dr Feng Zhang for sharing the lentiCRISPR plasmid through Addgene. We are also grateful to Dr Nabih Azar (Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France) for contributing to the normal CD34<sup>+</sup> cell samples and to Dr Isabelle Dusanter for providing human cord blood cells.

PS was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM, poste d'accueil INSERM) and from Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC). JMB and EN are employees of the GlaxoSmithKline french research center (Les Ulis, France).

## **Authors Contribution**

PS designed and performed research, analyzed data and wrote the manuscript. EP performed mouse experiments and analyzed data. AG, FZ, ML, ET, JMB and EN performed experiments and analyzed data. JD, IN, AG, LP, MAH, NJ performed experiments. MF, BV and CL analyzed data. PM was involved in conception and realization of proteomic experiments and analyzed data. DMW, ICM and DB analyzed data and wrote the manuscript. JT designed and

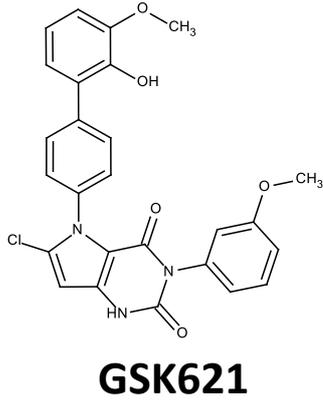
supervised research program, analyzed data and wrote the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

## Figures

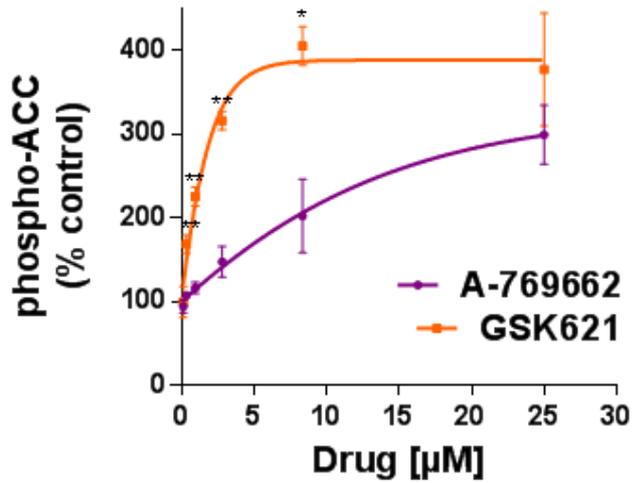
### Figure 1. GSK621 is a specific and potent AMPK activator.

**1A.** Chemical structure of GSK621. **1B.** ACC (S79) phosphorylation, reflecting AMPK activation following increasing doses of GSK621 or A-769662 treatment, was assessed by ELISA in the human HEPG2 cell line. Results are presented for each condition as a percentage of vehicle-treated cells (n=5). **1C.** AML cell lines and primary AML cells from patient #2 were incubated 6 h with vehicle or 30 $\mu$ M GSK621 and protein extracts were immunoblotted for the indicated markers. **1D.** Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs) lacking both  $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 2 AMPK subunits (*AMPK*<sup>-/-</sup>) or their wild type counterparts (*AMPK*<sup>+/+</sup>) were treated with vehicle or 30 $\mu$ M GSK621 for 12 h. Cell viability was assessed with the UptiBlue™ viable cell counting reagent. Results are presented as a ratio to the vehicle-treated condition in *AMPK*<sup>-/-</sup> and *AMPK*<sup>+/+</sup> MEFs, separately (n=3). **1E.** MOLM-14 cells were transduced with a lentivirus allowing the concomitant expression of human codon-optimized Cas9 and RNA guides (sgRNA) targeting the *PRKAA1* gene (*PRKAA1* #1 and #2) or having a non-targeted sequence (CTR). Eight days after puromycin selection, cell lines were exposed to vehicle or 30 $\mu$ M GSK621 for 48 h, then washed and consecutively exposed at 2 different times to either vehicle or 30 $\mu$ M GSK621 following the same process. Annexin V binding and AMPK $\alpha$ 1 expression were recorded at each time point (n=3). b-actin was used as a loading control in western blot experiments. Results in the graphs are expressed as the mean  $\pm$  SEM. \**P*<0.05, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001.

1A

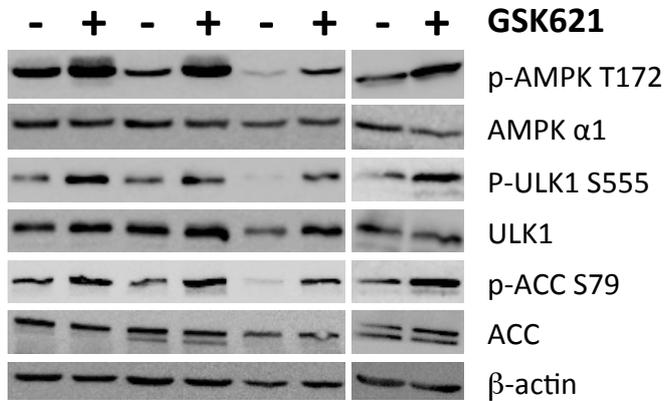


1B

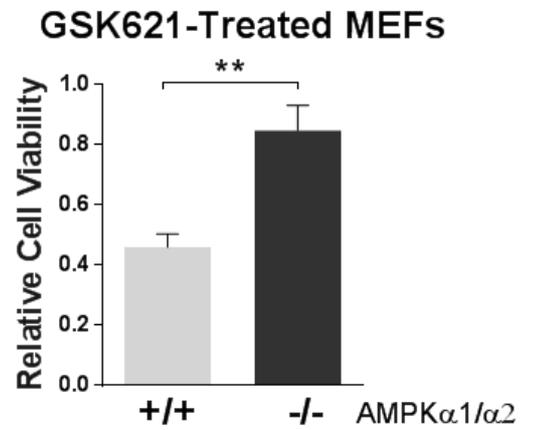


1C

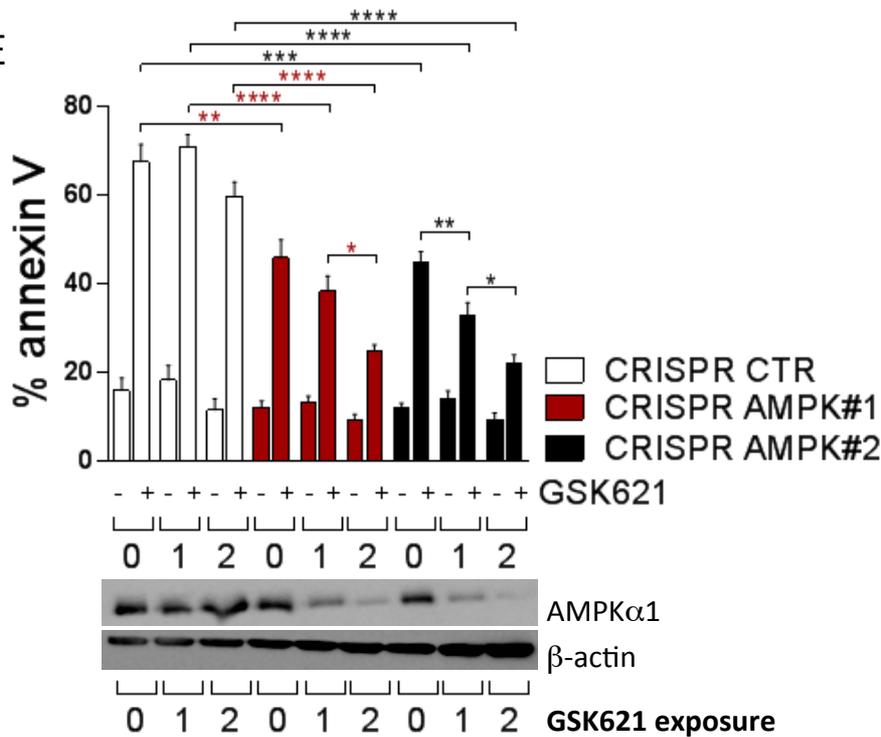
MOLM-14 HL-60 OCI-AML3 AML#2



1D



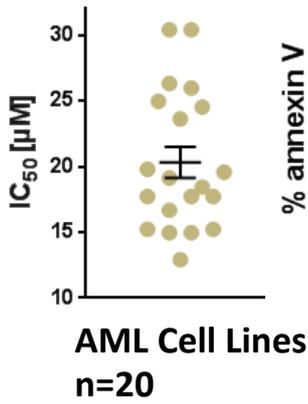
1E



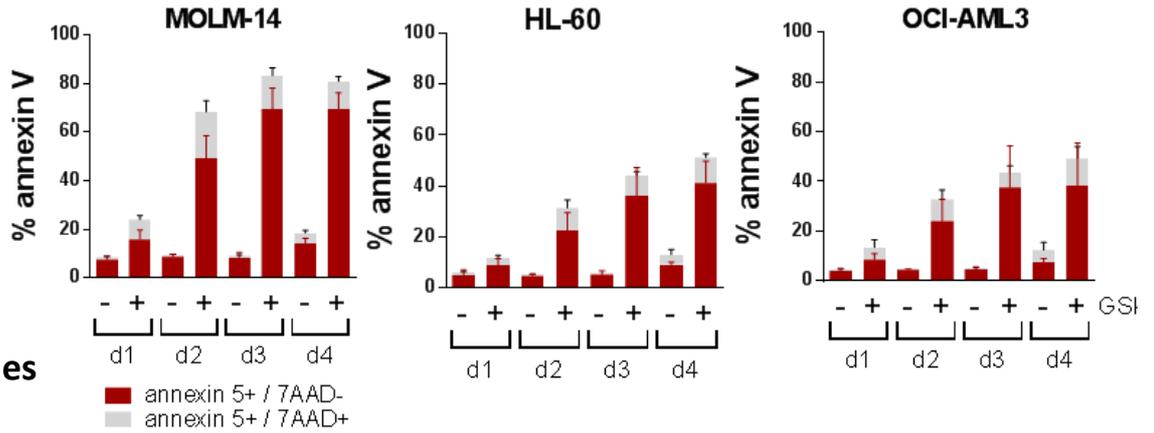
**Figure 2. AMPK activation results in anti-leukemic activity in AML.**

**2A.** Twenty different AML cell lines were cultured 48 h in quadruplicate in 384-well plates with log-dilutions of GSK621 and  $IC_{50}$  was determined for each cell line based on relative cell viability assessed by CellTiter Glo chemiluminescence. **2B.** Apoptosis was determined in AML cell lines (MOLM-14, HL-60, OCI-AML3) incubated with vehicle or 30 $\mu$ M GSK621 for up to 4 days by positivity for Annexin V and negativity for 7-AAD staining by flow cytometry. **2C.** Primary normal hematopoietic CD34+ progenitor cells (referred to as CD34+) and cells from AML patients (AML) (CD34+, n=9; AML, n=16) were cultured 48 h with vehicle or 30 $\mu$ M GSK621. Apoptosis was assessed by annexin V binding by flow cytometry. **2D.** Schematic representation of the mouse leukemia cell methylcellulose experiments: MHCs: mouse hematopoietic cells; GSK: GSK621; P2: second methylcellulose plating; P3: third methylcellulose plating. Cells were plated at  $5 \times 10^4$ /ml in methylcellulose and incubated with vehicle or 30 $\mu$ M GSK621. Colony formation was assessed at day 7. At the end of methylcellulose culture, cells were washed in PBS seeded again in methylcellulose with or without GSK621 (This step is referred to as first replating). Up to 3 successive replatings were performed. **2E-F.** Tumor growth and survival (Kaplan-Meier curve) in MOLM-14 cells xenografted into nude mice treated with vehicle, 10mg/kg or 30mg/kg GSK621 by twice-daily intraperitoneal injections. **2G.** Tumor sections were stained by TUNEL and DAPI or labeled with an anti-phospho-AMPK (T172) antibody. Representative images of three experiments are shown. **2H.** Plasma concentrations of GSK621 in mice treated with 10mg/kg or 30mg/kg GSK621 5 h after intraperitoneal injection (n=3 for each). Results in the graphs are expressed as the mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

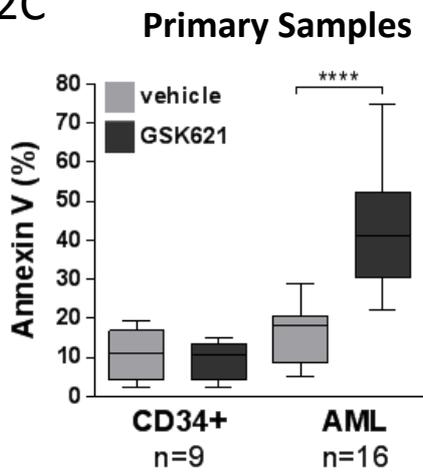
2A



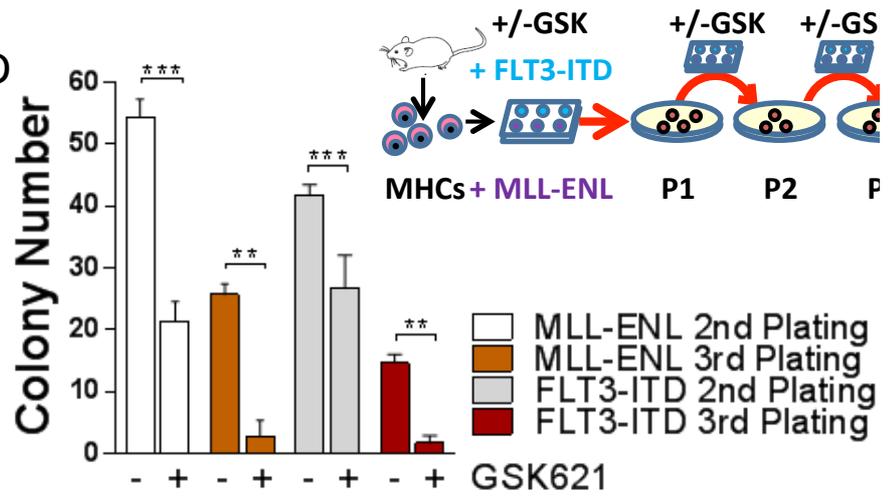
2B



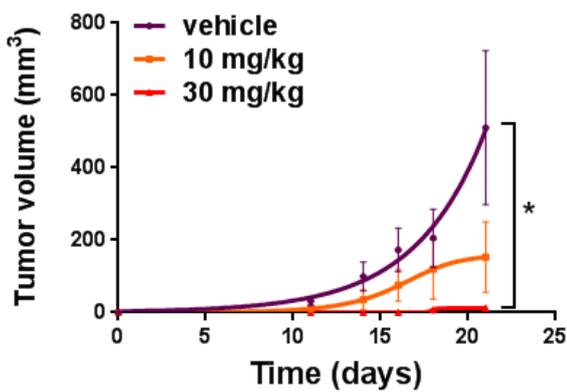
2C



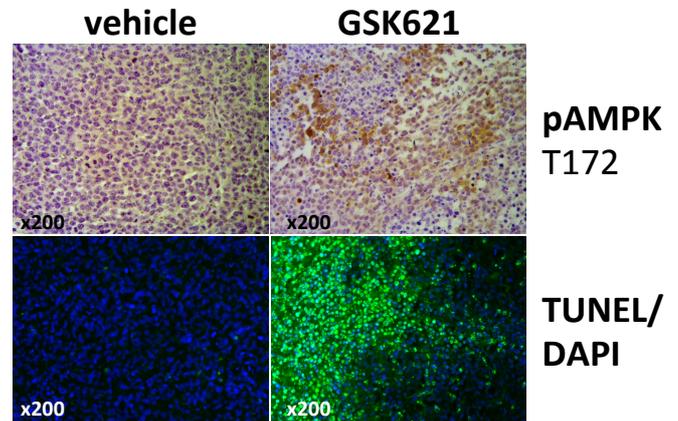
2D



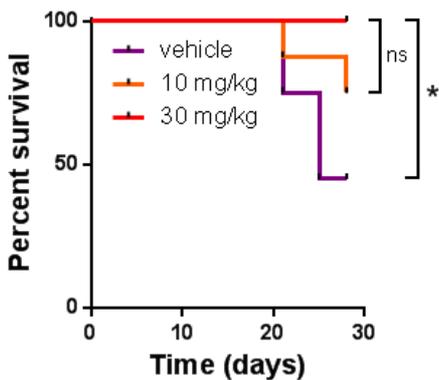
2E



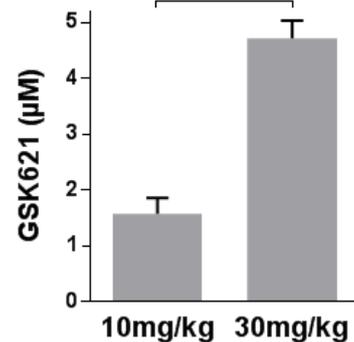
2G



2F



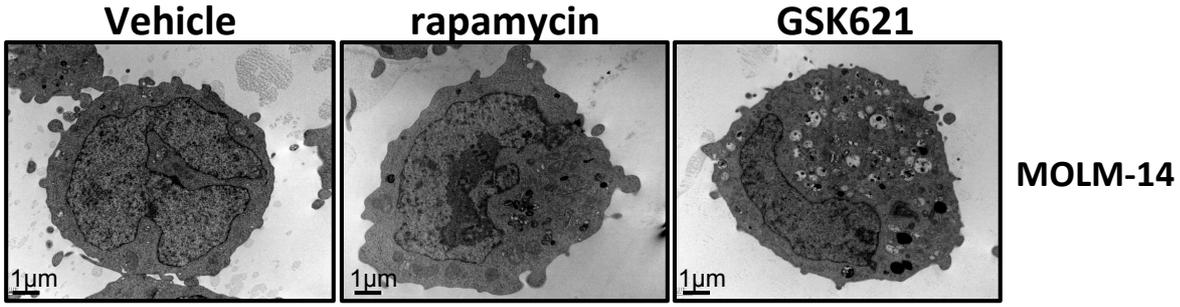
2H



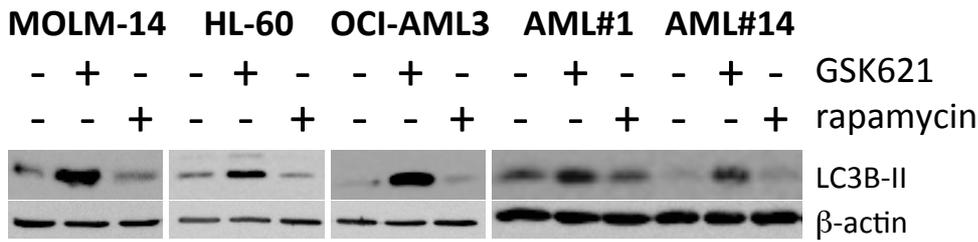
**Figure 3. Autophagy is a trigger of GSK621-induced AML cell death.**

**3A.** Electron microscopy-captured images of MOLM-14 cells treated 24 h with vehicle, 10nM rapamycin or 30 $\mu$ M GSK621 (12000x magnification). **3B.** Western blotting of MOLM-14, HL-60, OCI-AML3 AML cell lines and primary AML samples (AML1 and AML14) treated 24 h with 30 $\mu$ M GSK621 or 10nM rapamycin using anti-LC3B antibody. **3C-D.** Flow cytometry analysis of monodansylcadaverin (MDC) staining of vehicle- or GSK621 (30 $\mu$ M)-treated MOLM-14 cells (C: representative histograms and D: fluorescence intensity quantification, n=6). **3E.** Immunofluorescence analysis using an anti-LC3B antibody (left panel) and quantification of LC3B dots signal intensity (right panel) in vehicle- or GSK621-treated MOLM-14 cells. **3F-G.** Flow cytometry analysis of annexin V binding in MOLM-14 cells subjected to shRNA-mediated ATG7 (F) or ATG5 (G) knockdown. Small panels represent western blotting with ATG7 and ATG5 antibodies, respectively. b-actin is used as a control for loading. Results in the graphs are expressed as the mean  $\pm$  SEM. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ >0.001, \*\*\*\* $P$ <0.0001.

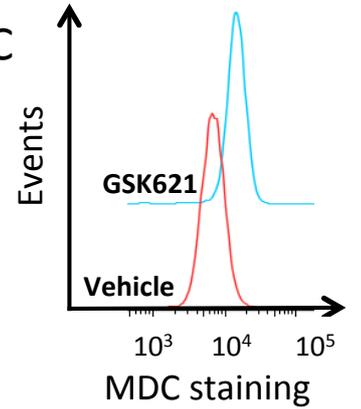
3A



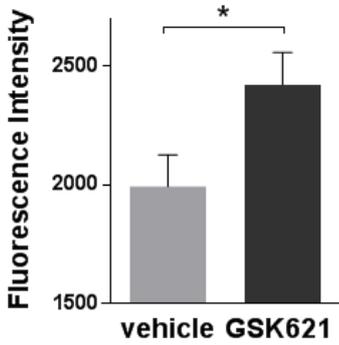
3B



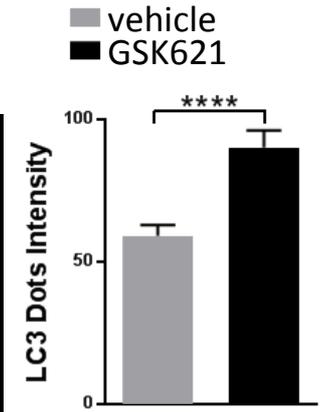
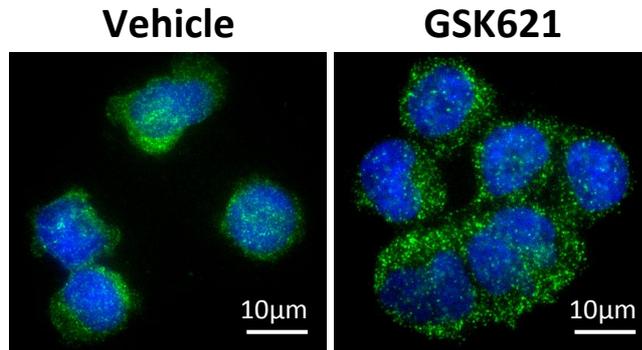
3C



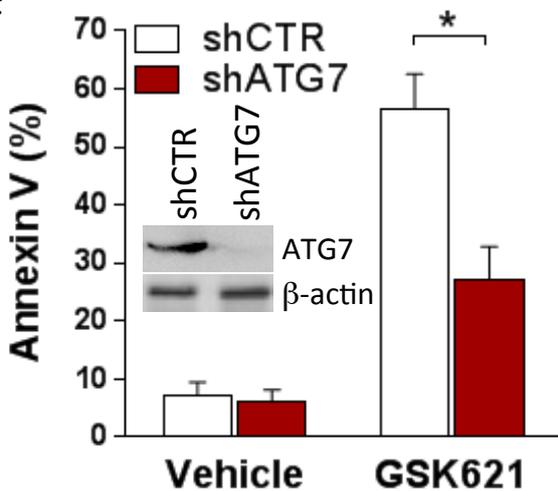
3D



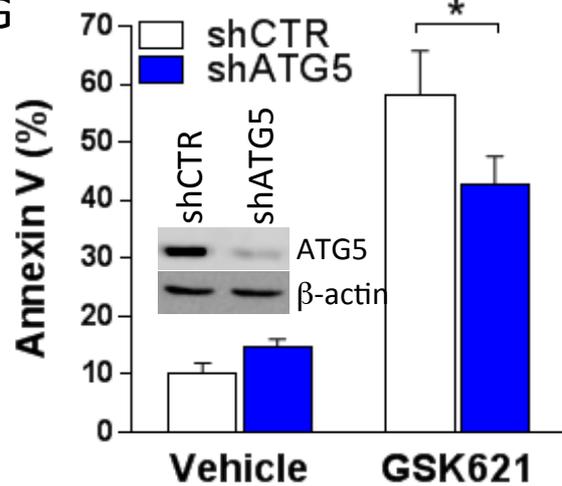
3E



3F



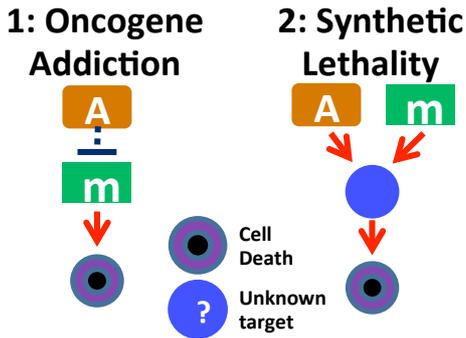
3G



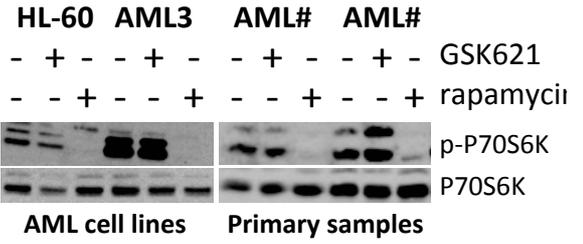
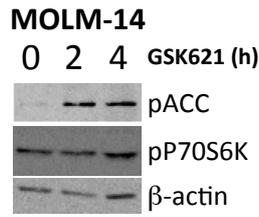
**Figure 4. AMPK and mTORC1 activation are synthetically lethal.**

**4A.** Schematic representation of the oncogene addiction (1) and synthetic lethal (2) hypothesis concerning the role of mTORC1 upon AMPK activation. **4B.** (left) Western blotting in MOLM-14 cells treated during 2 h or 4 h with 30 $\mu$ M GSK621 using anti-phospho-ACC (S79) and anti-phospho-p70S6K (T389) antibodies. (right) Western blotting in HL-60 and OCI-AML3 cell lines and primary AML samples treated with vehicle, 10nM rapamycin or 30 $\mu$ M GSK621, using anti-phospho-p70S6K (T389) antibody. **4C.** (right) Western blotting of human CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitors (referred to as “CD34<sup>+</sup> cells”) lentivirally-transduced with empty vector or with a HA-tagged myrAKT construct (left). Flow cytometry determination of Annexin V binding in CD34<sup>+</sup> cells lentivirally-transduced with empty vector or with a myrAKT construct and treated with vehicle or 10nM rapamycin for 24 h followed by addition of either vehicle or 100 $\mu$ M GSK621 for 48 h (n=3). **4D.** Annexin V binding in MOLM-14 cells lentivirally-transduced with non target (CTR) or TSC2 sgRNA and treated with a dose-range of GSK621 for 48 h (n=3). (right) Western blotting of CTR or TSC2 sgRNA-expressing MOLM-14 cells. **4E.** Annexin V binding in MOLM-14 cells transduced with doxycycline-inducible mTOR or raptor shRNA treated with 200ng/ml doxycycline (Dox) for 4 days and then vehicle or 30 $\mu$ M GSK621 was added (n=3). **4F.** Heatmap representing the gene expression variations of 7 genes involved in the eIF2 $\alpha$  signaling pathway. *AMPK*<sup>-/-</sup> or *AMPK*<sup>+/+</sup> bone marrow cells were transduced with the MLL-ENL oncogene and then treated for 6 h with vehicle (Veh, n=3) or 30 $\mu$ M GSK621 (GSK, n=3). **4G.** Control (CTR) or TSC2 CRISPR MOLM-14 cells treated with vehicle or 10nM rapamycin for 24 h and then treated with vehicle or 30 $\mu$ M GSK621 for an additional 48 h. Western blotting was done using anti-TSC2, anti-phospho-p70S6K (T389) anti-p70S6K, anti-ATF4, anti-phospho-eIF2 $\alpha$  (S51) and anti-eIF2 $\alpha$  antibodies. **4H.** Quantification by qPCR of ATF4 mRNA (normalized to GAPDH and UBC) in MOLM-14 cells treated with vehicle or 10nM rapamycin for 24 h (n=3). **4I.** MOLM-14 cells were treated with vehicle, 10nM rapamycin, 5nM thapsigargin or the combination of rapamycin and thapsigargin during 24 h and then with vehicle or 30 $\mu$ M GSK621 during an additional 48 h. (left) Quantification by qPCR of CHOP mRNA (normalized to GAPDH and UBC) after 24 h exposure to GSK621 (n=3). (right) annexin V binding after 48 h exposure to GSK621. b-actin is used as a control for loading. Results in the graphs are expressed as the mean  $\pm$  SEM. \**P*<0.05, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*>0.001.

