

Université Paris Descartes

Ecole doctorale : Hématologie, Oncogénèse et Biothérapies (HOB)

*Equipe « Etude de l'hématopoïèse normale et pathologique »
Codirigée par les Drs Patrick Mayeux et Didier Bouscary
Département Développement, Reproduction et Cancer,
Institut Cochin, INSERM U1016, Paris*

Etude du métabolisme de la glutamine dans les leucémies aiguës myéloïdes

Nathalie JACQUE

Thèse de doctorat de Biologie Médicale
Spécialité Hématologie

Dirigée par le Pr Didier Bouscary

Présentée et soutenue publiquement le 5 Mars 2015

Devant un jury composé de :

Dr RASLOVA Hana

Présidente

Pr QUESNEL Bruno

Rapporteur

Dr YVAN-CHARVET Laurent

Rapporteur

Dr SARRY Jean-Emmanuel

Examineur

Dr BOUILLAUD Frédéric

Examineur

Résumé :

La survie des cellules cancéreuses dépend d'une activité énergétique et biosynthétique accrue et la glutamine participe à de nombreux processus nécessaires à cette adaptation métabolique. Dans les leucémies aigues myéloïdes (LAM), la croissance et la prolifération sont favorisées par l'activation anormale de plusieurs voies de signalisation, et notamment par la voie mTORC1. Les acides aminés essentiels, et en particulier la leucine, sont indispensables à l'activation de mTORC1. La glutamine est captée par la cellule via le transporteur SLC1A5 et permet ensuite l'entrée de la leucine via le transporteur bidirectionnel SLC7A5. La concentration en glutamine est donc une étape limitante dans l'activation de mTORC1 par la leucine. Nous avons étudié les effets de la privation en glutamine dans les LAM à l'aide de différents outils (milieu sans glutamine, shARN inhibant l'expression du transporteur de la glutamine SLC1A5 et la drogue L-asparaginase, qui a une activité de glutaminase extracellulaire), et observé une inhibition de mTORC1 et de la synthèse protéique. L'inhibition du transporteur SLC1A5 inhibe la pousse tumorale dans un modèle de xénotransplantation. La L-asparaginase inhibe mTORC1 et induit une apoptose de façon proportionnelle à son activité glutaminase et complètement indépendante de la concentration en asparagine. La privation en glutamine induit l'expression de la glutamine synthase et l'autophagie, et ces deux processus peuvent être des mécanismes de résistance intrinsèques ou acquis dans certaines lignées leucémiques. L'apoptose induite par la privation en glutamine n'est cependant pas liée à l'inhibition de mTORC1, puisqu'elle n'est pas diminuée par l'utilisation d'un mutant de mTOR non inhibé par la privation en glutamine. Nous nous sommes donc intéressés à une autre voie dépendante de la glutamine dans de nombreux cancers, la phosphorylation oxydative. L'étape initiale du catabolisme intracellulaire de la glutamine est la conversion de la glutamine en glutamate par des enzymes appelées glutaminases. Différentes isoformes des glutaminases existent qui sont codées chez l'homme par les gènes *GLS1* et *GLS2*. Le glutamate est ensuite transformé en α -cétoglutarate, intermédiaire du cycle TCA. Dans les lignées de LAM, la privation en glutamine inhibe la phosphorylation oxydative mitochondriale. Nous avons observé que la protéine glutaminase C (GAC), une des isoformes de *GLS