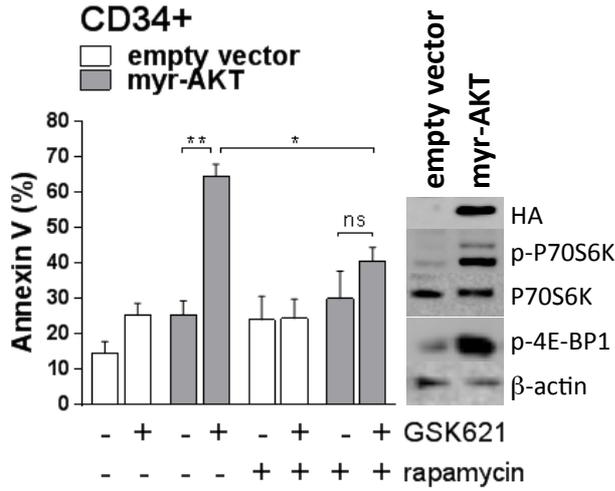
4A



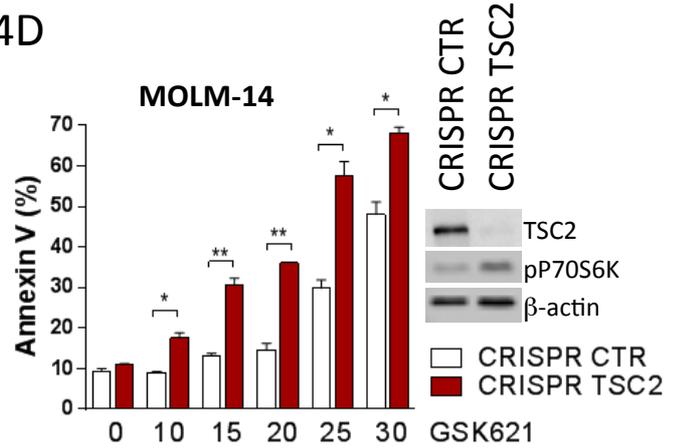
4B



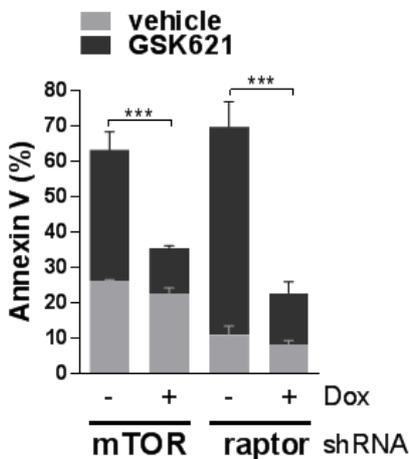
4C



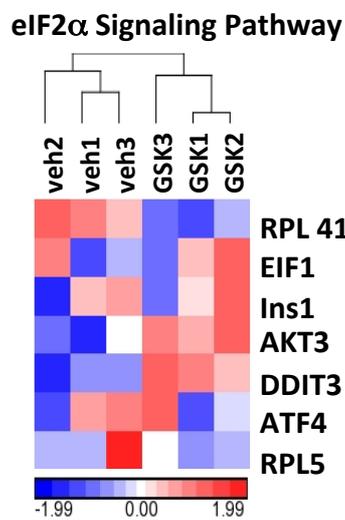
4D



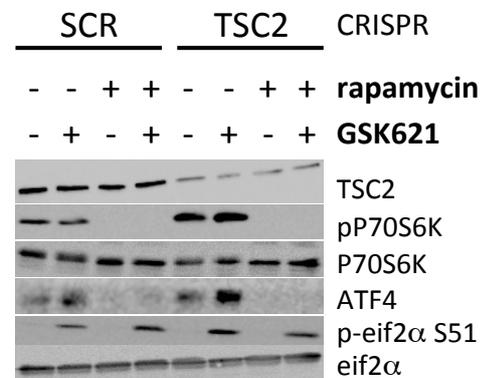
4E



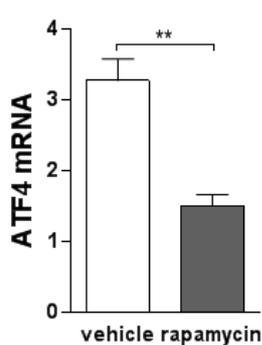
4F



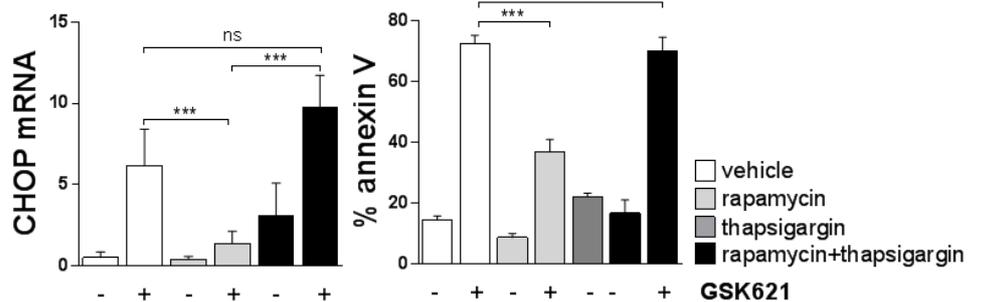
4G



4H



4I



## Supplemental figures

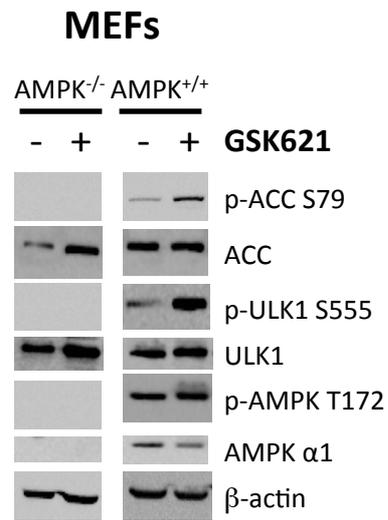
### Supplemental Figure 1. GSK621 is a direct and specific AMPK activator.

**1A.** GSK621-induced AMPK heterotrimer activation *in vitro* was measured by phosphorylation of the SAMS peptide. Results are presented as EC200 and pEC200 (-log EC200) values (n=3 for each heterotrimer). **1B.** Western blots of *Ampk*<sup>-/-</sup> or *Ampk*<sup>+/+</sup> mouse embryonic fibroblasts (MEFs) treated with vehicle or 30μM GSK621 for 6h using antibodies against phospho-ACC (S79), phospho-ULK1 (S555), phospho-AMPK (T172), ACC, ULK1 and AMPKα1. **1C.** Cell viability of *Ampk*<sup>-/-</sup> or *Ampk*<sup>+/+</sup> MEFs treated with vehicle versus 10mM metformin for 24 h, 5mM phenformin for 12h, 200μM A-769662 for 12 h, or 2mM AICAR for 12 h. Cell viability was assessed with the UptiBlue™ viable cell counting reagent. Results are presented as a ratio of cell viability in experimental- compared to vehicle-treated conditions in *Ampk*<sup>-/-</sup> and *Ampk*<sup>+/+</sup> MEFs separately (n=3 in each comparison group). **1D.** Western blots of protein extracts from 5 AML cell lines (HL-60, MOLM-14, MV4-11, OCI-AML3 and NB4) and from HEK293 cells using antibodies against AMPKα1 and aMPKα2. **1E.** Expression of the AMPKα2-encoding gene *PRKAA2* among a panel of human cancer cell lines and normal tissues (downloaded from the Cancer Cell Line Encyclopedia). **1F.** Annexin 5 binding (left panel) and western blotting using AMPKα1 antibody (right panel) in MOLM-14 cells subjected to shRNA-induced AMPKα1 knockdown or to SCR shRNA and cultured for 48 h with vehicle or 30μM GSK621 (n=5). b-actin was used as a loading control in Western blot experiments. Results are expressed as mean ± SEM. “ns”: not statistically significant.

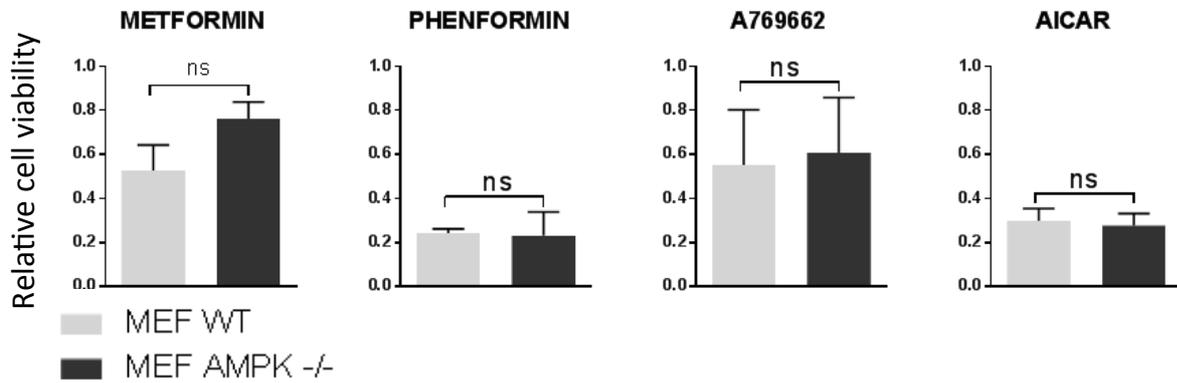
1A

Heterotrimer	pEC200	EC200 (μM)
α1β1γ1	6,7	0,26
α1β1γ2	6,5	0,40
α1β1γ3	6,5	0,35
α2β1γ1	7,3	0,05
α1β2γ1	5,4	4,70
α2β2γ1	5,7	1,90
α2β2γ3	5,9	1,63

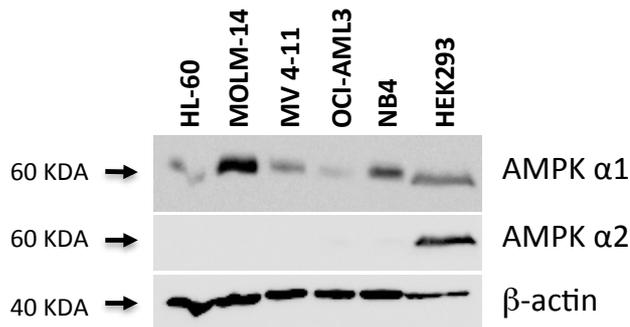
1B



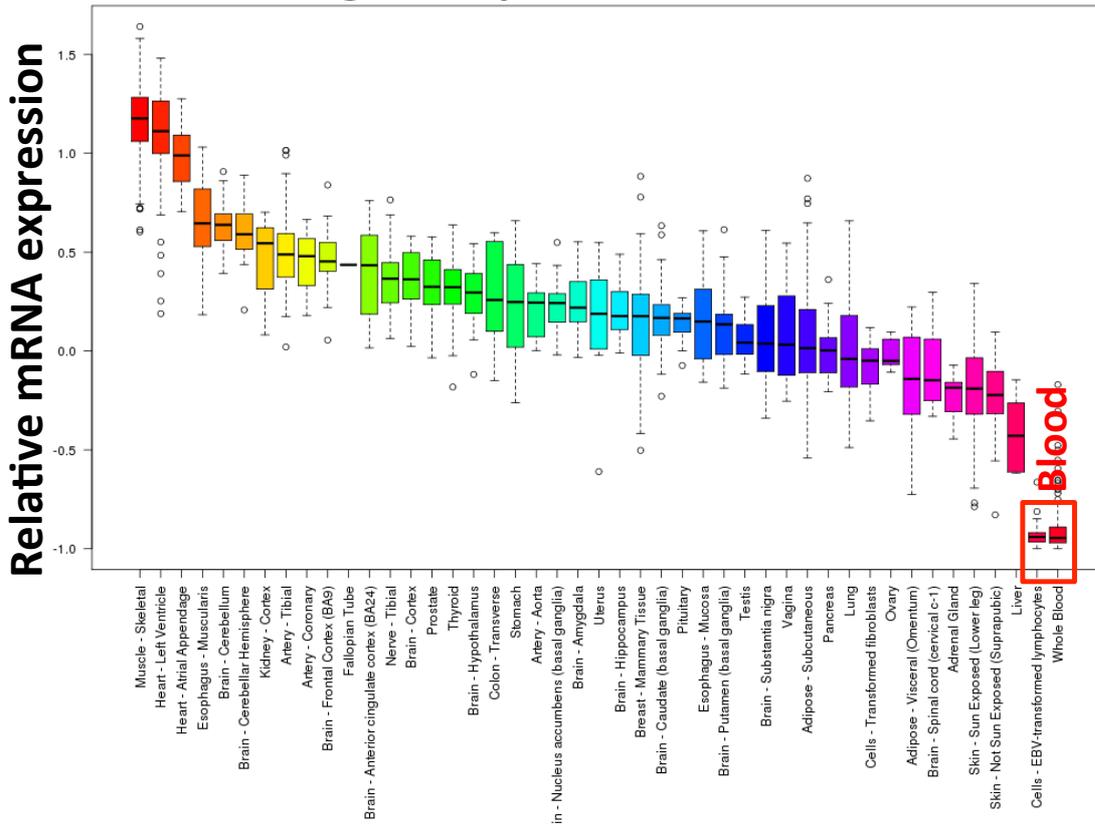
1C



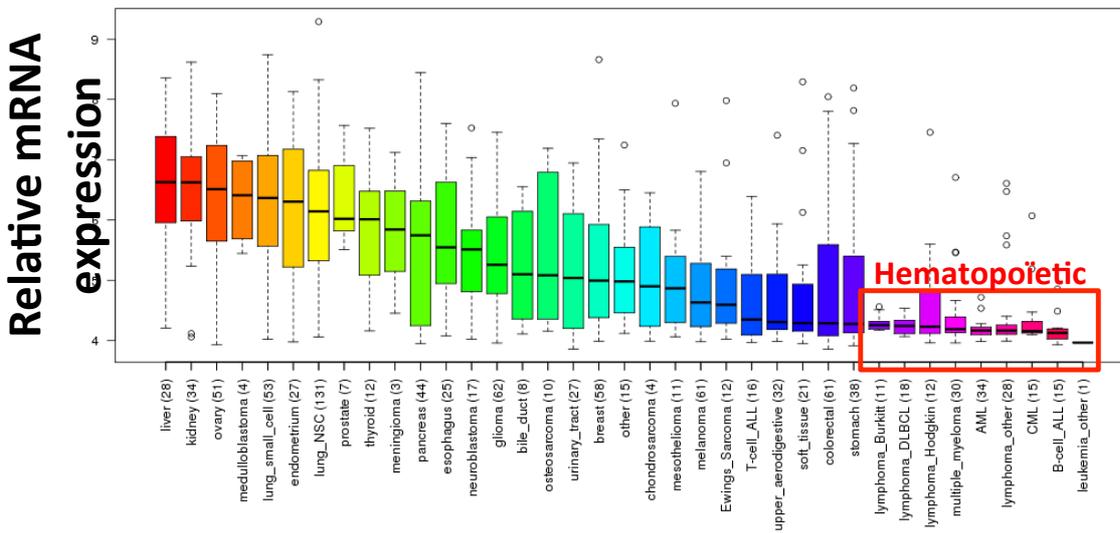
1D



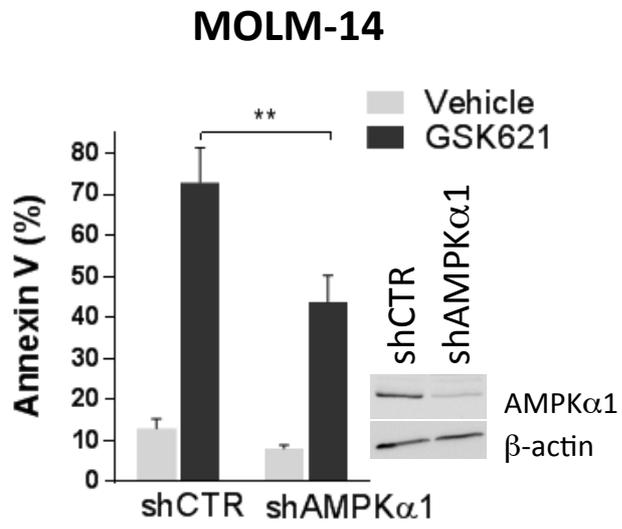
### PRKAA2 gene expression in normal tissues



### PRKAA2 gene expression in cancer tissues



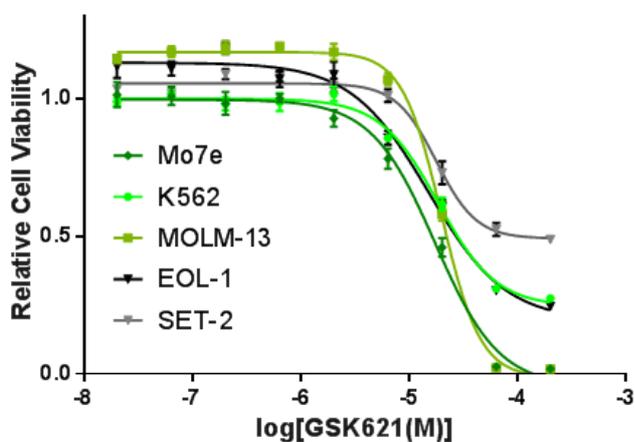
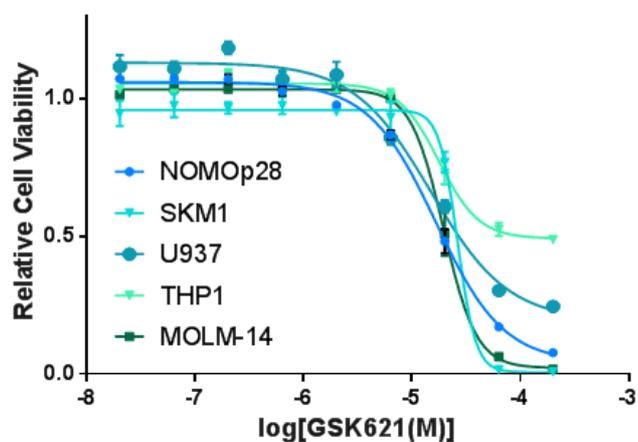
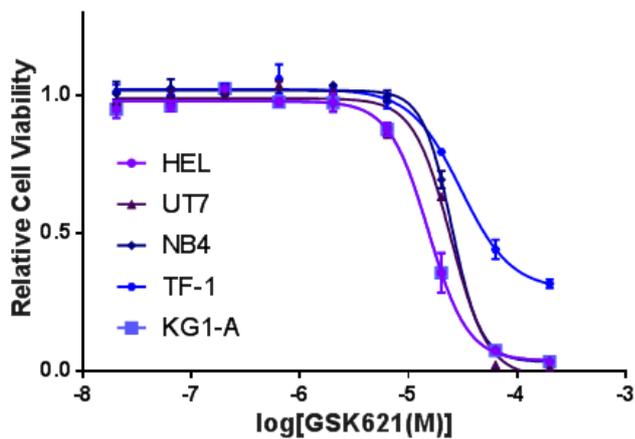
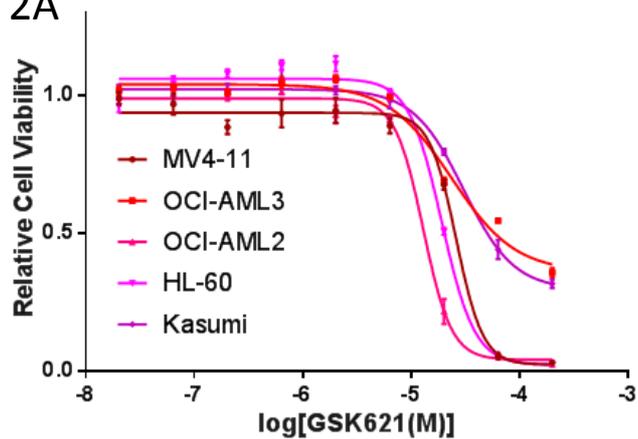
1F



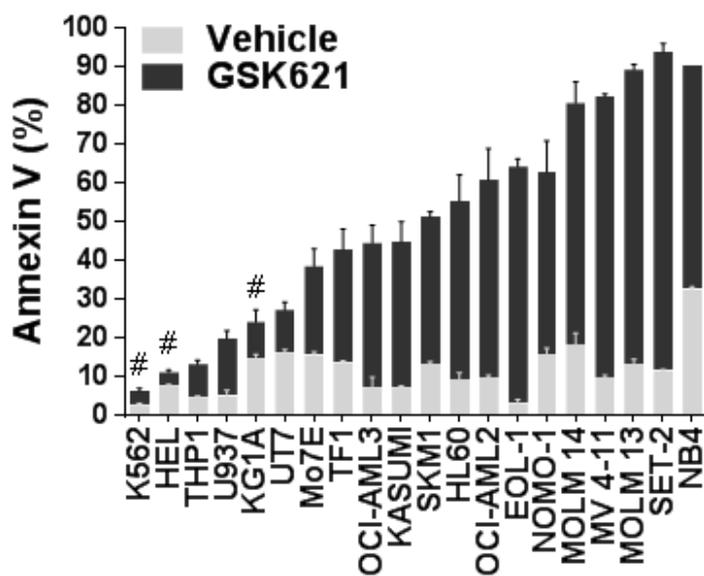
**Supplemental figure 2. Specific AMPK activation induces apoptosis in AML.**

**2A.** Relative cell viability of 20 AML cell lines treated with log<sub>10</sub> dilutions of GSK621 determined by CellTiter-Glo® assay. Results are presented for 5 different cell lines per panel. **2B.** Apoptosis as determined by flow cytometry for annexin V in cells incubated with vehicle or 30µM GSK621 for 48 h. Twenty AML cell lines were tested. In all cases except those marked by “#”, differences between vehicle-treated and GSK621-treated AML cells were significant (n=3 for each cell line). **2C.** Proliferation rate estimated by daily cell counting in 20 AML cell lines treated with vehicle or 30µM GSK621 over a 4-day period. Results are presented relative to the vehicle condition for each cell line and on each day in heat map format.

2A

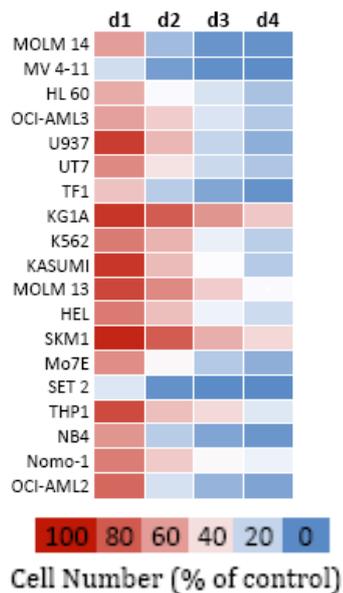


2B



2C

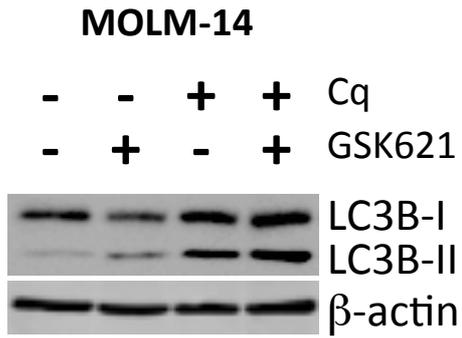
GSK621-treated AML cell lines



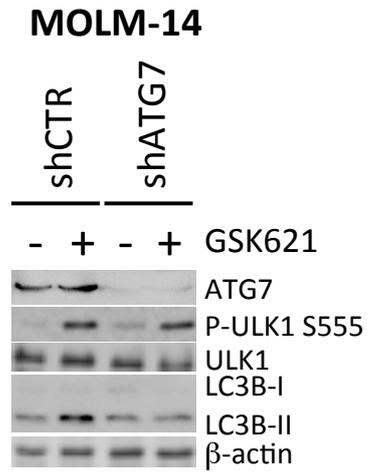
**Supplemental figure 3. Autophagy is not induced by mTORC1 inhibition but contributes to cell death following AMPK activation in AML.**

**3A.** MOLM-14 cells were treated with 30 $\mu$ M GSK621, 10 $\mu$ M chloroquine (Cq) or combination and western blot was performed with an anti-LC3B antibody **3B.** MOLM-14 cells were transduced with scrambled shRNA or shRNA targeting ATG7. Cells were then treated with vehicle or 30 $\mu$ M GSK621 for 24 h and western blots were performed using anti-ATG7, anti-phospho-ULK1 (S555), anti-ULK1 and anti-LC3 antibodies. **3C.** Colony formation in MOLM-14 cells lentivirally transduced with scramble or ATG7 shRNA. Cells ( $5 \cdot 10^3$ ) were incubated for 48 h with vehicle or 30 $\mu$ M GSK621 and then cultured in methylcellulose for 7 days. **3D.** Annexin V binding by flow cytometry in MOLM-14 cells treated with vehicle or 30 $\mu$ M GSK621, and after pretreatment by 10 $\mu$ M chloroquine (autophagy inhibitor), 10nM qVD (caspase inhibitor) or combination. **3E.** Western blotting in MOLM-14 cells treated with 10nM qVD, 30 $\mu$ M GSK621 or combination using anti-caspase-3 and anti-LC3B antibodies. **3F.** Western blotting in MOLM-14 cells treated with 10 $\mu$ M chloroquine, 30 $\mu$ M GSK621 or combination using anti-cleaved caspase-3, anti-PARP and anti-LC3B antibodies. b-actin was used as a loading control in Western blot experiments. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

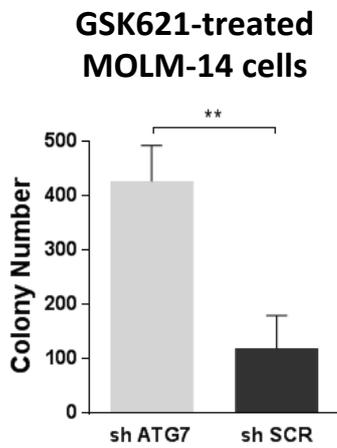
3A



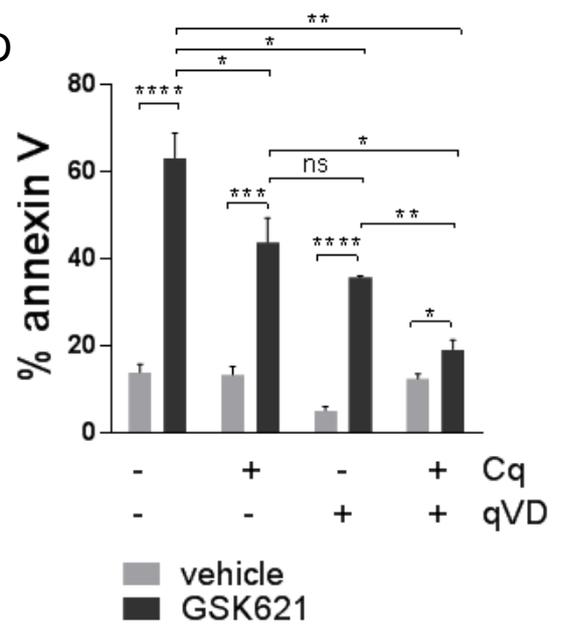
3B



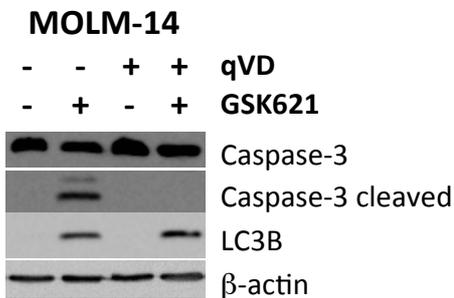
3C



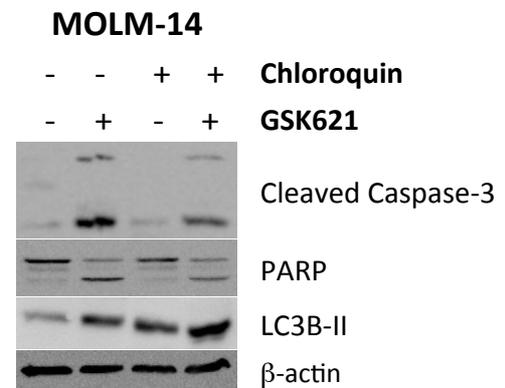
3D



3E



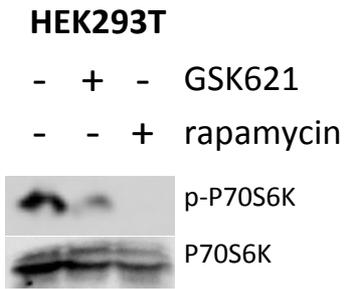
3F



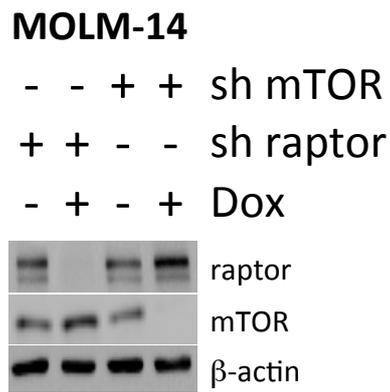
**Supplemental figure 4. Crosstalk between mTORC1 and AMPK activation in AML.**

**4A.** Western blotting in HEK-293T cells treated with vehicle, 10nM rapamycin or 30 $\mu$ M GSK621 during 3 h using anti-pP70S6K (T389) and p70S6K antibodies. **4B.** MOLM-14 cells were lentivirally transduced with Dox-inducible anti-mTOR or anti-raptor shRNA. Knockdowns were induced by Dox treatment for four days. Western blots were performed using anti-raptor and anti-mTOR antibodies. **4C.** Annexin V binding in AML cell lines treated with vehicle or 10nM rapamycin for 24 h prior to vehicle or 30 $\mu$ M GSK621 addition for 48 h (n=4). **4D.** Primary AML samples were treated with vehicle or 10nM rapamycin for 24 h and then vehicle or 30 $\mu$ M GSK621 was added. Apoptosis was measured 48h later by annexin V binding (n=7). **4E.** May-Grünwald Giemsa (MGG) coloration of cytopsin from a primary AML sample AML#6 treated with vehicle and 30 $\mu$ M GSK621 or with 10nM rapamycin and 30 $\mu$ M GSK621. **4F.** MOLM-14 cells ( $5.10^3$ ) were incubated for 24 h with vehicle or 10nM rapamycin, then treated 48 h with vehicle or 30 $\mu$ M GSK621 and finally cultured in methylcellulose for 7 days. **4G.** Ingenuity® analysis of pathways in a genome-wide gene expression analysis performed in *MLL-ENL*-transformed leukemic cells from an *Ampk*<sup>-/-</sup> or *Ampk*<sup>+/+</sup> murine background. The top ten most differentially expressed pathways are shown along with their corresponding *P*-values (expressed as  $-\log(P\text{-value})$ ) and the various genes involved in each pathway. **4H.** MOLM-14 cells were treated with 30 $\mu$ M GSK621, and protein extracts were collected following a time-course as indicated. Western blotting was performed using anti-phospho-eIF2 $\alpha$  (S51) and anti-eIF2 $\alpha$  antibodies. Short means short-time exposure and long means longer time exposure for western blots. **4I.** Western blotting in a primary AML sample (AML#3) and in the MOLM-14 cell line treated with vehicle or 30 $\mu$ M GSK621 for 24 h using anti-phospho-eIF2 $\alpha$  (S51), anti-eIF2 $\alpha$ , -ATF4 and -CHOP antibodies. **4J.** Primary AML samples were treated with vehicle or 30 $\mu$ M GSK621 for 24 h, and western blotting was performed using anti-phospho-eIF2 $\alpha$  (S51) and anti-eIF2 $\alpha$  antibodies. **4K.** Quantification by qPCR of *ATF4* and *CHOP* mRNA (normalized to *GAPDH* and *UBC*) in MOLM-14 cells treated with vehicle or 10nM rapamycin for 24 h and then vehicle or 30 $\mu$ M GSK621 for 24 h (n=3). b-actin was used as a loading control in Western blot experiments. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. \**P*<0.05, \*\*\**P*<0.001.

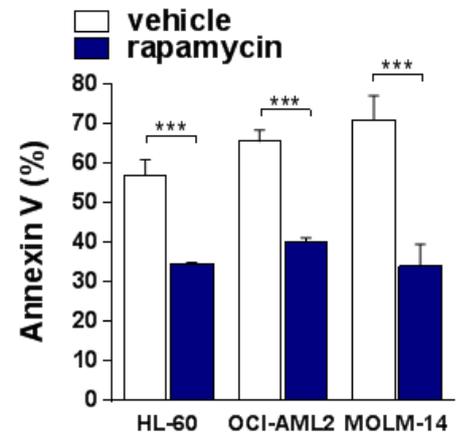
4A



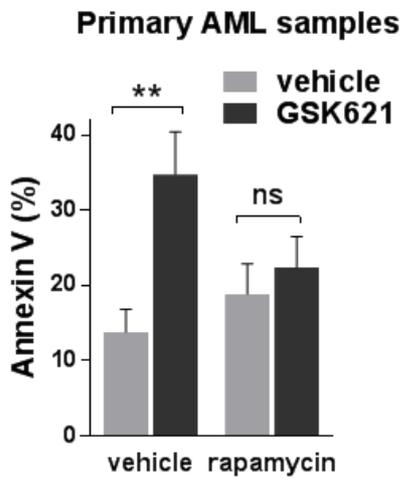
4B



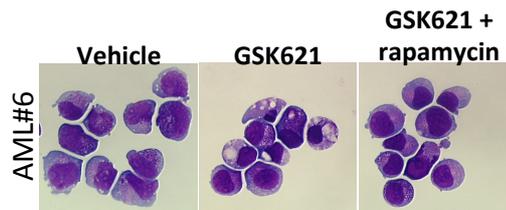
4C



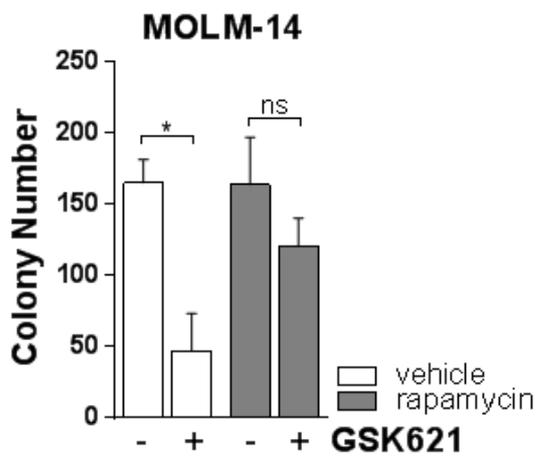
4D



4E



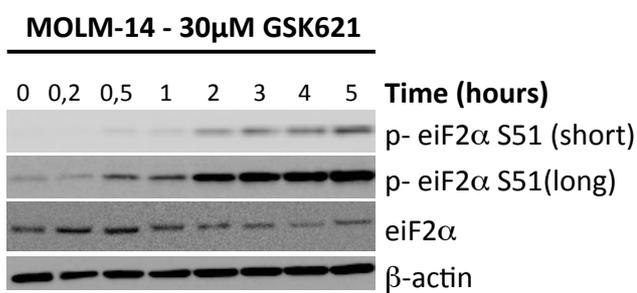
4F



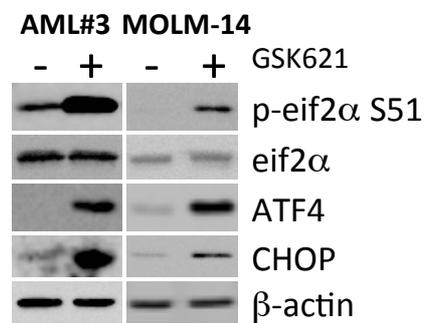
# 4G

Pathways	p-value	Molecules
cAMP-mediated signaling	4,16	CNGA2,CALM1 (includes others),LTB4R,GPER1,CXCR2,AKAP6,CHRM1,AGTR2
G-Protein Coupled Receptor Signaling	2,26	LTB4R,GPER1,CXCR2,AKT3,CHRM1,AGTR2
<b>EIF2 Signaling</b>	<b>2,24</b>	<b>RPL5,EIF1,AKT3,Ins1,RPL41</b>
Cell Cycle: G1/S Checkpoint Regulation	2,09	HDAC4,RPL5,Hdac9
eNOS Signaling	2,04	CNGA2,CALM1 (includes others),AKT3,AQP1
Epoxyqualene Biosynthesis	1,91	FDFT1
Gaq Signaling	1,86	CALM1 (includes others),GPLD1,AKT3,CHRM1
Chronic Myeloid Leukemia Signaling	1,68	HDAC4,AKT3,Hdac9
Noradrenaline and Adrenaline Degradation	1,68	MAOB,ADHFE1
Granulocyte Adhesion and Diapedesis	1,63	CD99,CXCR2,Ccl2,CCL17

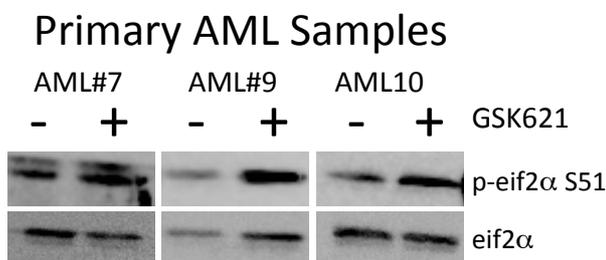
# 4H



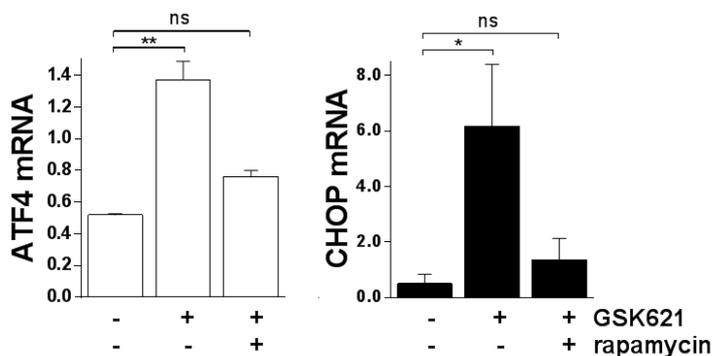
# 4I



# 4J



# 4K



Name	FAB	Cytogenetics	Molecular	References
MOLM 13	AML4 post MDS	MLL-AF9	FLT3-ITD <sup>1</sup>	Matsuo Y (leukemia 1997); Quentmeier (leukemia 2003)
MOLM 14	AML4 post MDS	MLL-AF9	FLT3-ITD <sup>1</sup>	Matsuo Y (leukemia 1997)
THP1	AML5 de novo	MLL-AF9	N-ras, p53 <sup>3</sup>	Odero MD (genes chromosomes and cancer 2000)
MV4-11	biphenotypic	complex	FLT3-ITD (homozygous) <sup>1</sup>	Lange (Blood 1987)
HEL	AML6, de novo	complex	JAK2 V617F <sup>2</sup>	Martin P (Science 1982); Quentmeier (leukemia 2006)
HL-60	AML2	MYC amplification	N-ras, CCND2 C238T <sup>4</sup> , p53 homozygous deletion <sup>3</sup>	Ikediobi ON (mol cancer ther 2006) Collins (Nature 1977)
U937	AML5	t(10;11)(p14;q23)	p53 <sup>3</sup>	Sunstrom C (int j cancer 1976)
KG1A	AML6	del(7)(q22q35)	p53 <sup>3</sup>	Furley (blood 1986); Koeffler (Blood 1980)
KASUMI	AML2	t(8;21)	c-kit N822K	Asou H (Blood 1991); Larizza I (Leuk lymph 2005)
OCI-AML2	AML4	N/A	DNMT3A	Tiacci A (leukemia 2012)
OCI-AML3	AML4	N/A	DNMT3A, NPM1	Wang (Leukemia 1989)
SKM1	AML5 post MDS	N/A	p53 <sup>3</sup>	Nakagawa (Br J Haematol 1991)
UT7	AML7	N/A	p53 <sup>3</sup>	Komatsu (Cancer Res 1991)
NB4	AML3	t(15;17)	p53 <sup>3</sup>	kojima k (blood 2005)
K562	blast crisis CML	N/A	p53 <sup>3</sup> , Bcr-Abl b3-a2	Lozzio (J Natl Cancer Inst 1973)
SET-2	AML7 post ET	9p24	JAK2 V617F <sup>2</sup>	Uozumi K (leukemia 2000)
TF1	AML6	N/A	p53 <sup>3</sup>	Kitamura (Blood 1989)
NOMO-1	AML5a	t(9;11)(q23;p22)	N/A	Drexler (Leukemia 2004)
M-o7E	AML7	complex	N/A	Avanzi (Br J Haematol 1988)
EOL-1	eosinophilic leukemia	complex	FIP1L1-PDGFR $\alpha$ (cryptic)	Saito (Blood 1985)

**Supplemental Table 1. Main characteristics of the 20 AML cell lines used in the current study.**

FAB: French American British Classification of AML; MDS: myelodysplastic syndrome; CML: chronic myelogenous leukemia; Complex karyotype: more than 4 distinct cytogenetic abnormalities; N/A: not available; <sup>1</sup>Quentmeier leukemia 2003; <sup>2</sup>Quentmeier leukemia 2006; <sup>3</sup>Sugimoto blood 1992 and Kojima blood 2005; <sup>4</sup>Ikediobi mol cancer ther 2006.

n°	Age	FAB	Cytogenetic	Molecular	GSK621	Rapa
AML# 1	69	AML 5	46, XX, t(11;22)	EVI1 <sup>over</sup>	X	X
AML# 2	65	AML 5	46, XY	FLT3-ITD, NPM1 <sup>mut</sup> , DNMT3A <sup>mut</sup>	X	
AML# 3	78	AML 5	46, XY	-	X	X
AML# 4	75	AML 1	46, XX	-	X	
AML# 5	40	AML 4	46, XX	FLT3-ITD, NPM1 <sup>mut</sup>	X	
AML# 6	81	AML 1	46, XX	FLT3-ITD, NPM1 <sup>mut</sup> , DNMT3A <sup>mut</sup>	X	
AML# 7	48	AML 4	46, XY, del(9)	-	X	
AML# 8	52	AML 5	45, XX, -13, der(19)t(13;19)	-	X	
AML# 9	68	AML 1	46, XX	FLT3-ITD, NPM1 <sup>mut</sup>	X	
AML# 10	77	AML 1	46, XY	IDH2 <sup>mut</sup> , ASXL1 <sup>mut</sup>	X	
AML# 11	61	AML 5	46, XY	SRSF2 <sup>mut</sup>	X	
AML# 12	76	AML 1	46, XX	N/A	X	X
AML# 13	74	sAML	46, XX, 5q-	-	X	X
AML# 14	76	AML 1	46 XX	IDH2 <sup>mut</sup>	X	X
AML# 15	67	AML 2	46 XX	FLT3-ITD	X	X
AML# 16	68	sAML	46 XX	FLT3-ITD, NPM1 <sup>mut</sup>	X	X

**Supplemental table 2. Clinical and molecular characteristics of AML patients.** Age: in years; FAB: French American British Classification of AML; sAML: secondary AML; EVI1<sup>over</sup>: overexpression of EVI1; FLT3-ITD: FLT3 Internal Tandem Duplication; NPM1<sup>mut</sup>: Nucleophosmin 1 mutation; DNMT3A<sup>mut</sup>: DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha mutation; IDH2<sup>mut</sup>: Isocitrate Dehydrogenase 2 mutation; ASXL1<sup>mut</sup>: additional sex combs like 1 mutation; SRSF2<sup>mut</sup>: Serine/arginine-rich Splicing Factor 2 mutation; -: no molecular abnormality detected; N/A: information not available; rapa: rapamycin; X: sample involved in experiments done using GSK621 or rapamycin as indicated.

<b>Antibody</b>	<b>Manufacturer</b>	<b>Reference</b>
Anti phospho p70S6K (T389)	Cell signaling	9205
Anti p-4EBP1 (S65)	Cell signaling	9451
Anti phospho-eIF2A (S51)	Cell signaling	9721
Anti phospho ULK (S555)	Cell signaling	5869
Anti phospho-ACC (S79)	Cell signaling	3661
Anti phospho AMPK (T172)	Cell signaling	4188
Anti thiophosphate	Epitomics	2688
Anti p70S6K	Cell signaling	2708
Anti eIF2A	Cell signaling	9722
Anti CHOP	Cell signaling	2895
Anti ATF4	Cell signaling	11815
Anti LC3B	Cell signaling	2775
Anti $\beta$ -actin	Sigma	A-74
Anti raptor	Cell signaling	2280
Anti-mTOR	Cell signaling	2972
Anti ULK	Cell signaling	4473
Anti caspase 3	Cell signaling	9665
Anti PARP	Cell signaling	9532
Anti TSC2	Santa Cruz	sc-893
Anti ACC	Cell signaling	3676
Anti AMPK $\alpha$ 1	Cell signaling	2795
Anti AMPK $\alpha$ 2	Cell signaling	2757
ATG7	cell signaling	2631
ATG5	Cell signaling	2630

**Supplemental Table 3. References of the antibodies used in the current study.**

La première partie des résultats montre donc plusieurs résultats :

- **Le composé GSK621 est un activateur puissant et spécifique d'AMPK.**

Le composé GSK621 est un activateur d'AMPK plus puissant que l'A769662 sur des tests cellulaires. Il entraîne la phosphorylation des principales cibles d'AMPK dans les cellules leucémiques. Pour étudier sa spécificité, nous avons utilisé plusieurs modèles cellulaires : fibroblastes embryonnaires murins provenant d'animaux ayant une invalidation génétique des deux sous unités catalytiques ( $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ ) d'AMPK, lignée cellulaire MOLM-14 dans laquelle l'expression d'AMPK  $\alpha 1$  est inhibée par ARN interférence ou par le système CRISPR/Cas9. Dans ces différents modèles, les effets cytotoxiques du GSK621 sont dépendants de l'expression d'AMPK.

- **Le composé GSK621 exerce des effets anti-leucémiques.**

Nous avons utilisé plusieurs modèles in vitro (20 lignées cellulaires de LAM, 16 échantillons primaires de patients atteints de LAM, cellules hématopoïétiques murines transformées par les oncogènes MLL-ENL ou FLT3-ITD) et in vivo (xénogreffe de lignée leucémique humaine à la souris NUDE). Ces différents modèles ont démontré la cytotoxicité du composé GSK621 sur les cellules leucémiques. De plus, l'activation d'AMPK par le GSK621 compromet également la capacité d'autorenouvellement des progéniteurs leucémiques in vitro, suggérant un intérêt de ce composé dans le ciblage des cellules initiatrices de LAM. Ces effets contrastent avec l'apparente innocuité du GSK621 sur les progéniteurs hématopoïétiques normaux exprimant l'antigène CD34 (CD34+).

- **L'induction d'autophagie a un rôle dans les effets antileucémiques du composé GSK621.**

Grâce à plusieurs techniques complémentaires, nous avons observé une induction massive d'autophagie dans les cellules de LAM traitées par GSK621. L'inhibition de l'autophagie (par ARN interférence anti-ATG5 ou anti-ATG7 ou par la chloroquine) protégeait les cellules leucémiques des effets cytotoxiques du composé GSK621, suggérant un rôle inhabituel de l'autophagie comme promouvant la mort cellulaire après activation de l'AMPK dans les LAM.

- **L'activation des voies mTORC1 et AMPK réalisent une situation de létalité synthétique.**

Nous avons observé de façon inattendue que l'activation d'AMPK ne conduisait pas à l'inhibition de mTORC1 dans les LAM. Dans notre modèle, le complexe mTORC1 ne contrôle donc pas l'autophagie et n'est pas impliqué dans la mort cellulaire après activation de l'AMPK. Au contraire, nous avons observé que l'inhibition de mTORC1 par ARN interférence (dirigée contre les constituants essentiels du complexe mTORC1 que sont Raptor ou mTOR) ou par la rapamycine protégeait les cellules leucémiques contre l'induction d'autophagie et la mort cellulaire après exposition au composé GSK621. De même, l'hyperactivation de mTORC1 dans les lignées leucémiques (par invalidation de TSC2 par CRISPR/Cas9) ou dans les cellules CD34+ normales (par expression d'une forme constitutivement active d'AKT appelée myr-Akt) sensibilisait ces cellules aux effets du composé GSK621. L'étude moléculaire de ce phénomène nous a conduit à identifier que le niveau d'expression de la protéine ATF4, qui est régulé au niveau transcriptionnel par mTORC1 et au niveau traductionnel par AMPK (de manière indirecte via la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2A), et détermine le destin des cellules après exposition au GSK621.

## ***Deuxième partie : activation directe de PERK par AMPK***

Dans l'article reproduit ci-dessus, nous avons donc mis en évidence que la voie de réponse intégrée au stress était activée en aval d'AMPK, et qu'elle permettait d'intégrer le niveau d'activation des voies mTORC1 et AMPK, expliquant ainsi le phénomène de létalité synthétique.

Afin de confirmer l'implication de la voie eIF2A en aval de l'activation d'AMPK, nous avons dans un premier temps réalisé une étude cinétique de phosphorylation d'eIF2A montrant une augmentation précoce de la forme phosphorylée d'eIF2A (S52) dès 30 minutes d'exposition au GSK621 (Figure 19A). Nous avons également constaté que cet événement de phosphorylation était nettement réduit dans les MEF AMPK KO par rapport aux MEF AMPK WT après exposition au composé GSK621 (Figure 19B). Ces résultats suggèrent qu'AMPK contrôle le niveau de phosphorylation d'eIF2A.

La phosphorylation d'eIF2A pouvant être la conséquence d'un stress du réticulum endoplasmique activant les trois voies du système UPR, nous avons étudié si le GSK621 activait les deux autres voies canoniques IRE1 et ATF6. Contrairement au traitement par thapsigargine, un agent classiquement utilisé pour induire un stress du réticulum endoplasmique, le traitement de la lignée MOLM-14 par GSK621 n'entraînait ni le splicing de XBP1 (témoin de l'activation de l'endonucléase IRE1) (Figure 19C) ni la translocation nucléaire d'ATF6 (Figure 19D). Nous en avons conclu que la phosphorylation d'eIF2A en réponse au traitement par GSK621 n'était pas la conséquence de l'activation globale des voies du système UPR en réponse à un stress du réticulum endoplasmique.

Afin d'approfondir les mécanismes mis en jeu entre AMPK et eIF2A, nous nous sommes interrogés sur de possibles connections entre AMPK d'une part et les différentes kinases de eIF2A d'autre part. Nous avons réalisé une analyse bioinformatique ([www.hprd.org](http://www.hprd.org), phosphomotif finder) qui nous a permis de retrouver des sites consensus de phosphorylation par AMPK dans chacune des kinases d'eIF2A. Dans le cas de PKR et HRI, il s'agissait d'un site unique et non conservé parmi les espèces. Concernant PERK et GCN2, respectivement 2 et 10 sites consensus étaient identifiés, avec conservation d'au moins l'un des sites dans toutes les espèces pour lesquelles la séquence peptidique était connue (données non présentées).

Grâce à une collaboration avec les équipes des Dr. David Ron (University of Cambridge) et Alain Bruhat (INRA, UMR 1019), nous avons pu avoir accès à des MEF KO pour PERK ou

pour GCN2. Nous avons alors constaté que la phosphorylation d'eIF2A en réponse au GSK621 était nettement diminuée dans les MEF PERK KO et plus modérément réduite dans les MEF GCN2 KO (Figure 19E). De manière intéressante, nous avons observé une résistance aux effets cytotoxiques du GSK621 des MEF PERK KO ou GCN2 KO, bien que le phénotype soit plus tranché dans le cas des MEF PERK KO (Figure 19F). Nous avons ainsi formulé l'hypothèse que PERK ou GCN2 pourraient représenter des cibles directes d'AMPK. Nous nous sommes par la suite focalisés sur l'étude de la kinase PERK qui constituait le candidat le plus prometteur à l'issue de ces expériences préliminaires.

Pour tester l'hypothèse d'un contrôle direct de PERK par AMPK, nous avons réalisé un test kinase. PERK subissant une autophosphorylation activatrice, nous avons utilisé comme point de départ de toutes nos constructions une forme de PERK dans laquelle l'activité kinase est abolie par une mutation ponctuelle du domaine kinase (K618A, appelée PERK-KD pour « kinase dead ») (Harding et al., 1999). Comme montré dans la figure 19G, PERK est effectivement phosphorylée en présence d'AMPK, et cette phosphorylation est largement augmentée par le GSK621. Nous avons ensuite muté les sites consensus de phosphorylation par AMPK de PERK-KD (mutants non phosphorylables S438A, T679A et double mutant S438A + T679A), mais de façon surprenante, aucun de ces mutants n'empêchait la phosphorylation de PERK en présence d'AMPK (données non présentées).

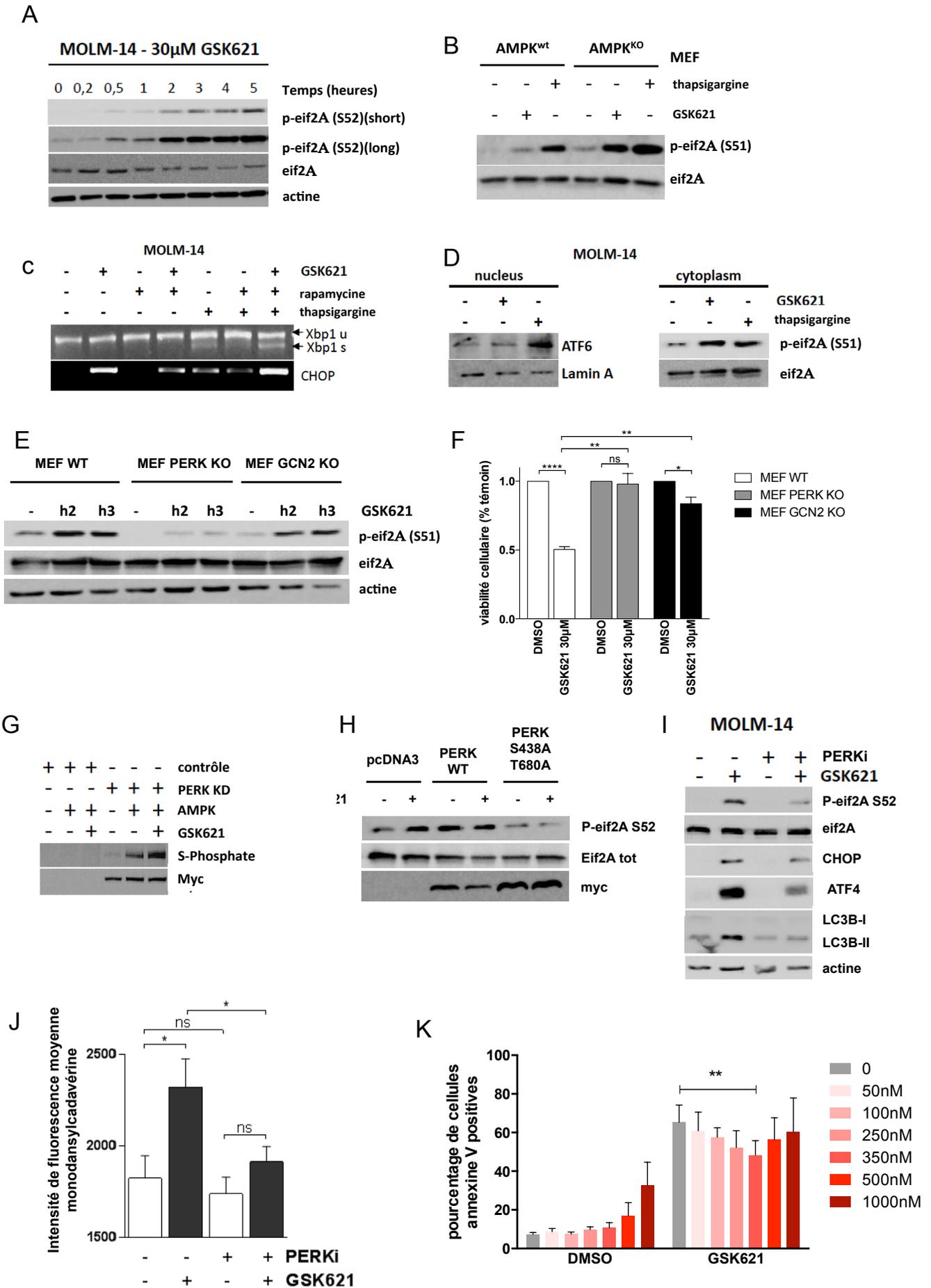
Pour comprendre ce résultat, nous avons identifié par spectrométrie de masse les peptides phosphorylés de la protéine PERK-KD après le test kinase. Cette approche a mis en évidence deux résidus phosphorylés (S715 et S854). Cependant, ces résidus étant situés dans des contextes peptidiques ne correspondant pas à la séquence consensus d'AMPK (voir p66 de ce manuscrit), nous faisons l'hypothèse que ces phosphorylations sont le reflet de la phosphorylation de PERK par des kinases autres qu'AMPK (immunoprécipitées avec PERK-KD). Cette hypothèse permet de comprendre pourquoi les mutants de PERK restent phosphorylés dans le test kinase, mais interdit de conclure sur la phosphorylation directe de PERK par AMPK sur les sites consensus.

En parallèle, nous avons transfecté des cellules HEK-293T avec des mutants des sites consensus d'AMPK (S438A, T679A et double mutant S438A + T679A) sur la protéine PERK WT. Nous avons constaté une inhibition de la phosphorylation d'eIF2A en réponse au GSK621 dans les cellules transfectées avec le double mutant S438A+T679A (Figure 19F), ce qui apporte des arguments forts en faveur de l'hypothèse d'une phosphorylation de PERK par

AMPK dans un modèle cellulaire. Ces résultats nécessitent néanmoins d'être confirmés dans un modèle ne mettant pas en jeu la forme endogène de PERK en raison de l'existence d'effets dominants des formes ectopiques de PERK sur la forme endogène dans les cellules HEK-293T (Yamaguchi et al., 2008). En raison de l'échec de transfection des MEF PERK KO avec ces plasmides, nous envisageons d'inhiber l'expression de la forme endogène de PERK à l'aide de la technologie CRISPR/Cas9 avant de répéter ces expériences.

Pour confirmer la fonction de cette nouvelle voie de signalisation AMPK/PERK dans les LAM, nous avons utilisé un inhibiteur de PERK récemment décrit (le composé GSK2656157, appelé PERKi pour PERK inhibitor dans ce manuscrit) (Atkins et al., 2013). Nous avons observé que l'inhibition de PERK diminue l'induction de la voie ISR en réponse à l'activation d'AMPK dans la lignée leucémique MOLM-14 comme attesté par une diminution de la phosphorylation d'eIF2A et de l'expression de ses cibles ATF4 et CHOP (Figure 19I). De plus, l'inhibition de PERK empêche l'activation de l'autophagie comme attesté par une absence d'augmentation de LC3B-II par immunoempreinte (Figure 19I) ou du marquage monodansylcadaverine (MDC) par cytométrie en flux (Figure 19J) après exposition au GSK621. De plus, l'inhibition de PERK protège partiellement la lignée MOLM-14 des effets cytotoxiques du GSK621 (Figure 19K)

Il semble donc probable que PERK soit une cible directe d'AMPK (sur les résidus S438 et T679), qui explique au moins en partie la phosphorylation d'eIF2A (S52) en réponse au GSK621. Cette nouvelle voie de signalisation contribue aux effets antileucémiques résultant de l'activation d'AMPK par contrôle de l'autophagie induite en réponse à l'exposition au composé GSK621. Ces résultats préliminaires doivent être confirmés dans d'autres contextes cellulaires et l'importance de cette voie de signalisation dans l'action anti-leucémique du GSK621 doit être mesurée en comparaison au poids d'autres cibles d'AMPK ayant un potentiel suppresseur de tumeur.



**Figure 19. PERK est une cible d'AMPK impliquée dans les effets cytotoxiques du GSK621.**

A. Cinétique de phosphorylation d'eIF2A (S52) en réponse au GSK621 (30 $\mu$ M) dans la lignée MOLM-14.

B. Etude de la phosphorylation d'eIF2A (S51) en réponse au GSK621 (30 $\mu$ M, 2h) ou à la thapsigargine (2mM, 2h) dans des MEF invalidées pour les deux sous-unités catalytiques  $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2 d'AMPK (AMPK KO) ou des MEF sauvages (AMPK WT).

C. Les cellules MOLM-14 ont été incubées ou non pendant 24h en présence de rapamycine (10nM), puis exposées au GSK621 (30 $\mu$ M, 6h) et/ou à la thapsigargine (1 $\mu$ M, 6h) comme indiqué. L'ARN messager de Xbp1 et CHOP ont été amplifiés après RT-PCR et détectés sur un gel d'agarose 2,5%. Xbp1 u : Xbp 1 non épissé (unspliced) ; Xbp1 s : Xbp1 épissé (spliced)

D. Les cellules MOLM-14 ont été exposées au GSK621 (30 $\mu$ M, 6h) et/ou à la thapsigargine (1 $\mu$ M, 6h). Après fractionnement nucléo-cytoplasmique, des western blots ont été réalisés avec des anticorps anti ATF6 et anti Lamin A (extraits nucléaires), anti phospho-eIF2A (S51) et eIF2A total (extraits cytoplasmiques).

E. Etude de la phosphorylation d'eIF2A (S51) en réponse au GSK621 (30 $\mu$ M, 0, 2h ou 3h) de MEF sauvages (MEF WT), invalidées pour PERK (PERK KO) ou pour GCN2 (GCN2 KO).

F. Viabilité (mesurée avec le réactif Uptiblu) des MEF WT, PERK KO ou GCN2 KO après exposition au GSK621 (30 $\mu$ M) pendant 48h, rapportée à la viabilité des cellules traitées par DMSO.

G. Test kinase. Après transfection de cellules HEK-293T par PERK KD (tag myc) ou par un vecteur vide (pCDNA3, control), une immunoprécipitation (IP) anti-myc est réalisée. Le produit de cette IP est soumis à un test kinase (30°C, 20 min) en présence d'AMPK recombinant et/ou de GSK621 (10 $\mu$ M), alkylé (PNBM 2mM) révélé par immunoempreinte avec un anticorps anti-thiophosphate et anti-myc.

H. Phosphorylation d'eIF2A en réponse au GSK621 (30 $\mu$ M, 2h) dans des HEK-293T transfectées par PERK WT, PERK muté sur les deux sites AMPK (PERK S438A T680A), ou par le vecteur vide (pCDNA3)

I. Effet de l'inhibition de PERK (GSK 2656157 350nM, PERKi) sur l'activation de la voie ISR (P-eIF2A, ATF4, CHOP) et de l'autophagie (LC3B) par le GSK621 (30 $\mu$ M, 24h) dans la lignée MOLM-14.

J. Effet de l'inhibition de PERK sur l'induction d'autophagie par le GSK621 dans la lignée MOLM-14. La quantité d'autophagosomes est mesurée par l'intensité de fluorescence de cellules exposées à la monodansylcadavérine (5 $\mu$ M, 30 min) en cytométrie en flux.

K. Effets de l'inhibiteur de PERK (GSK 2656157, PERKi) à doses croissantes (0-1000nM) sur l'induction d'apoptose par le composé GSK621 (30 $\mu$ M, 48h)

ns : non significatif, \* : p<0,05 ; \*\* p<0,01 ; \*\*\*\* p<0,0001

## DISCUSSION

### *Effets antileucémiques de l'activation d'AMPK*

Le rôle suppresseur de tumeur ou pro-oncogénique d'AMPK est l'objet de controverses, puisque certains travaux montrent clairement que l'activation d'AMPK permet aux cellules cancéreuses de survivre aux stress métaboliques (Jeon et al., 2012; Shackelford et al., 2013), alors que d'autres ont démontré que l'inactivation d'AMPK confère un avantage sélectif aux tumeurs (Faubert et al., 2013). Dans les LAM, mon laboratoire d'accueil a démontré le potentiel antileucémique de la metformine (Green et al., 2010), mais il est probable qu'une grande partie des effets de la metformine soit en fait indépendante de l'AMPK (Scotland et al., 2013; Shackelford et al., 2013). Les travaux présentés ici reposent sur l'utilisation d'un activateur direct d'AMPK, dont les effets sont dépendent strictement de l'expression d'AMPK, comme nous l'avons démontré en invalidant la sous-unité catalytique d'AMPK par ARN interférence ou via le système CRISPR/cas9. Ces effets antileucémiques spécifiques ont été confirmés dans plusieurs modèles au cours du présent travail incluant cellules primaires humaines, lignées leucémiques humaines, cellules hématopoïétiques murines transformées, traitement in vivo de souris après xénogreffe d'une lignée leucémique humaine.

Afin de tester le potentiel du GSK621 à éradiquer les cellules souches leucémiques (CSL), dont la résistance aux traitements explique les rechutes après chimiothérapie, nous avons réalisé des tests de clonogénicité itératifs avec des progéniteurs murins transformés par l'oncogène MLL-ENL, suivant un modèle bien établi établissant une corrélation entre potentiel clonogénique in vitro et quantité de CSL in vivo chez la souris (Yeung et al., 2010). Ce test suggère que le GSK621 pourrait permettre l'éradication des CSL, ce qui doit désormais être confirmé par des greffes successives d'échantillons primaires de LAM à des souris immunodéprimées suivant la méthodologie développée par l'équipe de J Dick (Bonnet and Dick, 1997). Ce travail sera mené en collaboration avec l'équipe du Dr Ivan Moura (Institut Imagine, Hôpital Necker, Paris).

Le mécanisme de la mort cellulaire des cellules leucémiques que nous avons mis en évidence après exposition au GSK621 est original, puisqu'il nécessite à la fois l'exécution du programme d'autophagie et l'activation des caspases. En effet, l'inhibition de l'autophagie (par shARN anti ATG5 ou anti ATG7 ou par la chloroquine) ou l'inhibition des caspases (par

le qVD) protègent partiellement et de manière indépendante les cellules leucémiques de la mort induite par le GSK621. Les effets cytotoxiques du GSK621 ne répondent donc pas à la définition stricte de la mort cellulaire par autophagie (autophagic cell death) proposée par certains auteurs, qui réservent ce terme aux situations où la mort cellulaire est indépendante de l'activation des caspases (Kroemer and Levine, 2008; Shen and Codogno, 2011). Ce phénomène de mort cellulaire par autophagie est probablement rare, mais il a été bien décrit dans le développement de l'intestin de drosophile (Denton et al., 2009), ou dans la mort induite par un inhibiteur de la synthèse du NAD (nicotinamide adénine dinucléotide) dans différents types d'hémopathies (Nahimana et al., 2009). La coopération des caspases et de l'autophagie conduisant à la mort cellulaire a également été bien décrite dans plusieurs modèles, tels que le développement des glandes salivaires de drosophile (Berry and Baehrecke, 2007). Dans les LAM, il a aussi été observé que le traitement par un agent photosensibilisant (la platonin) induisait une mort cellulaire dépendante de l'autophagie et des caspases (Chen et al., 2009).

Enfin, il n'est pas exclu que d'autres voies moléculaires puissent contribuer à la mort cellulaire après activation de l'AMPK par le composé GSK621, ou à l'inverse être impliquées dans des mécanismes de résistance à ce composé. Afin de les identifier de manière non biaisée, nous avons produit la librairie lentivirale récemment décrite par Shalem et ses collègues de l'équipe de Feng Zhang (Broad Institute) permettant de cribler le génome par le système CRISPR/Cas9 (Shalem et al., 2014). Après avoir réussi les étapes d'infection lentivirale de la lignée MOLM-14 et d'extraction de l'ADN génomique, nous sommes actuellement en cours de mise au point du séquençage des guides ARN incorporés au génome après exposition au composé GSK621 ou à un placebo, en collaboration avec les plateformes de séquençage des Institut Cochin et Imagine (Paris 5) et avec l'équipe de bioinformatique de l'institut Imagine.

### ***Activation de la voie de réponse intégrée au stress (ISR) par AMPK***

En explorant les mécanismes impliqués dans les effets antileucémiques produits par l'activation d'AMPK, nous avons mis en évidence une activation de la voie de réponse intégrée au stress (ISR pour integrated stress response) par le composé GSK621. L'examen de la littérature concernant les liens entre AMPK et voie ISR retrouve des données contradictoires, puisque certains auteurs ont montré une activation de la voie ISR par les biguanides (Quentin et al., 2012; Yang et al., 2013) dépendante de l'AMPK, alors que d'autres suggéraient que l'activation d'AMPK par l'AICAR (Terai et al., 2005) ou la

metformine (Thériault et al., 2011) diminuait l'activation de la voie ISR. Cependant, ces résultats contradictoires peuvent probablement être expliqués par le manque de spécificité des outils utilisés pour activer AMPK, qui empêchaient donc de conclure définitivement.

Les résultats que nous avons obtenus avec un activateur direct d'AMPK démontrent plus clairement l'activation de la voie ISR en aval d'AMPK. En effet, nous avons observé dans plusieurs modèles cellulaires que l'activation d'AMPK par le composé GSK621 entraîne une activation de la voie ISR attestée par la phosphorylation d'eIF2A (S52), une inhibition globale de la traduction et une induction de l'expression d'ATF4 et CHOP. De plus, nous avons pu démontrer le caractère spécifique de l'activation de la voie IRS par l'AMPK dans 2 modèles distincts. En effet l'exposition au composé GSK621 n'active pas la voie ISR dans les MEF AMPK KO ou encore dans les cellules leucémiques murines induites par l'expression de l'oncogène MLL-ENL dans des cellules hématopoïétiques issues de souris AMPK KO. Enfin, l'activation de cette voie n'est pas liée à un stress du réticulum endoplasmique, puisque les deux autres voies canoniques du système UPR (unfold protein response) ne sont pas activées après exposition au GSK621, alors qu'elles le sont bien par la thapsigargine. De plus, nous n'avons pas constaté en microscopie électronique d'aspect de dilatation du réticulum endoplasmique parfois décrit dans les cellules soumises à un stress du réticulum endoplasmique (Zode et al., 2011).

Nos travaux préliminaires suggèrent qu'AMPK phosphoryle directement PERK, et que la phosphorylation d'au moins l'un des deux résidus S438 ou T679 est nécessaire à l'activation de la voie ISR en aval d'AMPK. Cependant, il semble nécessaire de démontrer plus rigoureusement ce lien moléculaire en complétant des cellules PERK KO par les différents mutants des sites AMPK, pour s'affranchir de l'expression endogène de PERK. Nos tentatives de transfection des MEF PERK KO s'étant révélées infructueuses, nous envisageons deux stratégies différentes dans les cellules HEK-293T : inactivation de la forme endogène de PERK par le système CRISPR/Cas9 et transfection des mutants, ou mutagenèse par recombinaison homologue en utilisant le système CRISPR/Cas9 avec une forme inactivée de Cas9 (Ran et al., 2013). Il semble aussi nécessaire de mieux apprécier l'importance de PERK dans les effets cytotoxiques du GSK621 dans les LAM. L'inhibiteur chimique de PERK ayant une toxicité propre, nous envisageons de tester si l'inactivation de PERK par shRNA ou CRISPR/cas9 dans les lignées de LAM atténue les effets antileucémiques induits par l'activation d'AMPK.

Enfin, il n'est pas exclu que les autres kinases d'eIF2A soient impliquées dans l'activation de la voie ISR en aval d'AMPK. En particulier, GCN2 comporte de nombreux sites consensus d'AMPK conservés, et nous avons observé que les MEF GCN2 KO sont partiellement résistantes aux effets du GSK621.

### ***mTORC1 et LAM : nouvelles perspectives thérapeutiques***

Les résultats obtenus durant ce travail concernant les liens entre AMPK et mTORC1 dans les LAM nous ont conduits à remettre en question le concept d'addiction oncogénique à mTORC1 qui avait guidé nos recherches depuis quelques années.

Rappelons que la rapamycine, qui est probablement l'inhibiteur le plus spécifique de mTORC1, a uniquement un effet antiprolifératif et n'induit pas d'apoptose dans les LAM (Récher et al., 2005; Tamburini et al., 2009). De ce fait, l'utilisation de la rapamycine en monothérapie dans les LAM s'est avéré décevant (Récher et al., 2005), même si l'association à la chimiothérapie pourrait présenter un intérêt (Park et al., 2013).

Dans un premier temps, l'absence d'efficacité de la rapamycine ne nous a pas conduit à remettre en question l'hypothèse d'une addiction oncogénique des cellules de LAM à mTORC1, puisque cet agent n'inhibe que partiellement mTORC1 (Tamburini et al., 2009), et qu'il déclenche des mécanismes de résistance par activation de la voie PI3K (Chapuis et al., 2010; Park et al., 2008). Ainsi, mon laboratoire d'accueil a étudié de nombreux agents conduisant à une inhibition de mTORC1, en concluant à un lien causal entre inhibition de mTORC1 et efficacité anti-leucémique. Cependant, la plupart de ces agents ont également des effets sur d'autres cibles, qui peuvent expliquer tout ou partie de leurs effets. Ainsi :

- l'AZD8055 inhibe non seulement mTORC1 mais également mTORC2 (Willems et al., 2012),
- la metformine conduit à une inhibition de mTORC1, mais ses effets antileucémiques sont probablement la conséquence du stress énergétique causé par l'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale (Green et al., 2010; Scotland et al., 2013),
- la L-asparaginase inhibe mTORC1 via la déplétion intracellulaire en leucine (Willems et al., 2013), mais ses effets sont probablement plutôt liés à la déplétion en glutamine qu'à l'inhibition de mTORC1 (Nathalie Jacque, données non publiées).

Les résultats expérimentaux obtenus durant mon travail de thèse nous conduisent à proposer un modèle alternatif. En effet, les résultats obtenus suite à l'invalidation de mTORC1 par ARN interférence anti-RAPTOR (article soumis figure 4E et Laury poulain, données non publiées) confirment que l'inhibition (même complète) de mTORC1 n'induit pas l'apoptose des blastes de LAM, remettant en cause le concept d'addiction oncogénique à mTORC1 dans les LAM. A l'inverse, nos travaux montrent que l'activation de mTORC1 est une condition essentielle aux effets cytotoxiques de l'activation d'AMPK par le composé GSK621. Ce phénomène de létalité synthétique explique que les cellules leucémiques ayant une activation constitutive de mTORC1 soient sensibles au GSK621, alors que les progéniteurs hématopoïétiques normaux ne le soient pas, leur niveau d'activation de mTORC1 étant plus faible.

Cette relation de létalité synthétique entre AMPK et mTORC1 amène de nouvelles questions.

Premièrement, nous n'avons pas observé dans les cellules leucémiques (lignées et cellules primaires, article soumis figure 4B) d'inhibition de mTORC1 en aval d'AMPK, comme cela avait bien été décrit dans d'autres modèles cellulaires en particulier dans des cellules HEK-293T ou des MEF (Gwinn et al., 2008; Inoki et al., 2003b; Zhang et al.). Nous avons déjà observé des particularités dans la régulation de la voie mTORC1 dans les LAM, par exemple son indépendance vis à vis de la voie PI3K/Akt (Tamburini et al., 2008). De même, Dos Santos et collègues ont proposé de manière originale une régulation de mTORC1 en aval de la src kinase Lyn bien que dans ce système le mécanisme moléculaire reste inconnu (Dos Santos et al., 2008). Ces résultats suggèrent que les mécanismes moléculaires expliquant l'activation de mTORC1 dans les LAM sont probablement spécifiques. On peut espérer que les récentes avancées dans la compréhension des mécanismes d'activation de mTORC1 (regulator, RAG, v-ATPase, GATOR) puissent apporter ici des éléments de réponse.

Deuxièmement, l'induction d'autophagie en aval d'AMPK n'est pas médiée par l'inhibition de mTORC1, mais par la voie ISR. En effet, l'inhibition de la voie ISR par un inhibiteur de PERK diminue l'induction d'autophagie après exposition au GSK621. De plus, l'inhibition de mTORC1 (par la rapamycine ou par ARN interférence) non seulement n'induit pas d'autophagie dans les LAM, mais empêche l'induction d'autophagie par le GSK621 en empêchant l'activation complète de la voie ISR via le contrôle transcriptionnel d'ATF4. Ce résultat est inattendu vu les nombreux exemples de contrôle négatif de l'autophagie par mTORC1. Cependant, un autre modèle expérimental a été décrit dans lequel l'inhibition de

mTORC1 empêche l'induction d'autophagie après exposition à la thioguanine (Zeng and Kinsella, 2008).

Troisièmement, l'activation constitutive de mTORC1 dans les LAM pourrait créer une fenêtre thérapeutique pour d'autres types d'agents. En effet, il a été montré dans d'autres types cellulaires que l'activation de mTORC1 sensibilise les cellules à la privation en glucose (Choo et al., 2010), au stress oxydatif (Thedieck et al., 2013), aux agents induisant un stress du reticulum endoplasmique (Ozcan et al., 2008), à l'inhibition du protéasome par le bortezomib (Babcock et al., 2013) ou à la privation en acides gras insaturés (Young et al., 2013). Dans les LAM, nous pourrions envisager un crible chimique (Pabst et al., 2014) de lignées ayant ou non une invalidation de mTORC1 (par la rapamycine ou par shRNA anti-RAPTOR), afin de déterminer quels types d'agents peuvent être utilisés en tirant bénéfice de la fenêtre thérapeutique entre hématopoïèse normale et leucémique liée à l'activation de mTORC1 dans les blastes de LAM.

### ***Développement clinique***

Malgré une action anti-leucémique certaine et un profil de tolérance encourageant lié au phénomène de létalité synthétique, le composé GSK621 ne pourra pas poursuivre un développement clinique. En effet, ce composé est très peu soluble, et les quantités de solvant (DMSO) que nous avons utilisées pour atteindre la dose de 30mg/kg chez les souris NUDE sont proches des doses maximales tolérables. De ce fait, même si la preuve de l'existence d'une fenêtre thérapeutique a été apportée dans cette expérience, il sera impossible de conduire des études de toxicologie poussées chez l'animal, prérequis indispensable avant d'envisager une utilisation chez l'humain.

Toutefois, ce travail apporte la démonstration que l'activation spécifique d'AMPK représente une perspective thérapeutique dans les LAM. Plusieurs stratégies peuvent être envisagées, comme par exemple l'utilisation concomitante d'activateurs allostériques d'AMPK (metformine, AICAR) et d'activateurs directs (A769662, salicylate), puisqu'il a été démontré un effet synergique des activateurs d'AMPK agissant selon des mécanismes différents (Ducommun et al., 2014). Cette approche permettrait d'activer pleinement l'AMPK avec des doses relativement modérées de chaque activateur, limitant ainsi la toxicité potentielle. D'autres activateurs spécifiques d'AMPK étant actuellement développés dans le traitement du diabète - certaines de ces molécules ayant même complété les tests de toxicologie préalables à

des essais cliniques de phase I – notre objectif prioritaire est à présent de mettre en place rapidement des études précliniques puis cliniques avec l'une de ces molécules dans les LAM.

## BIBLIOGRAPHIE

- Allegra, C.J., Drake, J.C., Jolivet, J., and Chabner, B.A. (1985). Inhibition of phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide transformylase by methotrexate and dihydrofolic acid polyglutamates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 4881–4885.
- Anastasiou, D., Poulogiannis, G., Asara, J.M., Boxer, M.B., Jiang, J., Shen, M., Bellinger, G., Sasaki, A.T., Locasale, J.W., Auld, D.S., et al. (2011). Inhibition of pyruvate kinase M2 by reactive oxygen species contributes to cellular antioxidant responses. *Science* 334, 1278–1283.
- Anthony, T.G., McDaniel, B.J., Byerley, R.L., McGrath, B.C., Cavener, D.R., McNurlan, M.A., and Wek, R.C. (2004). Preservation of Liver Protein Synthesis during Dietary Leucine Deprivation Occurs at the Expense of Skeletal Muscle Mass in Mice Deleted for eIF2 Kinase GCN2. *J. Biol. Chem.* 279, 36553–36561.
- Atkins, C., Liu, Q., Minthorn, E., Zhang, S.-Y., Figueroa, D.J., Moss, K., Stanley, T.B., Sanders, B., Goetz, A., Gaul, N., et al. (2013). Characterization of a novel PERK kinase inhibitor with antitumor and antiangiogenic activity. *Cancer Res.* 73, 1993–2002.
- Baas, A.F., Kuipers, J., van der Wel, N.N., Batlle, E., Koerten, H.K., Peters, P.J., and Clevers, H.C. (2004). Complete polarization of single intestinal epithelial cells upon activation of LKB1 by STRAD. *Cell* 116, 457–466.
- Babcock, J.T., Nguyen, H.B., He, Y., Hendricks, J.W., Wek, R.C., and Quilliam, L.A. (2013). Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 (mTORC1) Enhances Bortezomib-induced Death in Tuberous Sclerosis Complex (TSC)-null Cells by a c-MYC-dependent Induction of the Unfolded Protein Response. *J. Biol. Chem.* 288, 15687–15698.
- Baird, T.D., and Wek, R.C. (2012). Eukaryotic Initiation Factor 2 Phosphorylation and Translational Control in Metabolism. *Adv. Nutr. Int. Rev. J.* 3, 307–321.
- Banko, M.R., Allen, J.J., Schaffer, B.E., Wilker, E.W., Tsou, P., White, J.L., Villen, J., Wang, B., Kim, S.R., Sakamoto, K., et al. (2011). Chemical genetic screen for AMPK $\gamma$ 2 substrates uncovers a network of proteins involved in mitosis. *Mol. Cell* 44, 878–892.
- Bardeesy, N., Sinha, M., Hezel, A.F., Signoretti, S., Hathaway, N.A., Sharpless, N.E., Loda, M., Carrasco, D.R., and DePinho, R.A. (2002). Loss of the Lkb1 tumour suppressor provokes intestinal polyposis but resistance to transformation. *Nature* 419, 162–167.
- Barnes, K., Ingram, J.C., Porras, O.H., Barros, L.F., Hudson, E.R., Fryer, L.G.D., Fougelle, F., Carling, D., Hardie, D.G., and Baldwin, S.A. (2002). Activation of GLUT1 by metabolic and osmotic stress: potential involvement of AMP-activated protein kinase (AMPK). *J. Cell Sci.* 115, 2433–2442.
- Barthel, A., Okino, S.T., Liao, J., Nakatani, K., Li, J., Whitlock, J.P., and Roth, R.A. (1999). Regulation of GLUT1 Gene Transcription by the Serine/Threonine Kinase Akt1. *J. Biol. Chem.* 274, 20281–20286.
- B'chir, W., Maurin, A.-C., Carraro, V., Averous, J., Jousse, C., Muranishi, Y., Parry, L., Stepien, G., Fafournoux, P., and Bruhat, A. (2013). The eIF2 $\alpha$ /ATF4 pathway is essential for

stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res.*

Berry, D.L., and Baehrecke, E.H. (2007). Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in *Drosophila*. *Cell* 131, 1137–1148.

Bi, M., Naczki, C., Koritzinsky, M., Fels, D., Blais, J., Hu, N., Harding, H., Novoa, I., Varia, M., Raleigh, J., et al. (2005). ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth. *EMBO J.* 24, 3470–3481.

Bissler, J.J., McCormack, F.X., Young, L.R., Elwing, J.M., Chuck, G., Leonard, J.M., Schmithorst, V.J., Laor, T., Brody, A.S., Bean, J., et al. (2008). Sirolimus for Angiomyolipoma in Tuberous Sclerosis Complex or Lymphangiomyomatosis. *N. Engl. J. Med.* 358, 140–151.

Blais, J.D., Addison, C.L., Edge, R., Falls, T., Zhao, H., Wary, K., Koumenis, C., Harding, H.P., Ron, D., Holcik, M., et al. (2006). Perk-Dependent Translational Regulation Promotes Tumor Cell Adaptation and Angiogenesis in Response to Hypoxic Stress. *Mol. Cell. Biol.* 26, 9517–9532.

Bland, M.L., and Birnbaum, M.J. (2011). ADaPting to Energetic Stress. *Science* 332, 1387–1388.

Bobrovnikova-Marjon, E., Grigoriadou, C., Pytel, D., Zhang, F., Ye, J., Koumenis, C., Cavener, D., and Diehl, J.A. (2010). PERK promotes cancer cell proliferation and tumor growth by limiting oxidative DNA damage. *Oncogene* 29, 3881–3895.

Bonen, A., Han, X.-X., Habets, D.D.J., Febbraio, M., Glatz, J.F.C., and Luiken, J.J.F.P. (2007). A null mutation in skeletal muscle FAT/CD36 reveals its essential role in insulin- and AICAR-stimulated fatty acid metabolism. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292, E1740–E1749.

Bonnet, D., and Dick, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* 3, 730–737.

Bowker, S.L., Majumdar, S.R., Veugelers, P., and Johnson, J.A. (2006). Increased cancer-related mortality for patients with type 2 diabetes who use sulfonylureas or insulin. *Diabetes Care* 29, 254–258.

Breems, D.A., Putten, W.L.J.V., Greef, G.E.D., Zelderen-Bhola, S.L.V., Gerssen-Schoorl, K.B.J., Mellink, C.H.M., Nieuwint, A., Jotterand, M., Hagemeyer, A., Beverloo, H.B., et al. (2008). Monosomal Karyotype in Acute Myeloid Leukemia: A Better Indicator of Poor Prognosis Than a Complex Karyotype. *J. Clin. Oncol.* 26, 4791–4797.

Brentjens, R.J., Davila, M.L., Riviere, I., Park, J., Wang, X., Cowell, L.G., Bartido, S., Stefanski, J., Taylor, C., Olszewska, M., et al. (2013). CD19-Targeted T Cells Rapidly Induce Molecular Remissions in Adults with Chemotherapy-Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia. *Sci. Transl. Med.* 5, 177ra38–ra177ra38.

Brown, E.J., Albers, M.W., Shin, T.B., Ichikawa, K., Keith, C.T., Lane, W.S., and Schreiber, S.L. (1994). A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* 369, 756–758.

- Brugarolas, J., Lei, K., Hurley, R.L., Manning, B.D., Reiling, J.H., Hafen, E., Witters, L.A., Ellisen, L.W., and Kaelin, W.G. (2004). Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev.* *18*, 2893–2904.
- Brunn, G.J., Hudson, C.C., Sekulić, A., Williams, J.M., Hosoi, H., Houghton, P.J., Lawrence, J.C., and Abraham, R.T. (1997). Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin. *Science* *277*, 99–101.
- Brush, M.H., Weiser, D.C., and Shenolikar, S. (2003). Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 alpha to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 1292–1303.
- Büchner, T., Schlenk, R.F., Schaich, M., Döhner, K., Krahl, R., Krauter, J., Heil, G., Krug, U., Sauerland, M.C., Heinecke, A., et al. (2012). Acute Myeloid Leukemia (AML): Different Treatment Strategies Versus a Common Standard Arm—Combined Prospective Analysis by the German AML Intergroup. *J. Clin. Oncol.* *JCO.2012.42.2907*.
- Budanov, A.V., and Karin, M. (2008). p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell* *134*, 451–460.
- Bultot, L., Guigas, B., Von Wilamowitz-Moellendorff, A., Maisin, L., Vertommen, D., Hussain, N., Beullens, M., Guinovart, J.J., Foretz, M., Viollet, B., et al. (2012). AMP-activated protein kinase phosphorylates and inactivates liver glycogen synthase. *Biochem. J.* *443*, 193–203.
- Bungard, D., Fuerth, B.J., Zeng, P.-Y., Faubert, B., Maas, N.L., Viollet, B., Carling, D., Thompson, C.B., Jones, R.G., and Berger, S.L. (2010). Signaling kinase AMPK activates stress-promoted transcription via histone H2B phosphorylation. *Science* *329*, 1201–1205.
- Buttgereit, F., and Brand, M.D. (1995). A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells. *Biochem. J.* *312 (Pt 1)*, 163–167.
- Cairns, R.A., Harris, I.S., and Mak, T.W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer* *11*, 85–95.
- Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J.H., Hubbard, S.R., Harding, H.P., Clark, S.G., and Ron, D. (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* *415*, 92–96.
- Cancer Genome Atlas Research Network (2013). Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* *368*, 2059–2074.
- Canto, C., Jiang, L.Q., Deshmukh, A.S., Matakı, C., Coste, A., Lagouge, M., Zierath, J.R., and Auwerx, J. (2010). Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle. *Cell Metab.* *11*, 213–219.
- Capp, J.-P. (2005). Stochastic gene expression, disruption of tissue averaging effects and cancer as a disease of development. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *27*, 1277–1285.

Carling, D., Zammit, V.A., and Hardie, D.G. (1987). A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett.* *223*, 217–222.

Castaigne, S., Pautas, C., Terré, C., Raffoux, E., Bordessoule, D., Bastie, J.-N., Legrand, O., Thomas, X., Turlure, P., Reman, O., et al. (2012). Effect of gemtuzumab ozogamicin on survival of adult patients with de-novo acute myeloid leukaemia (ALFA-0701): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet* *379*, 1508–1516.

Chan, E.Y.W., Longatti, A., McKnight, N.C., and Tooze, S.A. (2009). Kinase-inactivated ULK proteins inhibit autophagy via their conserved C-terminal domains using an Atg13-independent mechanism. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 157–171.

Chapuis, N., Tamburini, J., Cornillet-Lefebvre, P., Gillot, L., Bardet, V., Willems, L., Park, S., Green, A.S., Ifrah, N., Dreyfus, F., et al. (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.

Chen, C., Liu, Y., Liu, R., Ikenoue, T., Guan, K.-L., Liu, Y., and 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.

Chen, Y.-J., Huang, W.-P., Yang, Y.-C., Lin, C.-P., Chen, S.-H., Hsu, M.-L., Tseng, Y.-J., Shieh, H.-R., Chen, Y.-Y., and Lee, J.-J. (2009). Platonin induces autophagy-associated cell death in human leukemia cells. *Autophagy* *5*, 173–183.

Cheng, H., Liu, P., Wang, Z.C., Zou, L., Santiago, S., Garbitt, V., Gjoerup, O.V., Iglehart, J.D., Miron, A., Richardson, A.L., et al. (2009). SIK1 Couples LKB1 to p53-Dependent Anoikis and Suppresses Metastasis. *Sci. Signal.* *2*, ra35–ra35.

Cheong, H., Lindsten, T., Wu, J., Lu, C., and Thompson, C.B. (2011). Ammonia-induced autophagy is independent of ULK1/ULK2 kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 11121–11126.

Cherkasova, V.A., and Hinnebusch, A.G. (2003). Translational control by TOR and TAP42 through dephosphorylation of eIF2alpha kinase GCN2. *Genes Dev.* *17*, 859–872.

Cherkasova, V., Qiu, H., and Hinnebusch, A.G. (2010). Snf1 promotes phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 by activating Gcn2 and inhibiting phosphatases Glc7 and Sit4. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 2862–2873.

Chin, L., Tam, A., Pomerantz, J., Wong, M., Holash, J., Bardeesy, N., Shen, Q., O'Hagan, R., Pantginis, J., Zhou, H., et al. (1999). Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance. *Nature* *400*, 468–472.

Choo, A.Y., Kim, S.G., Vander Heiden, M.G., Mahoney, S.J., Vu, H., Yoon, S.-O., Cantley, L.C., and Blenis, J. (2010). Glucose addiction of TSC null cells is caused by failed mTORC1-dependent balancing of metabolic demand with supply. *Mol. Cell* *38*, 487–499.

Chresta, C.M., Davies, B.R., Hickson, I., Harding, T., Cosulich, S., Critchlow, S.E., Vincent, J.P., Ellston, R., Jones, D., Sini, P., et al. (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.

Codogno, P., Mehrpour, M., and Proikas-Cezanne, T. (2012). Canonical and non-canonical autophagy: variations on a common theme of self-eating? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 7–12.

Cool, B., Zinker, B., Chiou, W., Kifle, L., Cao, N., Perham, M., Dickinson, R., Adler, A., Gagne, G., Iyengar, R., et al. (2006). Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab.* *3*, 403–416.

Corton, J.M., Gillespie, J.G., Hawley, S.A., and Hardie, D.G. (1995). 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur. J. Biochem. FEBS* *229*, 558–565.

Courtney, K.D., Corcoran, R.B., and Engelman, J.A. (2010). The PI3K Pathway As Drug Target in Human Cancer. *J. Clin. Oncol.* *28*, 1075–1083.

Cunningham, J.T., Rodgers, J.T., Arlow, D.H., Vazquez, F., Mootha, V.K., and Puigserver, P. (2007). mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. *Nature* *450*, 736–740.

Dagon, Y., Hur, E., Zheng, B., Wellenstein, K., Cantley, L.C., and Kahn, B.B. (2012). p70S6 kinase phosphorylates AMPK on serine 491 to mediate leptin's effect on food intake. *Cell Metab.* *16*, 104–112.

Dai, C., Whitesell, L., Rogers, A.B., and Lindquist, S. (2007). Heat shock factor 1 is a powerful multifaceted modifier of carcinogenesis. *Cell* *130*, 1005–1018.

Degenhardt, K., Mathew, R., Beaudoin, B., Bray, K., Anderson, D., Chen, G., Mukherjee, C., Shi, Y., Gélinas, C., Fan, Y., et al. (2006). Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* *10*, 51–64.

Delépine, M., Nicolino, M., Barrett, T., Golamaully, M., Lathrop, G.M., and Julier, C. (2000). EIF2AK3, encoding translation initiation factor 2-alpha kinase 3, is mutated in patients with Wolcott-Rallison syndrome. *Nat. Genet.* *25*, 406–409.

Demetriades, C., Doumpas, N., and Teleman, A.A. (2014). Regulation of TORC1 in response to amino acid starvation via lysosomal recruitment of TSC2. *Cell* *156*, 786–799.

Deng, J., Harding, H.P., Raught, B., Gingras, A.-C., Berlanga, J.J., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Ron, D., and Sonenberg, N. (2002). Activation of GCN2 in UV-Irradiated Cells Inhibits Translation. *Curr. Biol.* *12*, 1279–1286.

Van Den Neste, E., Cazin, B., Janssens, A., González-Barca, E., Terol, M.J., Levy, V., Pérez de Oteyza, J., Zachee, P., Saunders, A., de Frias, M., et al. (2013). Acadesine for patients with relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): a multicenter phase I/II study. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *71*, 581–591.

Denton, D., Shrivage, B., Simin, R., Mills, K., Berry, D.L., Baehrecke, E.H., and Kumar, S. (2009). Autophagy, not apoptosis, is essential for midgut cell death in *Drosophila*. *Curr. Biol. CB* *19*, 1741–1746.

- Deprez, J., Vertommen, D., Alessi, D.R., Hue, L., and Rider, M.H. (1997). Phosphorylation and Activation of Heart 6-Phosphofructo-2-kinase by Protein Kinase B and Other Protein Kinases of the Insulin Signaling Cascades. *J. Biol. Chem.* *272*, 17269–17275.
- Dey, S., Baird, T.D., Zhou, D., Palam, L.R., Spandau, D.F., and Wek, R.C. (2010). Both Transcriptional Regulation and Translational Control of ATF4 Are Central to the Integrated Stress Response. *J. Biol. Chem.* *285*, 33165–33174.
- DeYoung, M.P., Horak, P., Sofer, A., Sgroi, D., and Ellisen, L.W. (2008). Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes Dev.* *22*, 239–251.
- Ding, L., Ley, T.J., Larson, D.E., Miller, C.A., Koboldt, D.C., Welch, J.S., Ritchey, J.K., Young, M.A., Lamprecht, T., McLellan, M.D., et al. (2012). Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature* *481*, 506–510.
- Ding, W.-X., Ni, H.-M., Gao, W., Yoshimori, T., Stolz, D.B., Ron, D., and Yin, X.-M. (2007). Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *Am. J. Pathol.* *171*, 513–524.
- Döhner, H., Estey, E.H., Amadori, S., Appelbaum, F.R., Büchner, T., Burnett, A.K., Dombret, H., Fenaux, P., Grimwade, D., Larson, R.A., et al. (2010). Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* *115*, 453–474.
- Döhner, H., Lübbert, M., Fiedler, W., Fouillard, L., Haaland, A., Brandwein, J.M., Lepretre, S., Reman, O., Turlure, P., Ottmann, O.G., et al. (2014). Randomized, phase 2 trial comparing low-dose cytarabine with or without volasertib in AML patients not suitable for intensive induction therapy. *Blood*.
- Dorfman, J., and Macara, I.G. (2008). STRADalpha regulates LKB1 localization by blocking access to importin-alpha, and by association with Crm1 and exportin-7. *Mol. Biol. Cell* *19*, 1614–1626.
- Drewes, G., Ebner, A., Preuss, U., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1997). MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell* *89*, 297–308.
- Du, K., Herzig, S., Kulkarni, R.N., and Montminy, M. (2003). TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science* *300*, 1574–1577.
- Ducommun, S., Ford, R.J., Bultot, L., Deak, M., Bertrand, L., Kemp, B.E., Steinberg, G.R., and Sakamoto, K. (2014). Enhanced activation of cellular AMPK by dual-small molecule treatment: AICAR and A769662. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* *306*, E688–E696.
- Düvel, K., Yecies, J.L., Menon, S., Raman, P., Lipovsky, A.I., Souza, A.L., Triantafellow, E., Ma, Q., Gorski, R., Cleaver, S., et al. (2010). Activation of a Metabolic Gene Regulatory Network Downstream of mTOR Complex 1. *Mol. Cell* *39*, 171–183.
- Efeyan, A., Zoncu, R., Chang, S., Gumper, I., Snitkin, H., Wolfson, R.L., Kirak, O., Sabatini, D.D., and Sabatini, D.M. (2013). Regulation of mTORC1 by the Rag GTPases is necessary

for neonatal autophagy and survival. *Nature* 493, 679–683.

Egan, D.F., Shackelford, D.B., Mihaylova, M.M., Gelino, S., Kohnz, R.A., Mair, W., Vasquez, D.S., Joshi, A., Gwinn, D.M., Taylor, R., et al. (2011). Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* 331, 456–461.

El-Mir, M.Y., Nogueira, V., Fontaine, E., Avéret, N., Rigoulet, M., and Leverve, X. (2000). Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J. Biol. Chem.* 275, 223–228.

Evans, J.M.M., Donnelly, L.A., Emslie-Smith, A.M., Alessi, D.R., and Morris, A.D. (2005). Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ* 330, 1304–1305.

Faubert, B., Boily, G., Izreig, S., Griss, T., Samborska, B., Dong, Z., Dupuy, F., Chambers, C., Fuerth, B.J., Viollet, B., et al. (2013). AMPK is a negative regulator of the Warburg effect and suppresses tumor growth in vivo. *Cell Metab.* 17, 113–124.

Feldman, M.E., Apsel, B., Uotila, A., Loewith, R., Knight, Z.A., Ruggero, D., and Shokat, K.M. (2009). Active-Site Inhibitors of mTOR Target Rapamycin-Resistant Outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biol* 7, e1000038.

Felsher, D.W., and Bishop, J.M. (1999). Reversible tumorigenesis by MYC in hematopoietic lineages. *Mol. Cell* 4, 199–207.

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., et al. (2009). Anthracycline dose intensification in acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 361, 1249–1259.

Fernandez, J., Yaman, I., Sarnow, P., Snider, M.D., and Hatzoglou, M. (2002). Regulation of Internal Ribosomal Entry Site-mediated Translation by Phosphorylation of the Translation Initiation Factor eIF2 $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* 277, 19198–19205.

Fernandez, P.M., Tabbara, S.O., Jacobs, L.K., Manning, F.C., Tsangaris, T.N., Schwartz, A.M., Kennedy, K.A., and Patierno, S.R. (2000). Overexpression of the glucose-regulated stress gene GRP78 in malignant but not benign human breast lesions. *Breast Cancer Res. Treat.* 59, 15–26.

Figuroa, M.E., Lugthart, S., Li, Y., Erpelinck-Verschueren, C., Deng, X., Christos, P.J., Schifano, E., Booth, J., van Putten, W., Skrabanek, L., et al. (2010). DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 17, 13–27.

Frøsig, C., Pehmøller, C., Birk, J.B., Richter, E.A., and Wojtaszewski, J.F.P. (2010). Exercise-induced TBC1D1 Ser237 phosphorylation and 14-3-3 protein binding capacity in human skeletal muscle. *J. Physiol.* 588, 4539–4548.

Fu, H.Y., Okada, K., Liao, Y., Tsukamoto, O., Isomura, T., Asai, M., Sawada, T., Okuda, K., Asano, Y., Sanada, S., et al. (2010). Ablation of C/EBP homologous protein attenuates endoplasmic reticulum-mediated apoptosis and cardiac dysfunction induced by pressure overload. *Circulation* 122, 361–369.

- Gan, B., Sahin, E., Jiang, S., Sanchez-Aguilera, A., Scott, K.L., Chin, L., Williams, D.A., Kwiatkowski, D.J., and 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, B., Hu, J., Jiang, S., Liu, Y., Sahin, E., Zhuang, L., Fletcher-Sananikone, E., Colla, S., Wang, Y.A., Chin, L., et al. (2010). Lkb1 regulates quiescence and metabolic homeostasis of haematopoietic stem cells. *Nature* *468*, 701–704.
- García-Martínez, J.M., and 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., and Alessi, D.R. (2009). Ku-0063794 is a specific inhibitor of the mammalian target of rapamycin (mTOR). *Biochem. J.* *421*, 29–42.
- Gardner, B.M., and Walter, P. (2011). Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. *Science* *333*, 1891–1894.
- Giles, F.J., Borthakur, G., Ravandi, F., Faderl, S., Verstovsek, S., Thomas, D., Wierda, W., Ferrajoli, A., Kornblau, S., Pierce, S., et al. (2007). The haematopoietic cell transplantation comorbidity index score is predictive of early death and survival in patients over 60 years of age receiving induction therapy for acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* *136*, 624–627.
- Gledhill, J.R., Montgomery, M.G., Leslie, A.G.W., and Walker, J.E. (2007). Mechanism of inhibition of bovine F1-ATPase by resveratrol and related polyphenols. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 13632–13637.
- Gomez, E., Powell, M.L., Bevington, A., and Herbert, T.P. (2008). A decrease in cellular energy status stimulates PERK-dependent eIF2 $\alpha$  phosphorylation and regulates protein synthesis in pancreatic  $\beta$ -cells. *Biochem. J.* *410*, 485.
- Goransson, O., McBride, A., Hawley, S.A., Ross, F.A., Shpiro, N., Foretz, M., Viollet, B., Hardie, D.G., and Sakamoto, K. (2007). Mechanism of Action of A-769662, a Valuable Tool for Activation of AMP-activated Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* *282*, 32549–32560.
- Grabiner, B.C., Nardi, V., Birsoy, K., Possemato, R., Shen, K., Sinha, S., Jordan, A., Beck, A.H., and Sabatini, D.M. (2014). A diverse array of cancer-associated MTOR mutations are hyperactivating and can predict rapamycin sensitivity. *Cancer Discov.* *4*, 554–563.
- Green, A.S., Chapuis, N., Maciel, T.T., Willems, L., Lambert, M., Arnoult, C., Boyer, O., Bardet, V., Park, S., Foretz, M., et al. (2010). The LKB1/AMPK signaling pathway has tumor suppressor activity in acute myeloid leukemia through the repression of mTOR-dependent oncogenic mRNA translation. *Blood* *116*, 4262–4273.
- Grimaldi, C., Chiarini, F., Tabellini, G., Ricci, F., Tazzari, P.L., Battistelli, M., Falcieri, E., Bortul, R., Melchionda, F., Iacobucci, I., et al. (2012). AMP-dependent kinase/mammalian target of rapamycin complex 1 signaling in T-cell acute lymphoblastic leukemia: therapeutic implications. *Leukemia* *26*, 91–100.

- Grishchuk, Y., Ginet, V., Truttmann, A.C., Clarke, P.G.H., and Puyal, J. (2011). Beclin 1-independent autophagy contributes to apoptosis in cortical neurons. *Autophagy* 7, 1115–1131.
- Guo, J.Y., Chen, H.-Y., Mathew, R., Fan, J., Strohecker, A.M., Karsli-Uzunbas, G., Kamphorst, J.J., Chen, G., Lemons, J.M.S., Karantza, V., et al. (2011). Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev.* 25, 460–470.
- Gupta, P.B., Fillmore, C.M., Jiang, G., Shapira, S.D., Tao, K., Kuperwasser, C., and Lander, E.S. (2011). Stochastic State Transitions Give Rise to Phenotypic Equilibrium in Populations of Cancer Cells. *Cell* 146, 633–644.
- Gurumurthy, S., Xie, S.Z., Alagesan, B., Kim, J., Yusuf, R.Z., Saez, B., Tzatsos, A., Ozsolak, F., Milos, P., Ferrari, F., et al. (2010). The Lkb1 metabolic sensor maintains haematopoietic stem cell survival. *Nature* 468, 659–663.
- Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., Turk, B.E., and Shaw, R.J. (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol. Cell* 30, 214–226.
- Han, A.P., Yu, C., Lu, L., Fujiwara, Y., Browne, C., Chin, G., Fleming, M., Leboulch, P., Orkin, S.H., and Chen, J.J. (2001). Heme-regulated eIF2alpha kinase (HRI) is required for translational regulation and survival of erythroid precursors in iron deficiency. *EMBO J.* 20, 6909–6918.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.
- Hardie, D.G. (2011). AMP-activated protein kinase—an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev.* 25, 1895–1908.
- Hardie, D.G. (2013). The LKB1-AMPK pathway—friend or foe in cancer? *Cancer Cell* 23, 131–132.
- Harding, H.P., Zhang, Y., and Ron, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397, 271–274.
- Harding, H.P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., and Ron, D. (2000). Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell* 6, 1099–1108.
- Harousseau, J.-L., Martinelli, G., Jedrzejczak, W.W., Brandwein, J.M., Bordessoule, D., Masszi, T., Ossenkopp, G.J., Alexeeva, J.A., Beutel, G., Maertens, J., et al. (2009). A randomized phase 3 study of tipifarnib compared with best supportive care, including hydroxyurea, in the treatment of newly diagnosed acute myeloid leukemia in patients 70 years or older. *Blood* 114, 1166–1173.
- Harrington, L.S., Findlay, G.M., Gray, A., Tolkacheva, T., Wigfield, S., Rebholz, H., Barnett, J., Leslie, N.R., Cheng, S., Shepherd, P.R., et al. (2004). The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *J. Cell Biol.* 166, 213–223.

Hawley, S.A., Davison, M., Woods, A., Davies, S.P., Beri, R.K., Carling, D., and Hardie, D.G. (1996). Characterization of the AMP-activated Protein Kinase Kinase from Rat Liver and Identification of Threonine 172 as the Major Site at Which It Phosphorylates AMP-activated Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* *271*, 27879–27887.

Hawley, S.A., Boudeau, J., Reid, J.L., Mustard, K.J., Udd, L., Mäkelä, T.P., Alessi, D.R., and Hardie, D.G. (2003). Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J. Biol.* *2*, 28.

Hawley, S.A., Pan, D.A., Mustard, K.J., Ross, L., Bain, J., Edelman, A.M., Frenguelli, B.G., and Hardie, D.G. (2005). Calmodulin-dependent protein kinase kinase- $\beta$  is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab.* *2*, 9–19.

Hawley, S.A., Ross, F.A., Chevtzoff, C., Green, K.A., Evans, A., Fogarty, S., Towler, M.C., Brown, L.J., Ogunbayo, O.A., Evans, A.M., et al. (2010). Use of cells expressing gamma subunit variants to identify diverse mechanisms of AMPK activation. *Cell Metab.* *11*, 554–565.

Hawley, S.A., Fullerton, M.D., Ross, F.A., Schertzer, J.D., Chevtzoff, C., Walker, K.J., Peggie, M.W., Zibrova, D., Green, K.A., Mustard, K.J., et al. (2012). The Ancient Drug Salicylate Directly Activates AMP-Activated Protein Kinase. *Science*.

Hemminki, A., Markie, D., Tomlinson, I., Avizienyte, E., Roth, S., Loukola, A., Bignell, G., Warren, W., Aminoff, M., Höglund, P., et al. (1998). A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature* *391*, 184–187.

Herrero-Martín, G., Høyer-Hansen, M., García-García, C., Fumarola, C., Farkas, T., López-Rivas, A., and Jäättelä, M. (2009). TAK1 activates AMPK-dependent cytoprotective autophagy in TRAIL-treated epithelial cells. *EMBO J.* *28*, 677–685.

Hills, R.K., Castaigne, S., Appelbaum, F.R., Delaunay, J., Petersdorf, S., Othus, M., Estey, E.H., Dombret, H., Chevret, S., Ifrah, N., et al. (2014). Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials. *Lancet Oncol.*

Hitosugi, T., Kang, S., Vander Heiden, M.G., Chung, T.-W., Elf, S., Lythgoe, K., Dong, S., Lonial, S., Wang, X., Chen, G.Z., et al. (2009). Tyrosine phosphorylation inhibits PKM2 to promote the Warburg effect and tumor growth. *Sci. Signal.* *2*, ra73.

Horman, S., Browne, G.J., Krause, U., Patel, J.V., Vertommen, D., Bertrand, L., Lavoine, A., Hue, L., Proud, C.G., and Rider, M.H. (2002). Activation of AMP-Activated Protein Kinase Leads to the Phosphorylation of Elongation Factor 2 and an Inhibition of Protein Synthesis. *Curr. Biol.* *12*, 1419–1423.

Hoshii, T., Tadokoro, Y., Naka, K., Ooshio, T., Muraguchi, T., Sugiyama, N., Soga, T., Araki, K., Yamamura, K., and Hirao, A. (2012). mTORC1 is essential for leukemia propagation but not stem cell self-renewal. *J. Clin. Invest.* *122*, 2114–2129.

Høyer-Hansen, M., and Jäättelä, M. (2007). Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell Death Differ.* *14*, 1576–1582.

Huai, L., Wang, C., Zhang, C., Li, Q., Chen, Y., Jia, Y., Li, Y., Xing, H., Tian, Z., Rao, Q., et al. (2012). Metformin induces differentiation in acute promyelocytic leukemia by activating the MEK/ERK signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *422*, 398–404.

Huettner, C.S., Zhang, P., Van Etten, R.A., and Tenen, D.G. (2000). Reversibility of acute B-cell leukaemia induced by BCR-ABL1. *Nat. Genet.* *24*, 57–60.

Hunter, R.W., Foretz, M., Bultot, L., Fullerton, M.D., Deak, M., Ross, F.A., Hawley, S.A., Shpiro, N., Viollet, B., Barron, D., et al. (2014). Mechanism of action of compound-13: an  $\alpha$ 1-selective small molecule activator of AMPK. *Chem. Biol.* *21*, 866–879.

Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., and Guan, K.-L. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat. Cell Biol.* *4*, 648–657.

Inoki, K., Li, Y., Xu, T., and Guan, K.-L. (2003a). Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev.* *17*, 1829–1834.

Inoki, K., Zhu, T., and Guan, K.-L. (2003b). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* *115*, 577–590.

Inoki, K., Ouyang, H., Zhu, T., Lindvall, C., Wang, Y., Zhang, X., Yang, Q., Bennett, C., Harada, Y., Stankunas, K., et al. (2006). TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell* *126*, 955–968.

Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Ruegg, M.A., Hall, A., and Hall, M.N. (2004). Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat. Cell Biol.* *6*, 1122–1128.

Jäger, S., Handschin, C., St.-Pierre, J., and Spiegelman, B.M. (2007). AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 $\alpha$ . *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 12017–12022.

Jain, M., Arvanitis, C., Chu, K., Dewey, W., Leonhardt, E., Trinh, M., Sundberg, C.D., Bishop, J.M., and Felsher, D.W. (2002). Sustained loss of a neoplastic phenotype by brief inactivation of MYC. *Science* *297*, 102–104.

Jamora, C., Dennert, G., and Lee, A.S. (1996). Inhibition of tumor progression by suppression of stress protein GRP78/BiP induction in fibrosarcoma B/C10ME. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 7690–7694.

Jeon, S.-M., Chandel, N.S., and Hay, N. (2012). AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress. *Nature* *485*, 661–665.

Jiang, H.-Y., and Wek, R.C. (2005). Phosphorylation of the  $\alpha$ -Subunit of the Eukaryotic Initiation Factor-2 (eIF2 $\alpha$ ) Reduces Protein Synthesis and Enhances Apoptosis in Response to Proteasome Inhibition. *J. Biol. Chem.* *280*, 14189–14202.

Jin, L., Hope, K.J., Zhai, Q., Smadja-Joffe, F., and Dick, J.E. (2006). Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nat. Med.* *12*, 1167–1174.

Jones, R.G., Plas, D.R., Kubek, S., Buzzai, M., Mu, J., Xu, Y., Birnbaum, M.J., and

- Thompson, C.B. (2005). AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol. Cell* *18*, 283–293.
- Joshi, K., Banasavadi-Siddegowda, Y., Mo, X., Kim, S.-H., Mao, P., Kig, C., Nardini, D., Sobol, R.W., Chow, L.M.L., Kornblum, H.I., et al. (2013). MELK-dependent FOXM1 phosphorylation is essential for proliferation of glioma stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* *31*, 1051–1063.
- Juliusson, G., Antunovic, P., Derolf, Å., Lehmann, S., Möllgård, L., Stockelberg, D., Tidefelt, U., Wahlin, A., and Höglund, M. (2009). Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood* *113*, 4179–4187.
- Jung, C.H., Jun, C.B., Ro, S.-H., Kim, Y.-M., Otto, N.M., Cao, J., Kundu, M., and Kim, D.-H. (2009). ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol. Biol. Cell* *20*, 1992–2003.
- Kaelin, W.G. (2005). The Concept of Synthetic Lethality in the Context of Anticancer Therapy. *Nat. Rev. Cancer* *5*, 689–698.
- Kalender, A., Selvaraj, A., Kim, S.Y., Gulati, P., Brûlé, S., Viollet, B., Kemp, B.E., Bardeesy, N., Dennis, P., Schlager, J.J., et al. (2010). Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner. *Cell Metab.* *11*, 390–401.
- Kandoth, C., McLellan, M.D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., Xie, M., Zhang, Q., McMichael, J.F., Wyczalkowski, M.A., et al. (2013). Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* *502*, 333–339.
- Kang, S.A., Pacold, M.E., Cervantes, C.L., Lim, D., Lou, H.J., Ottina, K., Gray, N.S., Turk, B.E., Yaffe, M.B., and Sabatini, D.M. (2013). mTORC1 Phosphorylation Sites Encode Their Sensitivity to Starvation and Rapamycin. *Science* *341*, 1236566.
- Kawaguchi, T., Osatomi, K., Yamashita, H., Kabashima, T., and Uyeda, K. (2002). Mechanism for fatty acid “sparing” effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* *277*, 3829–3835.
- Kaye, S.B., Lubinski, J., Matulonis, U., Ang, J.E., Gourley, C., Karlan, B.Y., Amnon, A., Bell-McGuinn, K.M., Chen, L.-M., Friedlander, M., et al. (2012). Phase II, Open-Label, Randomized, Multicenter Study Comparing the Efficacy and Safety of Olaparib, a Poly (ADP-Ribose) Polymerase Inhibitor, and Pegylated Liposomal Doxorubicin in Patients With BRCA1 or BRCA2 Mutations and Recurrent Ovarian Cancer. *J. Clin. Oncol.* *30*, 372–379.
- Kelly, L.M., and Gilliland, D.G. (2002). Genetics of Myeloid Leukemias. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* *3*, 179–198.
- Kharas, M.G., Okabe, R., Ganis, J.J., Gozo, M., Khandan, T., Paktinat, M., Gilliland, D.G., and Gritsman, K. (2010). Constitutively active AKT depletes hematopoietic stem cells and induces leukemia in mice. *Blood* *115*, 1406–1415.
- Khatri, S., Yepiskoposyan, H., Gallo, C.A., Tandon, P., and Plas, D.R. (2010). FOXO3a regulates glycolysis via transcriptional control of tumor suppressor TSC1. *J. Biol. Chem.*

jbc.M110.121871.

Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K.-L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* *13*, 132–141.

Kim, J., Kim, Y.C., Fang, C., Russell, R.C., Kim, J.H., Fan, W., Liu, R., Zhong, Q., and Guan, K.-L. (2013). Differential regulation of distinct Vps34 complexes by AMPK in nutrient stress and autophagy. *Cell* *152*, 290–303.

Kimball, S.R., and Jefferson, L.S. (2012). Induction of REDD1 gene expression in the liver in response to endoplasmic reticulum stress is mediated through a PERK, eIF2 $\alpha$  phosphorylation, ATF4-dependent cascade. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *427*, 485–489.

Kindler, T., Lipka, D.B., and Fischer, T. (2010). FLT3 as a therapeutic target in AML: still challenging after all these years. *Blood* *116*, 5089–5102.

Kirkin, V., McEwan, D.G., Novak, I., and Dikic, I. (2009). A Role for Ubiquitin in Selective Autophagy. *Mol. Cell* *34*, 259–269.

Kishi, M., Pan, Y.A., Crump, J.G., and Sanes, J.R. (2005). Mammalian SAD kinases are required for neuronal polarization. *Science* *307*, 929–932.

Klco, J.M., Spencer, D.H., Miller, C.A., Griffith, M., Lamprecht, T.L., O’Laughlin, M., Fronick, C., Magrini, V., Demeter, R.T., Fulton, R.S., et al. (2014). Functional Heterogeneity of Genetically Defined Subclones in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell* *25*, 379–392.

Kode, A., Manavalan, J.S., Mosialou, I., Bhagat, G., Rathinam, C.V., Luo, N., Khiabani, H., Lee, A., Murty, V.V., Friedman, R., et al. (2014). Leukaemogenesis induced by an activating  $\beta$ -catenin mutation in osteoblasts. *Nature* *506*, 240–244.

Koo, S.-H., Flechner, L., Qi, L., Zhang, X., Sreton, R.A., Jeffries, S., Hedrick, S., Xu, W., Boussouar, F., Brindle, P., et al. (2005). The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature* *437*, 1109–1111.

Koren, I., Reem, E., and Kimchi, A. (2010). DAP1, a novel substrate of mTOR, negatively regulates autophagy. *Curr. Biol. CB* *20*, 1093–1098.

Korolchuk, V.I., Mansilla, A., Menzies, F.M., and Rubinsztein, D.C. (2009). Autophagy Inhibition Compromises Degradation of Ubiquitin-Proteasome Pathway Substrates. *Mol. Cell* *33*, 517–527.

Kouroku, Y., Fujita, E., Tanida, I., Ueno, T., Isoai, A., Kumagai, H., Ogawa, S., Kaufman, R.J., Kominami, E., and Momoi, T. (2006). ER stress (PERK/eIF2 $\alpha$  phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death Differ.* *14*, 230–239.

Kreso, A., O’Brien, C.A., van Galen, P., Gan, O.I., Notta, F., Brown, A.M.K., Ng, K., Ma, J., Wienholds, E., Dunant, C., et al. (2013). Variable clonal repopulation dynamics influence chemotherapy response in colorectal cancer. *Science* *339*, 543–548.

Kroemer, G., and Levine, B. (2008). Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 1004–1010.

- Kroemer, G., Mariño, G., and Levine, B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. *Mol. Cell* 40, 280–293.
- Kroll, E.S., Hyland, K.M., Hieter, P., and Li, J.J. (1996). Establishing genetic interactions by a synthetic dosage lethality phenotype. *Genetics* 143, 95–102.
- Krueger, D.A., Care, M.M., Holland, K., Agricola, K., Tudor, C., Mangeshkar, P., Wilson, K.A., Byars, A., Sahmoud, T., and Franz, D.N. (2010). Everolimus for Subependymal Giant-Cell Astrocytomas in Tuberous Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 363, 1801–1811.
- Kuhen, K.L., and Samuel, C.E. (1999). Mechanism of interferon action: functional characterization of positive and negative regulatory domains that modulate transcriptional activation of the human RNA-dependent protein kinase Pkr promoter. *Virology* 254, 182–195.
- Kundu, M., Lindsten, T., Yang, C.-Y., Wu, J., Zhao, F., Zhang, J., Selak, M.A., Ney, P.A., and Thompson, C.B. (2008). Ulk1 plays a critical role in the autophagic clearance of mitochondria and ribosomes during reticulocyte maturation. *Blood* 112, 1493–1502.
- Laderoute, K.R., Amin, K., Calaoagan, J.M., Knapp, M., Le, T., Orduna, J., Foretz, M., and Viollet, B. (2006). 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) is induced by low-oxygen and glucose deprivation conditions found in solid-tumor microenvironments. *Mol. Cell. Biol.* 26, 5336–5347.
- Lagadinou, E.D., Sach, A., Callahan, K., Rossi, R.M., Neering, S.J., Minhajuddin, M., Ashton, J.M., Pei, S., Grose, V., O'Dwyer, K.M., et al. (2013). BCL-2 Inhibition Targets Oxidative Phosphorylation and Selectively Eradicates Quiescent Human Leukemia Stem Cells. *Cell Stem Cell* 12, 329–341.
- Lamb, C.A., Yoshimori, T., and Tooze, S.A. (2013). The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 759–774.
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M.A., and Dick, J.E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367, 645–648.
- Laplante, M., and Sabatini, D.M. (2009). An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis. *Curr. Biol. CB* 19, R1046–R1052.
- Laplante, M., and Sabatini, D.M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149, 274–293.
- Laszlo, G.S., Gudgeon, C.J., Harrington, K.H., Dell'Aringa, J., Newhall, K.J., Means, G.D., Sinclair, A.M., Kischel, R., Frankel, S.R., and Walter, R.B. (2014). Cellular determinants for preclinical activity of a novel CD33/CD3 bispecific T-cell engager (BiTE) antibody, AMG 330, against human AML. *Blood* 123, 554–561.
- Leclerc, G.M., Leclerc, G.J., Kuznetsov, J.N., DeSalvo, J., and Barredo, J.C. (2013). Metformin Induces Apoptosis through AMPK-Dependent Inhibition of UPR Signaling in ALL Lymphoblasts. *PLoS ONE* 8, e74420.
- Lee, A.-H., Iwakoshi, N.N., and Glimcher, L.H. (2003). XBP-1 Regulates a Subset of Endoplasmic Reticulum Resident Chaperone Genes in the Unfolded Protein Response. *Mol.*

Cell. Biol. 23, 7448–7459.

Lee, D.-F., Kuo, H.-P., Chen, C.-T., Hsu, J.-M., Chou, C.-K., Wei, Y., Sun, H.-L., Li, L.-Y., Ping, B., Huang, W.-C., et al. (2007a). IKK beta suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway. *Cell* 130, 440–455.

Lee, J.H., Koh, H., Kim, M., Kim, Y., Lee, S.Y., Karess, R.E., Lee, S.-H., Shong, M., Kim, J.-M., Kim, J., et al. (2007b). Energy-dependent regulation of cell structure by AMP-activated protein kinase. *Nature* 447, 1017–1020.

Lerner, R.G., Depatie, C., Rutter, G.A., Screatton, R.A., and Balthasar, N. (2009). A role for the CREB co-activator CRT2 in the hypothalamic mechanisms linking glucose sensing with gene regulation. *EMBO Rep.* 10, 1175–1181.

Leung-Hagesteijn, C., Erdmann, N., Cheung, G., Keats, J.J., Stewart, A.K., Reece, D.E., Chung, K.C., and Tiedemann, R.E. (2013). Xbp1s-Negative Tumor B Cells and Pre-Plasmablasts Mediate Therapeutic Proteasome Inhibitor Resistance in Multiple Myeloma. *Cancer Cell* 24, 289–304.

Levis, M. (2013). FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: what is the best approach in 2013? *ASH Educ. Program Book 2013*, 220–226.

Li, L., Li, M., Sun, C., Francisco, L., Chakraborty, S., Sabado, M., McDonald, T., Gyorffy, J., Chang, K., Wang, S., et al. (2011a). Altered Hematopoietic Cell Gene Expression Precedes Development of Therapy-Related Myelodysplasia/Acute Myeloid Leukemia and Identifies Patients at Risk. *Cancer Cell* 20, 591–605.

Li, Y., Xu, S., Mihaylova, M., Zheng, B., Hou, X., Jiang, B., Park, O., Luo, Z., Lefai, E., Shyy, J.Y.-J., et al. (2011b). AMPK Phosphorylates and Inhibits SREBP Activity to Attenuate Hepatic Steatosis and Atherosclerosis in Diet-induced Insulin Resistant Mice. *Cell Metab.* 13, 376–388.

Liang, J., and Mills, G.B. (2013). AMPK: a contextual oncogene or tumor suppressor? *Cancer Res.* 73, 2929–2935.

Liang, J., Shao, S.H., Xu, Z.-X., Hennessy, B., Ding, Z., Larrea, M., Kondo, S., Dumont, D.J., Gutterman, J.U., Walker, C.L., et al. (2007). The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nat. Cell Biol.* 9, 218–224.

Lin, J.H., Li, H., Yasumura, D., Cohen, H.R., Zhang, C., Panning, B., Shokat, K.M., Lavail, M.M., and Walter, P. (2007). IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science* 318, 944–949.

Liu, L., Ulbrich, J., Müller, J., Wüstefeld, T., Aeberhard, L., Kress, T.R., Muthalagu, N., Rycak, L., Rudalska, R., Moll, R., et al. (2012). Deregulated MYC expression induces dependence upon AMPK-related kinase 5. *Nature* 483, 608–612.

Lizcano, J.M., Göransson, O., Toth, R., Deak, M., Morrice, N.A., Boudeau, J., Hawley, S.A., Udd, L., Mäkelä, T.P., Hardie, D.G., et al. (2004). LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *EMBO J.* 23, 833–843.

- Lorin, S., Hamai, A., Mehrpour, M., and Codogno, P. (2013). Autophagy regulation and its role in cancer. *Semin. Cancer Biol.* *23*, 361–379.
- Löwenberg, B., Ossenkoppele, G.J., van Putten, W., Schouten, H.C., Graux, C., Ferrant, A., Sonneveld, P., Maertens, J., Jongen-Lavrencic, M., von Lilienfeld-Toal, M., et al. (2009). High-dose daunorubicin in older patients with acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* *361*, 1235–1248.
- Lu, H., Li, G., Liu, L., Feng, L., Wang, X., and Jin, H. (2013a). Regulation and function of mitophagy in development and cancer. *Autophagy* *9*, 1720–1736.
- Lu, J., Zavorotinskaya, T., Dai, Y., Niu, X.-H., Castillo, J., Sim, J., Yu, J., Wang, Y., Langowski, J.L., Holash, J., et al. (2013b). Pim2 is required for maintaining multiple myeloma cell growth through modulating TSC2 phosphorylation. *Blood* *122*, 1610–1620.
- Luo, J., Solimini, N.L., and Elledge, S.J. (2009a). Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell* *136*, 823–837.
- Luo, J., Emanuele, M.J., Li, D., Creighton, C.J., Schlabach, M.R., Westbrook, T.F., Wong, K.-K., and Elledge, S.J. (2009b). A genome-wide RNAi screen identifies multiple synthetic lethal interactions with the Ras oncogene. *Cell* *137*, 835–848.
- Ma, Y., and Hendershot, L.M. (2004). The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe? *Nat. Rev. Cancer* *4*, 966–977.
- Ma, L., Chen, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Pandolfi, P.P. (2005). Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* *121*, 179–193.
- Madiraju, A.K., Erion, D.M., Rahimi, Y., Zhang, X.-M., Braddock, D.T., Albright, R.A., Prigaro, B.J., Wood, J.L., Bhanot, S., MacDonald, M.J., et al. (2014). Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature* *510*, 542–546.
- Mardis, E.R., Ding, L., Dooling, D.J., Larson, D.E., McLellan, M.D., Chen, K., Koboldt, D.C., Fulton, R.S., Delehaunty, K.D., McGrath, S.D., et al. (2009). Recurring Mutations Found by Sequencing an Acute Myeloid Leukemia Genome. *N. Engl. J. Med.* *361*, 1058–1066.
- Marsin, A.S., Bertrand, L., Rider, M.H., Deprez, J., Beauloye, C., Vincent, M.F., Van den Berghe, G., Carling, D., and Hue, L. (2000). Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Curr. Biol.* *10*, 1247–1255.
- Martins, C.P., Brown-Swigart, L., and Evan, G.I. (2006). Modeling the therapeutic efficacy of p53 restoration in tumors. *Cell* *127*, 1323–1334.
- Masuoka, H.C., and Townes, T.M. (2002). Targeted disruption of the activating transcription factor 4 gene results in severe fetal anemia in mice. *Blood* *99*, 736–745.
- Matsunaga, K., Saitoh, T., Tabata, K., Omori, H., Satoh, T., Kurotori, N., Maejima, I., Shirahama-Noda, K., Ichimura, T., Isobe, T., et al. (2009). Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat. Cell Biol.* *11*, 385–396.

Mauthe, M., Jacob, A., Freiburger, S., Hentschel, K., Stierhof, Y.-D., Codogno, P., and Proikas-Cezanne, T. (2011). Resveratrol-mediated autophagy requires WIPI-1-regulated LC3 lipidation in the absence of induced phagophore formation. *Autophagy* 7, 1448–1461.

Mayer, C., Zhao, J., Yuan, X., and Grummt, I. (2004). mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. *Genes Dev.* 18, 423–434.

Maynadié, M., Angelis, R.D., Marcos-Gragera, R., Visser, O., Allemani, C., Tereanu, C., Capocaccia, R., Giacomin, A., Lutz, J.-M., Martos, C., et al. (2013). Survival of European patients diagnosed with myeloid malignancies: a HAEMACARE study. *Haematologica* 98, 230–238.

Mazure, N.M., and Pouyssegur, J. (2009). Atypical BH3-domains of BNIP3 and BNIP3L lead to autophagy in hypoxia. *Autophagy* 5, 868–869.

McCullough, K.D., Martindale, J.L., Klotz, L.O., Aw, T.Y., and Holbrook, N.J. (2001). Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1249–1259.

Meacham, C.E., and Morrison, S.J. (2013). Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature* 501, 328–337.

Mihaylova, M.M., Vasquez, D.S., Ravnskjaer, K., Denechaud, P.-D., Yu, R.T., Alvarez, J.G., Downes, M., Evans, R.M., Montminy, M., and Shaw, R.J. (2011a). Class IIa Histone Deacetylases are Hormone-activated regulators of FOXO and Mammalian Glucose Homeostasis. *Cell* 145, 607–621.

Mihaylova, M.M., Vasquez, D.S., Ravnskjaer, K., Denechaud, P.-D., Yu, R.T., Alvarez, J.G., Downes, M., Evans, R.M., Montminy, M., and Shaw, R.J. (2011b). Class IIa histone deacetylases are hormone-activated regulators of FOXO and mammalian glucose homeostasis. *Cell* 145, 607–621.

Momcilovic, M., Hong, S.-P., and Carlson, M. (2006). Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro. *J. Biol. Chem.* 281, 25336–25343.

Nahimana, A., Attinger, A., Aubry, D., Greaney, P., Ireson, C., Thougard, A.V., Tjørnelund, J., Dawson, K.M., Dupuis, M., and Duchosal, M.A. (2009). The NAD biosynthesis inhibitor APO866 has potent antitumor activity against hematologic malignancies. *Blood* 113, 3276–3286.

Nakada, D., Saunders, T.L., and Morrison, S.J. (2010). Lkb1 regulates cell cycle and energy metabolism in haematopoietic stem cells. *Nature* 468, 653–658.

Nakamura, T., Furuhashi, M., Li, P., Cao, H., Tuncman, G., Sonenberg, N., Gorgun, C.Z., and Hotamisligil, G.S. (2010). Double-stranded RNA-dependent protein kinase links pathogen sensing with stress and metabolic homeostasis. *Cell* 140, 338–348.

Namiki, T., Tanemura, A., Valencia, J.C., Coelho, S.G., Passeron, T., Kawaguchi, M., Vieira, W.D., Ishikawa, M., Nishijima, W., Izumo, T., et al. (2011). AMP kinase-related kinase

- NUAK2 affects tumor growth, migration, and clinical outcome of human melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 6597–6602.
- Nardo, A.D., Kramvis, I., Cho, N., Sadowski, A., Meikle, L., Kwiatkowski, D.J., and Sahin, M. (2009). Tuberous Sclerosis Complex Activity Is Required to Control Neuronal Stress Responses in an mTOR-Dependent Manner. *J. Neurosci.* *29*, 5926–5937.
- Nishida, Y., Arakawa, S., Fujitani, K., Yamaguchi, H., Mizuta, T., Kanaseki, T., Komatsu, M., Otsu, K., Tsujimoto, Y., and Shimizu, S. (2009). Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature* *461*, 654–658.
- Noda, T., and Ohsumi, Y. (1998). Tor, a Phosphatidylinositol Kinase Homologue, Controls Autophagy in Yeast. *J. Biol. Chem.* *273*, 3963–3966.
- Oakhill, J.S., Chen, Z.-P., Scott, J.W., Steel, R., Castelli, L.A., Ling, N., Macaulay, S.L., and Kemp, B.E. (2010).  $\beta$ -Subunit myristoylation is the gatekeeper for initiating metabolic stress sensing by AMP-activated protein kinase (AMPK). *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- Oakhill, J.S., Steel, R., Chen, Z.-P., Scott, J.W., Ling, N., Tam, S., and Kemp, B.E. (2011). AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase. *Science* *332*, 1433–1435.
- Obeng, E.A., Carlson, L.M., Gutman, D.M., Harrington, W.J., Lee, K.P., and Boise, L.H. (2006). Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood* *107*, 4907–4916.
- Ohoka, N., Yoshii, S., Hattori, T., Onozaki, K., and Hayashi, H. (2005). TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *EMBO J.* *24*, 1243–1255.
- Ouyang, J., Parakhia, R.A., and Ochs, R.S. (2011). Metformin activates AMP kinase through inhibition of AMP deaminase. *J. Biol. Chem.* *286*, 1–11.
- Owen, M.R., Doran, E., and Halestrap, A.P. (2000). Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem. J.* *348 Pt 3*, 607–614.
- Ozcan, U., Ozcan, L., Yilmaz, E., Düvel, K., Sahin, M., Manning, B.D., and Hotamisligil, G.S. (2008). Loss of the tuberous sclerosis complex tumor suppressors triggers the unfolded protein response to regulate insulin signaling and apoptosis. *Mol. Cell* *29*, 541–551.
- Pabst, C., Krosch, J., Fares, I., Boucher, G., Ruel, R., Marinier, A., Lemieux, S., Hébert, J., and Sauvageau, G. (2014). Identification of small molecules that support human leukemia stem cell activity ex vivo. *Nat. Methods* *11*, 436–442.
- Park, S., Chapuis, N., Bardet, V., Tamburini, J., Gallay, N., Willems, L., Knight, Z.A., Shokat, K.M., Azar, N., Viguié, F., et al. (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., and Bouscary, D. (2010). Role of the PI3K/AKT and mTOR signaling pathways in acute myeloid leukemia. *Haematologica* *95*, 819–828.

- Park, S., Chapuis, N., Saint Marcoux, F., Recher, C., Prebet, T., Chevallier, P., Cahn, J.-Y., Leguay, T., Bories, P., Witz, F., et al. (2013). A phase Ib GOELAMS study of the mTOR inhibitor RAD001 in association with chemotherapy for AML patients in first relapse. *Leukemia* 27, 1479–1486.
- Patel, J.P., Gönen, M., Figueroa, M.E., Fernandez, H., Sun, Z., Racevskis, J., Van Vlierberghe, P., Dolgalev, I., Thomas, S., Aminova, O., et al. (2012a). Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 366, 1079–1089.
- Patel, K., Foretz, M., Marion, A., Campbell, D.G., Gourlay, R., Boudaba, N., Tournier, E., Titchenell, P., Peggie, M., Deak, M., et al. (2014). The LKB1-salt-inducible kinase pathway functions as a key gluconeogenic suppressor in the liver. *Nat. Commun.* 5, 4535.
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X.H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M.D., and Levine, B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122, 927–939.
- Bar-Peled, L., Schweitzer, L.D., Zoncu, R., and Sabatini, D.M. (2012). Ragulator is a GEF for the rag GTPases that signal amino acid levels to mTORC1. *Cell* 150, 1196–1208.
- Bar-Peled, L., Chantranupong, L., Cherniack, A.D., Chen, W.W., Ottina, K.A., Grabiner, B.C., Spear, E.D., Carter, S.L., Meyerson, M., and Sabatini, D.M. (2013). A Tumor suppressor complex with GAP activity for the Rag GTPases that signal amino acid sufficiency to mTORC1. *Science* 340, 1100–1106.
- Pelengaris, S., Littlewood, T., Khan, M., Elia, G., and Evan, G. (1999). Reversible activation of c-Myc in skin: induction of a complex neoplastic phenotype by a single oncogenic lesion. *Mol. Cell* 3, 565–577.
- Pelengaris, S., Khan, M., and Evan, G.I. (2002). Suppression of Myc-induced apoptosis in beta cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression. *Cell* 109, 321–334.
- 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., et al. (2011). mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell* 146, 408–420.
- Porstmann, T., Santos, C.R., Griffiths, B., Cully, M., Wu, M., Levers, S., Griffiths, J.R., Chung, Y.-L., and Schulze, A. (2008). SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell Metab.* 8, 224–236.
- Pulte, D., Gondos, A., and Brenner, H. (2008). Improvements in survival of adults diagnosed with acute myeloblastic leukemia in the early 21st century. *Haematologica* 93, 594–600.
- Puthalakath, H., O'Reilly, L.A., Gunn, P., Lee, L., Kelly, P.N., Huntington, N.D., Hughes, P.D., Michalak, E.M., McKimm-Breschkin, J., Motoyama, N., et al. (2007). ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* 129, 1337–1349.
- Qu, X., Yu, J., Bhagat, G., Furuya, N., Hibshoosh, H., Troxel, A., Rosen, J., Eskelinen, E.-L., Mizushima, N., Ohsumi, Y., et al. (2003). Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J. Clin. Invest.* 112, 1809–1820.

- Quentin, T., Steinmetz, M., Poppe, A., and Thoms, S. (2012). Metformin differentially activates ER stress signaling pathways without inducing apoptosis. *Dis. Model. Mech.* 5, 259–269.
- Quintana, E., Shackleton, M., Sabel, M.S., Fullen, D.R., Johnson, T.M., and Morrison, S.J. (2008). Efficient tumor formation by single human melanoma cells. *Nature* 456, 593–598.
- Raaijmakers, M.H.G.P., Mukherjee, S., Guo, S., Zhang, S., Kobayashi, T., Schoonmaker, J.A., Ebert, B.L., Al-Shahrour, F., Hasserjian, R.P., Scadden, E.O., et al. (2010). Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature* 464, 852–857.
- Rafie-Kolpin, M., Chefalo, P.J., Hussain, Z., Hahn, J., Uma, S., Matts, R.L., and Chen, J.-J. (2000). Two Heme-binding Domains of Heme-regulated Eukaryotic Initiation Factor-2 $\alpha$  Kinase N TERMINUS AND KINASE INSERTION. *J. Biol. Chem.* 275, 5171–5178.
- Rahmani, M., Davis, E.M., Crabtree, T.R., Habibi, J.R., Nguyen, T.K., Dent, P., and Grant, S. (2007). The Kinase Inhibitor Sorafenib Induces Cell Death through a Process Involving Induction of Endoplasmic Reticulum Stress. *Mol. Cell. Biol.* 27, 5499–5513.
- Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A., and Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* 8, 2281–2308.
- Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z., Davies, J.E., Luo, S., Oroz, L.G., Scaravilli, F., Easton, D.F., Duden, R., O’Kane, C.J., et al. (2004). Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat. Genet.* 36, 585–595.
- Ravikumar, B., Acevedo-Arozena, A., Imarisio, S., Berger, Z., Vacher, C., O’Kane, C.J., Brown, S.D.M., and Rubinsztein, D.C. (2005). Dynein mutations impair autophagic clearance of aggregate-prone proteins. *Nat. Genet.* 37, 771–776.
- Récher, C., Beyne-Rauzy, O., Demur, C., Chicanne, G., Dos Santos, C., Mas, V.M.-D., Benzaquen, D., Laurent, G., Huguet, F., and Payrastre, B. (2005). Antileukemic activity of rapamycin in acute myeloid leukemia. *Blood* 105, 2527–2534.
- Reimold, A.M., Iwakoshi, N.N., Manis, J., Vallabhajosyula, P., Szomolanyi-Tsuda, E., Gravalles, E.M., Friend, D., Grusby, M.J., Alt, F., and Glimcher, L.H. (2001). Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature* 412, 300–307.
- Ritchie, D.S., Neeson, P.J., Khot, A., Peinert, S., Tai, T., Tainton, K., Chen, K., Shin, M., Wall, D.M., Hönemann, D., et al. (2013). Persistence and Efficacy of Second Generation CAR T Cell Against the LeY Antigen in Acute Myeloid Leukemia. *Mol. Ther.* 21, 2122–2129.
- Robitaille, A.M., Christen, S., Shimobayashi, M., Cornu, M., Fava, L.L., Moes, S., Prescianotto-Baschong, C., Sauer, U., Jenoe, P., and Hall, M.N. (2013). Quantitative phosphoproteomics reveal mTORC1 activates de novo pyrimidine synthesis. *Science* 339, 1320–1323.
- Rohle, D., Popovici-Muller, J., Palaskas, N., Turcan, S., Grommes, C., Campos, C., Tsoi, J., Clark, O., Oldrini, B., Komisopoulou, E., et al. (2013). An inhibitor of mutant IDH1 delays growth and promotes differentiation of glioma cells. *Science* 340, 626–630.

Rosati, E., Sabatini, R., Rampino, G., De Falco, F., Di Ianni, M., Falzetti, F., Fettucciari, K., Bartoli, A., Screpanti, I., and Marconi, P. (2010). Novel targets for endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in B-CLL. *Blood* *116*, 2713–2723.

Rosilio, C., Lounnas, N., Nebout, M., Imbert, V., Hagenbeek, T., Spits, H., Asnafi, V., Pontier-Bres, R., Reverso, J., Michiels, J.-F., et al. (2013). The metabolic perturbators metformin, phenformin and AICAR interfere with the growth and survival of murine PTEN-deficient T cell lymphomas and human T-ALL/T-LL cancer cells. *Cancer Lett.* *336*, 114–126.

Rouschop, K.M.A., van den Beucken, T., Dubois, L., Niessen, H., Bussink, J., Savelkoul, K., Keulers, T., Mujcic, H., Landuyt, W., Voncken, J.W., et al. (2010). The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5. *J. Clin. Invest.* *120*, 127–141.

Roux, P.P., Ballif, B.A., Anjum, R., Gygi, S.P., and 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.

Sabatini, D.M., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Tempst, P., and Snyder, S.H. (1994). RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* *78*, 35–43.

Ben Sahra, I., Regazzetti, C., Robert, G., Laurent, K., Le Marchand-Brustel, Y., Auberger, P., Tanti, J.-F., Giorgetti-Peraldi, S., and Bost, F. (2011). Metformin, independent of AMPK, induces mTOR inhibition and cell-cycle arrest through REDD1. *Cancer Res.* *71*, 4366–4372.

Ben-Sahra, I., Howell, J.J., Asara, J.M., and Manning, B.D. (2013). Stimulation of de novo pyrimidine synthesis by growth signaling through mTOR and S6K1. *Science* *339*, 1323–1328.

Sancak, Y., Peterson, T.R., Shaul, Y.D., Lindquist, R.A., Thoreen, C.C., Bar-Peled, L., and Sabatini, D.M. (2008). The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* *320*, 1496–1501.

Sancak, Y., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Markhard, A.L., Nada, S., and 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.

Sanchez-Cespedes, M., Parrella, P., Esteller, M., Nomoto, S., Trink, B., Engles, J.M., Westra, W.H., Herman, J.G., and Sidransky, D. (2002). Inactivation of LKB1/STK11 is a common event in adenocarcinomas of the lung. *Cancer Res.* *62*, 3659–3662.

Sanders, M.J., Ali, Z.S., Hegarty, B.D., Heath, R., Snowden, M.A., and Carling, D. (2007). Defining the mechanism of activation of AMP-activated protein kinase by the small molecule A-769662, a member of the thienopyridone family. *J. Biol. Chem.* *282*, 32539–32548.

Sant, M., Minicozzi, P., Mounier, M., Anderson, L.A., Brenner, H., Holleccek, B., Marcos-Gragera, R., Maynadié, M., Monnereau, A., Osca-Gelis, G., et al. (2014). Survival for haematological malignancies in Europe between 1997 and 2008 by region and age: results of EURO CARE-5, a population-based study. *Lancet Oncol.*

Dos Santos, C., Demur, C., Bardet, V., Prade-Houdellier, N., Payrastré, B., and Récher, C.

(2008). A critical role for Lyn in acute myeloid leukemia. *Blood* *111*, 2269–2279.

Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* *307*, 1098–1101.

Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Sengupta, S., Sheen, J.-H., Hsu, P.P., Bagley, A.F., Markhard, A.L., and Sabatini, D.M. (2006). Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol. Cell* *22*, 159–168.

Sarry, J.-E., Murphy, K., Perry, R., Sanchez, P.V., Secretò, A., Keefer, C., Swider, C.R., Strzelecki, A.-C., Cavellier, C., Récher, C., et al. (2011). Human acute myelogenous leukemia stem cells are rare and heterogeneous when assayed in NOD/SCID/IL2R $\gamma$ -deficient mice. *J. Clin. Invest.* *121*, 384–395.

Scarlatti, F., Maffei, R., Beau, I., Codogno, P., and Ghidoni, R. (2008). Role of non-canonical Beclin 1-independent autophagy in cell death induced by resveratrol in human breast cancer cells. *Cell Death Differ.* *15*, 1318–1329.

Schlenk, R.F., Döhner, K., Krauter, J., Fröhling, S., Corbacioglu, A., Bullinger, L., Habdank, M., Späth, D., Morgan, M., Benner, A., et al. (2008). Mutations and Treatment Outcome in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* *358*, 1909–1918.

Scotland, S., Saland, E., Skuli, N., de Toni, F., Boutzen, H., Micklow, E., Sénégas, I., Peyraud, R., Peyriga, L., Théodoro, F., et al. (2013). Mitochondrial energetic and AKT status mediate metabolic effects and apoptosis of metformin in human leukemic cells. *Leukemia* *27*, 2129–2138.

Scott, J.W., van Denderen, B.J.W., Jorgensen, S.B., Honeyman, J.E., Steinberg, G.R., Oakhill, J.S., Iseli, T.J., Koay, A., Gooley, P.R., Stapleton, D., et al. (2008). Thienopyridone drugs are selective activators of AMP-activated protein kinase beta1-containing complexes. *Chem. Biol.* *15*, 1220–1230.

Scott, J.W., Ling, N., Issa, S.M.A., Dite, T.A., O'Brien, M.T., Chen, Z.-P., Galic, S., Langendorf, C.G., Steinberg, G.R., Kemp, B.E., et al. (2014). Small molecule drug A-769662 and AMP synergistically activate naive AMPK independent of upstream kinase signaling. *Chem. Biol.* *21*, 619–627.

Shackelford, D.B., Abt, E., Gerken, L., Vasquez, D.S., Seki, A., Leblanc, M., Wei, L., Fishbein, M.C., Czernin, J., Mischel, P.S., et al. (2013). LKB1 Inactivation Dictates Therapeutic Response of Non-Small Cell Lung Cancer to the Metabolism Drug Phenformin. *Cancer Cell*.

Shalem, O., Sanjana, N.E., Hartenian, E., Shi, X., Scott, D.A., Mikkelsen, T.S., Heckl, D., Ebert, B.L., Root, D.E., Doench, J.G., et al. (2014). Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells. *Science* *343*, 84–87.

Shaw, R.J., Kosmatka, M., Bardeesy, N., Hurley, R.L., Witters, L.A., DePinho, R.A., and Cantley, L.C. (2004). The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 3329–3335.

Shaw, R.J., Lamia, K.A., Vasquez, D., Koo, S.-H., Bardeesy, N., Depinho, R.A., Montminy,

- M., and Cantley, L.C. (2005). The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* *310*, 1642–1646.
- Shen, H.-M., and Codogno, P. (2011). Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species? *Autophagy* *7*, 457–465.
- Shen, Y., Zhu, Y.-M., Fan, X., Shi, J.-Y., Wang, Q.-R., Yan, X.-J., Gu, Z.-H., Wang, Y.-Y., Chen, B., Jiang, C.-L., et al. (2011). Gene mutation patterns and their prognostic impact in a cohort of 1185 patients with acute myeloid leukemia. *Blood* *118*, 5593–5603.
- Shi, W.-Y., Xiao, D., Wang, L., Dong, L.-H., Yan, Z.-X., Shen, Z.-X., Chen, S.-J., Chen, Y., and Zhao, W.-L. (2012). Therapeutic metformin/AMPK activation blocked lymphoma cell growth via inhibition of mTOR pathway and induction of autophagy. *Cell Death Dis.* *3*, e275.
- Shlush, L.I., Zandi, S., Mitchell, A., Chen, W.C., Brandwein, J.M., Gupta, V., Kennedy, J.A., Schimmer, A.D., Schuh, A.C., Yee, K.W., et al. (2014). Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature* *506*, 328–333.
- Shuda, M., Kondoh, N., Imazeki, N., Tanaka, K., Okada, T., Mori, K., Hada, A., Arai, M., Wakatsuki, T., Matsubara, O., et al. (2003). Activation of the ATF6, XBP1 and grp78 genes in human hepatocellular carcinoma: a possible involvement of the ER stress pathway in hepatocarcinogenesis. *J. Hepatol.* *38*, 605–614.
- Solimini, N.L., Luo, J., and Elledge, S.J. (2007). Non-oncogene addiction and the stress phenotype of cancer cells. *Cell* *130*, 986–988.
- Sujobert, P., Bardet, V., Cornillet-Lefebvre, P., Hayflick, J.S., Prie, N., Verdier, F., Vanhaesebroeck, B., Muller, O., Pesce, F., Ifrah, N., et al. (2005). Essential role for the p110delta isoform in phosphoinositide 3-kinase activation and cell proliferation in acute myeloid leukemia. *Blood* *106*, 1063–1066.
- Sun, Q., Chen, X., Ma, J., Peng, H., Wang, F., Zha, X., Wang, Y., Jing, Y., Yang, H., Chen, R., et al. (2011). Mammalian target of rapamycin up-regulation of pyruvate kinase isoenzyme type M2 is critical for aerobic glycolysis and tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 4129–4134.
- Sun, X., Gao, L., Chien, H.-Y., Li, W.-C., and Zhao, J. (2013). The Regulation and Function of the NUA/K Family. *J. Mol. Endocrinol.* *JME* – 13–0063.
- Suter, M., Riek, U., Tuerk, R., Schlattner, U., Wallimann, T., and Neumann, D. (2006). Dissecting the Role of 5'-AMP for Allosteric Stimulation, Activation, and Deactivation of AMP-activated Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* *281*, 32207–32216.
- Tallóczy, Z., Jiang, W., Virgin, H.W., Leib, D.A., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Eskelinen, E.-L., and Levine, B. (2002). Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2 $\alpha$  kinase signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 190–195.
- Tamburini, J., Chapuis, N., Bardet, V., Park, S., Sujobert, P., Willems, L., Ifrah, N., Dreyfus, F., Mayeux, P., Lacombe, C., et al. (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., Green, A.S., Bardet, V., Chapuis, N., Park, S., Willems, L., Uzunov, M., Ifrah, N., Dreyfus, F., Lacombe, C., et al. (2009). Protein synthesis is resistant to rapamycin and constitutes a promising therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Blood* *114*, 1618–1627.

Taussig, D.C., Miraki-Moud, F., Anjos-Afonso, F., Pearce, D.J., Allen, K., Ridler, C., Lillington, D., Oakervee, H., Cavenagh, J., Agrawal, S.G., et al. (2008). Anti-CD38 antibody-mediated clearance of human repopulating cells masks the heterogeneity of leukemia-initiating cells. *Blood* *112*, 568–575.

Terai, K., Hiramoto, Y., Masaki, M., Sugiyama, S., Kuroda, T., Hori, M., Kawase, I., and Hirota, H. (2005). AMP-Activated Protein Kinase Protects Cardiomyocytes against Hypoxic Injury through Attenuation of Endoplasmic Reticulum Stress. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 9554–9575.

Teske, B.F., Wek, S.A., Bunpo, P., Cundiff, J.K., McClintick, J.N., Anthony, T.G., and Wek, R.C. (2011). The eIF2 kinase PERK and the integrated stress response facilitate activation of ATF6 during endoplasmic reticulum stress. *Mol. Biol. Cell* *22*, 4390–4405.

The Cancer Genome Atlas Research Network, Weinstein, J.N., Collisson, E.A., Mills, G.B., Shaw, K.R.M., Ozenberger, B.A., Ellrott, K., Shmulevich, I., Sander, C., and Stuart, J.M. (2013). The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nat. Genet.* *45*, 1113–1120.

Thedieck, K., Holzwarth, B., Prentzell, M.T., Boehlke, C., Kläsener, K., Ruf, S., Sonntag, A.G., Maerz, L., Grellscheid, S.-N., Kremmer, E., et al. (2013). Inhibition of mTORC1 by Astrin and Stress Granules Prevents Apoptosis in Cancer Cells. *Cell* *154*, 859–874.

Thériault, J.R., Palmer, H.J., and Pittman, D.D. (2011). Inhibition of the Unfolded Protein Response by metformin in renal proximal tubular epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *409*, 500–505.

Thomas, F., Fisher, D., Fort, P., Marie, J.-P., Daoust, S., Roche, B., Grunau, C., Cosseau, C., Mitta, G., Baghdiguian, S., et al. (2013). Applying ecological and evolutionary theory to cancer: a long and winding road. *Evol. Appl.* *6*, 1–10.

Thoreen, C.C., Kang, S.A., Chang, J.W., Liu, Q., Zhang, J., Gao, Y., Reichling, L.J., Sim, T., Sabatini, D.M., and Gray, N.S. (2009). An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *J. Biol. Chem.* *284*, 8023–8032.

Thoreen, C.C., Chantranupong, L., Keys, H.R., Wang, T., Gray, N.S., and Sabatini, D.M. (2012). A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature* *485*, 109–113.

Timmins, J.M., Ozcan, L., Seimon, T.A., Li, G., Malagelada, C., Backs, J., Backs, T., Bassel-Duby, R., Olson, E.N., Anderson, M.E., et al. (2009). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II links ER stress with Fas and mitochondrial apoptosis pathways. *J. Clin. Invest.* *119*, 2925–2941.

Tong, A.H.Y., Lesage, G., Bader, G.D., Ding, H., Xu, H., Xin, X., Young, J., Berriz, G.F., Brost, R.L., Chang, M., et al. (2004). Global Mapping of the Yeast Genetic Interaction Network. *Science* *303*, 808–813.

Troussard, X., Duchenet, V., Cornet, E., Mouchel, D., Malet, M., and Collignon, A. (2009).

- Hematological malignancies: Incidence in Basse-Normandie, France, for 1997–2004. *Rev. D'Épidémiologie Santé Publique* 57, e17–e24.
- Vakana, E., Altman, J.K., Glaser, H., Donato, N.J., and Plataniias, L.C. (2011). Antileukemic effects of AMPK activators on BCR-ABL–expressing cells. *Blood* 118, 6399–6402.
- Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 1029–1033.
- Vardiman, J.W., Thiele, J., Arber, D.A., Brunning, R.D., Borowitz, M.J., Porwit, A., Harris, N.L., Le Beau, M.M., Hellström-Lindberg, E., Tefferi, A., et al. (2009). The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 114, 937–951.
- Vattem, K.M., and Wek, R.C. (2004). Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 11269–11274.
- Vincent, M.F., Marangos, P.J., Gruber, H.E., and Berghe, G. van den (1991). Inhibition by AICA Riboside of Gluconeogenesis in Isolated Rat Hepatocytes. *Diabetes* 40, 1259–1266.
- Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Preisinger, A.C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A.M., and Bos, J.L. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med.* 319, 525–532.
- Walter, P., and Ron, D. (2011). The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. *Science* 334, 1081–1086.
- Wang, F., Travins, J., DeLaBarre, B., Penard-Lacronique, V., Schalm, S., Hansen, E., Straley, K., Kernytsky, A., Liu, W., Gliser, C., et al. (2013). Targeted inhibition of mutant IDH2 in leukemia cells induces cellular differentiation. *Science* 340, 622–626.
- Wang, X., Li, W., Williams, M., Terada, N., Alessi, D.R., and Proud, C.G. (2001). Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *EMBO J.* 20, 4370–4379.
- Wang, Y., Alam, G.N., Ning, Y., Visioli, F., Dong, Z., Nör, J.E., and Polverini, P.J. (2012). The unfolded protein response induces the angiogenic switch in human tumor cells through the PERK/ATF4 pathway. *Cancer Res.* 72, 5396–5406.
- Warburg, O., Wind, F., and Negelein, E. (1927). THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *J. Gen. Physiol.* 8, 519–530.
- Warden, S.M., Richardson, C., O'Donnell, J., Stapleton, D., Kemp, B.E., and Witters, L.A. (2001). Post-translational modifications of the beta-1 subunit of AMP-activated protein kinase affect enzyme activity and cellular localization. *Biochem. J.* 354, 275–283.
- Wei, Y., Pattingre, S., Sinha, S., Bassik, M., and Levine, B. (2008). JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol. Cell* 30, 678–688.
- Weinberg, R.A. (2014). Coming full circle—from endless complexity to simplicity and back again. *Cell* 157, 267–271.
- Weinstein, I.B. (2002). Cancer. Addiction to oncogenes—the Achilles heel of cancer. *Science*

Welch, J.S., Ley, T.J., Link, D.C., Miller, C.A., Larson, D.E., Koboldt, D.C., Wartman, L.D., Lamprecht, T.L., Liu, F., Xia, J., et al. (2012). The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell* *150*, 264–278.

White, E. (2012). Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 401–410.

Whitney, M.L., Jefferson, L.S., and Kimball, S.R. (2009). ATF4 is necessary and sufficient for ER stress-induced upregulation of REDD1 expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *379*, 451–455.

Willems, L., Chapuis, N., Puissant, A., Maciel, T.T., Green, A.S., Jacque, N., Vignon, C., Park, S., Guichard, S., Herault, O., et al. (2012). The dual mTORC1 and mTORC2 inhibitor AZD8055 has anti-tumor activity in acute myeloid leukemia. *Leukemia* *26*, 1195–1202.

Willems, L., Jacque, N., Jacquet, A., Neveux, N., Maciel, T.T., Lambert, M., Schmitt, A., Poulain, L., Green, A.S., Uzunov, M., et al. (2013). Inhibiting glutamine uptake represents an attractive new strategy for treating acute myeloid leukemia. *Blood* *122*, 3521–3532.

Williams, B.R.G. (2001). Signal Integration via PKR. *Sci. Signal.* *2001*, re2–re2.

Wingo, S.N., Gallardo, T.D., Akbay, E.A., Liang, M.-C., Contreras, C.M., Boren, T., Shimamura, T., Miller, D.S., Sharpless, N.E., Bardeesy, N., et al. (2009). Somatic LKB1 mutations promote cervical cancer progression. *PLoS One* *4*, e5137.

Wolff, N.C., Vega-Rubin-de-Celis, S., Xie, X.-J., Castrillon, D.H., Kabbani, W., and Brugarolas, J. (2011). Cell-type-dependent regulation of mTORC1 by REDD1 and the tumor suppressors TSC1/TSC2 and LKB1 in response to hypoxia. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 1870–1884.

Woods, A., Johnstone, S.R., Dickerson, K., Leiper, F.C., Fryer, L.G.D., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M., and Carling, D. (2003). LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr. Biol.* *CB 13*, 2004–2008.

Xiao, B., Heath, R., Saiu, P., Leiper, F.C., Leone, P., Jing, C., Walker, P.A., Haire, L., Eccleston, J.F., Davis, C.T., et al. (2007). Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. *Nature* *449*, 496–500.

Xiao, B., Sanders, M.J., Underwood, E., Heath, R., Mayer, F.V., Carmena, D., Jing, C., Walker, P.A., Eccleston, J.F., Haire, L.F., et al. (2011). Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature* *472*, 230–233.

Xiao, B., Sanders, M.J., Carmena, D., Bright, N.J., Haire, L.F., Underwood, E., Patel, B.R., Heath, R.B., Walker, P.A., Hallen, S., et al. (2013). Structural basis of AMPK regulation by small molecule activators. *Nat. Commun.* *4*.

Xu, Q., Simpson, S.-E., Scialla, T.J., Bagg, A., and Carroll, M. (2003). Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation. *Blood* *102*, 972–980.

Xu, Q., Thompson, J.E., and Carroll, M. (2005). mTOR regulates cell survival after etoposide treatment in primary AML cells. *Blood* *106*, 4261–4268.

- Yamaguchi, Y., Larkin, D., Lara-Lemus, R., Ramos-Castaneda, J., Liu, M., and Arvan, P. (2008). Endoplasmic Reticulum (ER) Chaperone Regulation and Survival of Cells Compensating for Deficiency in the ER Stress Response Kinase, PERK. *J. Biol. Chem.* *283*, 17020–17029.
- Yamamoto, H., Kakuta, S., Watanabe, T.M., Kitamura, A., Sekito, T., Kondo-Kakuta, C., Ichikawa, R., Kinjo, M., and Ohsumi, Y. (2012). Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. *J. Cell Biol.* *198*, 219–233.
- Yamazaki, H., Hiramatsu, N., Hayakawa, K., Tagawa, Y., Okamura, M., Ogata, R., Huang, T., Nakajima, S., Yao, J., Paton, A.W., et al. (2009). Activation of the Akt-NF- $\kappa$ B Pathway by Subtilase Cytotoxin through the ATF6 Branch of the Unfolded Protein Response. *J. Immunol.* jimmunol.0900017.
- Yang, Z., and Klionsky, D.J. (2010). Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* *22*, 124–131.
- Yang, L., Sha, H., Davisson, R.L., and Qi, L. (2013). Phenformin activates the unfolded protein response in an AMP-activated protein kinase (AMPK)-dependent manner. *J. Biol. Chem.* *288*, 13631–13638.
- Yang, R., Wek, S.A., and Wek, R.C. (2000). Glucose Limitation Induces GCN4 Translation by Activation of Gcn2 Protein Kinase. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 2706–2717.
- Yang, W., Zheng, Y., Xia, Y., Ji, H., Chen, X., Guo, F., Lyssiotis, C.A., Aldape, K., Cantley, L.C., and Lu, Z. (2012). ERK1/2-dependent phosphorylation and nuclear translocation of PKM2 promotes the Warburg effect. *Nat. Cell Biol.* *14*, 1295–1304.
- Ye, J., Kumanova, M., Hart, L.S., Sloane, K., Zhang, H., De Panis, D.N., Bobrovnikova-Marjon, E., Diehl, J.A., Ron, D., and 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.
- Yeung, J., Esposito, M.T., Gandillet, A., Zeisig, B.B., Griessinger, E., Bonnet, D., and So, C.W.E. (2010).  $\beta$ -Catenin mediates the establishment and drug resistance of MLL leukemic stem cells. *Cancer Cell* *18*, 606–618.
- Yilmaz, Ö.H., Valdez, R., Theisen, B.K., Guo, W., Ferguson, D.O., Wu, H., and Morrison, S.J. (2006). Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells. *Nature* *441*, 475–482.
- Yip, C.K., Murata, K., Walz, T., Sabatini, D.M., and Kang, S.A. (2010). Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition. *Mol. Cell* *38*, 768–774.
- Young, R.M., Ackerman, D., Quinn, Z.L., Mancuso, A., Gruber, M., Liu, L., Giannoukos, D.N., Bobrovnikova-Marjon, E., Diehl, J.A., Keith, B., et al. (2013). Dysregulated mTORC1 renders cells critically dependent on desaturated lipids for survival under tumor-like stress. *Genes Dev.* *27*, 1115–1131.
- Yu, Z., Zhao, X., Huang, L., Zhang, T., Yang, F., Xie, L., Song, S., Miao, P., Zhao, L., Sun, X., et al. (2013). Proviral insertion in murine lymphomas 2 (PIM2) oncogene phosphorylates

pyruvate kinase M2 (PKM2) and promotes glycolysis in cancer cells. *J. Biol. Chem.* *288*, 35406–35416.

Zalcvar, E., Berissi, H., Mizrachy, L., Idelchuk, Y., Koren, I., Eisenstein, M., Sabanay, H., Pinkas-Kramarski, R., and Kimchi, A. (2009). DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy. *EMBO Rep.* *10*, 285–292.

Zeng, X., and Kinsella, T.J. (2008). Mammalian target of rapamycin and S6 kinase 1 positively regulate 6-thioguanine-induced autophagy. *Cancer Res.* *68*, 2384–2390.

Zeng, N., Li, Y., He, L., Xu, X., Galicia, V., Deng, C., and Stiles, B.L. (2011). Adaptive basal phosphorylation of eIF2 $\alpha$  is responsible for resistance to cellular stress-induced cell death in Pten-null hepatocytes. *Mol. Cancer Res. MCR* *9*, 1708–1717.

Zeqiraj, E., Filippi, B.M., Deak, M., Alessi, D.R., and Aalten, D.M.F. van (2009). Structure of the LKB1-STRAD-MO25 Complex Reveals an Allosteric Mechanism of Kinase Activation. *Science* *326*, 1707–1711.

Zhang, C.-S., Jiang, B., Li, M., Zhu, M., Peng, Y., Zhang, Y.-L., Wu, Y.-Q., Li, T.Y., Liang, Y., Lu, Z., et al. The Lysosomal v-ATPase-Ragulator Complex Is a Common Activator for AMPK and mTORC1, Acting as a Switch between Catabolism and Anabolism. *Cell Metab.*

Zhang, Y.-L., Guo, H., Zhang, C.-S., Lin, S.-Y., Yin, Z., Peng, Y., Luo, H., Shi, Y., Lian, G., Zhang, C., et al. (2013). AMP as a low-energy charge signal autonomously initiates assembly of AXIN-AMPK-LKB1 complex for AMPK activation. *Cell Metab.* *18*, 546–555.

Zhou, D., Palam, L.R., Jiang, L., Narasimhan, J., Staschke, K.A., and Wek, R.C. (2008). Phosphorylation of eIF2 directs ATF5 translational control in response to diverse stress conditions. *J. Biol. Chem.* *283*, 7064–7073.

Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X., Batchvarova, N., Lightfoot, R.T., Remotti, H., Stevens, J.L., and Ron, D. (1998). CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* *12*, 982–995.

Zinzalla, V., Stracka, D., Oppliger, W., and Hall, M.N. (2011). Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell* *144*, 757–768.

Zode, G.S., Kuehn, M.H., Nishimura, D.Y., Searby, C.C., Mohan, K., Grozdanic, S.D., Bugge, K., Anderson, M.G., Clark, A.F., Stone, E.M., et al. (2011). Reduction of ER stress via a chemical chaperone prevents disease phenotypes in a mouse model of primary open angle glaucoma. *J. Clin. Invest.* *121*, 3542–3553.

Zoncu, R., Bar-Peled, L., Efeyan, A., Wang, S., Sancak, Y., and Sabatini, D.M. (2011). mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase. *Science* *334*, 678–683.

## TABLE DES MATIERES

RESUME.....	4
ABSTRACT .....	5
SOMMAIRE .....	6
TABLE DES ILLUSTRATIONS .....	7
TABLE DES ABBREVIATIONS .....	8
INTRODUCTION.....	13
<b>LES LEUCEMIES AIGUËS MYELOIDES : DONNEES PHYSIOPATHOLOGIQUES .....</b>	<b>15</b>
<b>Aspects cliniques .....</b>	<b>15</b>
Epidémiologie .....	15
Classifications et éléments du pronostic.....	17
Aspects thérapeutiques .....	21
<b>Physiopathologie .....</b>	<b>22</b>
Modèle à deux classes de mutations.....	22
Cellules souches leucémiques.....	23
Architecture clonale.....	26
Relations avec le microenvironnement.....	27
Cellules souches préleucémiques.....	27
Quel modèle pour la physiopathologie des LAM en 2014 ? .....	28
<b>Dérégulation métabolique et dérégulation des voies de signalisation dans les leucémies : perspectives thérapeutiques.....</b>	<b>29</b>
Signalisation et métabolisme : deux modes de description de la cellule tumorale ?.....	29
L'effet Warburg et la voie PI3K : exemple des LAM .....	31
Modèle d'addiction oncogénique / hypersensibilité aux gènes suppresseurs de tumeur .....	34
Addiction non oncogénique / modèle de létalité synthétique.....	35
<b>LES VOIES mTORC1, AMPK ET LA VOIE DE REPONSE INTEGREE AU STRESS : INTEGRATEURS DU METABOLISME CELLULAIRE .....</b>	<b>38</b>
<b>La voie mTORC1 .....</b>	<b>39</b>
Description des complexes mTORC1 et mTORC2 .....	39
Régulation et conséquences de l'activation de mTORC1 .....	42
Régulation par les facteurs de croissance.....	42
Régulation par les conditions métaboliques.....	43
Disponibilité en acides aminés .....	43
Disponibilité en glucose.....	45
Niveau énergétique.....	45
Concentration en oxygène.....	47
Stress oxydatif.....	47
Conséquences de l'activation de mTORC1.....	47
Métabolisme protidique .....	49
Métabolisme lipidique.....	51
Métabolisme glucidique.....	51
Métabolisme nucléotidique.....	52
Inhibition de l'autophagie.....	52
<b>Inhibition pharmacologique de mTORC1 .....</b>	<b>52</b>
Rapamycine.....	52
Inhibiteurs catalytiques .....	53
<b>mTORC1 et LAM .....</b>	<b>54</b>

<b>La voie AMPK.....</b>	<b>56</b>
<b>Structure du complexe AMPK.....</b>	<b>56</b>
<b>Mécanismes d'activation d'AMPK.....</b>	<b>57</b>
Activation par les nucléotides à adénine.....	57
Activation par les kinases LKB1 et CaMKK $\beta$ .....	60
LKB1.....	60
CaMKK $\beta$ .....	62
Activation pharmacologique.....	62
Biguanides.....	62
Resveratrol.....	63
AICAR.....	63
Composé 13.....	64
A769662.....	64
Salicylate.....	64
<b>Conséquences de l'activation d'AMPK.....</b>	<b>67</b>
Régulation du métabolisme.....	68
Régulation de la biosynthèse mitochondriale.....	69
Régulation de l'autophagie.....	69
Régulation du cycle cellulaire.....	69
Régulation de la polarité cellulaire.....	70
<b>AMPK et cancer.....</b>	<b>72</b>
Rôle suppresseur de tumeur d'AMPK.....	72
Rôle oncogénique d'AMPK.....	72
Activation d'AMPK dans les hémopathies malignes.....	73
<b>La voie de réponse intégrée au stress.....</b>	<b>75</b>
<b>Activation de la voie.....</b>	<b>75</b>
EIF2AK1 : HRI.....	77
EIF2AK2 : PKR.....	77
EIF2AK3 : PERK.....	77
EIF2AK4 : GCN2.....	79
<b>Conséquences de l'activation de la voie ISR.....</b>	<b>79</b>
Contrôle de la traduction par eIF2A.....	79
Modèle de retard à la réinitiation.....	80
Modèle de contournement (bypass).....	82
Conséquences de l'induction d'ATF4/CHOP.....	84
<b>Voie ISR et cancer.....</b>	<b>85</b>
Rôle oncogénique de la voie ISR.....	85
Rôle suppresseur de tumeur de la voie ISR : une cible thérapeutique ?.....	86
<b>Relations entre les voies mTORC1, AMPK ET ISR.....</b>	<b>87</b>
<b>mTORC1 et ISR.....</b>	<b>87</b>
Contrôle du niveau de la voie ISR par mTORC1.....	87
Contrôle de mTORC1 par la voie ISR.....	88
<b>mTORC1 et AMPK.....</b>	<b>89</b>
<b>AMPK et ISR.....</b>	<b>89</b>
Activation de la voie ISR en aval d'AMPK.....	89
Inhibition de la voie ISR en aval d'AMPK.....	90
<b>L'autophagie.....</b>	<b>92</b>
<b>Description moléculaire.....</b>	<b>92</b>
<b>Régulation de l'autophagie par les voies mTORC1, AMPK et ISR.....</b>	<b>97</b>
Inhibition de l'autophagie par mTORC1.....	97
Induction de l'autophagie par AMPK.....	97
Induction de l'autophagie par la voie ISR.....	98
<b>Autophagie et cancer.....</b>	<b>99</b>
Rôle suppresseur de tumeur de l'autophagie.....	99
Rôle oncogénique de l'autophagie.....	99

<b>OBJECTIFS DE LA THESE</b> .....	<b>101</b>
<b>RESULTATS</b> .....	<b>102</b>
Première partie : article soumis .....	103
Deuxième partie : activation directe de PERK par AMPK.....	146
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>151</b>
Effets antileucémiques de l'activation d'AMPK.....	151
Activation de la voie de réponse intégrée au stress (ISR) par AMPK .....	152
mTORC1 et LAM : nouvelles perspectives thérapeutiques .....	154
Développement clinique.....	156
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>158</b>
<b>TABLE DES MATIERES</b> .....	<b>186</b>

## RÉSUMÉ

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) représentent un groupe d'hémopathies malignes agressives, de pronostic sombre en dépit des traitements intensifs actuellement proposés. Malgré une grande hétérogénéité clinique et moléculaire, les cellules de LAM sont caractérisées par l'activation de voies de signalisation essentielles à leur prolifération et leur survie, comme par exemple celle du complexe mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1). Cependant, l'utilisation clinique d'inhibiteurs tels que la rapamycine ou des inhibiteurs catalytiques s'est avérée décevante, ce qui suggère qu'il n'y a pas d'addiction oncogénique à mTORC1 dans les LAM. Au cours de ce travail, nous avons démontré que l'activation de mTORC1 est au contraire une condition nécessaire à l'induction de la mort cellulaire en réponse à l'activation d'AMPK (AMP-activated protein kinase), établissant une relation de létalité synthétique entre ces deux voies.

Pour cela, nous avons utilisé un nouveau composé activateur spécifique d'AMPK, le GSK621. En invalidant la sous-unité catalytique AMPK $\alpha$ 1 par ARN interférence ou par le système CRISPR/Cas9, nous avons démontré que les effets antileucémiques de ce composé sont bien dépendants de l'activation d'AMPK. Nous avons observé que ce composé favorise l'autophagie, et que ce processus est impliqué dans la mort des cellules leucémiques puisque l'inhibition des protéines ATG5 ou ATG7 a un effet protecteur sur les cellules leucémiques. Les effets antileucémiques du composé GSK621 ont été confirmés sur des cellules primaires, ainsi que sur un panel de vingt lignées de LAM, et dans un modèle murin de xénogreffe. De façon intéressante, l'activation d'AMPK pourrait également compromettre la survie des cellules souches leucémiques, comme en atteste l'atténuation du potentiel clonogénique en méthylcellulose de cellules murines transformées par MLL-ENL ou FLT3-ITD.

Nous avons observé que le composé GSK 621 n'avait pas de toxicité envers les progéniteurs hématopoïétiques normaux, ouvrant ainsi une fenêtre thérapeutique intéressante. Comme l'activation d'AMPK conduit dans de nombreux modèles cellulaires à l'inhibition de mTORC1, et comme l'activation de mTORC1 est observée dans les cellules de LAM mais pas dans les progéniteurs hématopoïétiques normaux, nous avons proposé l'hypothèse que le niveau d'activation de mTORC1 déterminait les effets de l'activateur d'AMPK. Pour cela, nous avons inhibé mTORC1 dans les cellules leucémiques d'une part, et activé mTORC1 dans les progéniteurs normaux d'autre part. De façon inattendue, mTORC1 échappe au contrôle d'AMPK dans les LAM, et nous avons observé que l'activation de mTORC1 est une condition nécessaire et suffisante pour que le composé GSK621 entraîne la mort des cellules. Le substrat moléculaire de cette létalité synthétique est le facteur de transcription proapoptotique ATF4, dont la transcription est favorisée par mTORC1, et la traduction par AMPK via la phosphorylation d'eIF2A.

Ces travaux proposent donc que malgré l'absence d'addiction oncogénique, l'activation de mTORC1 dans les LAM représente une opportunité thérapeutique originale via une relation de létalité synthétique avec l'activation d'AMPK. Ils constituent un rationnel au développement clinique d'activateurs d'AMPK dans les LAM, voire dans d'autres cancers ayant une activation constitutive de mTORC1.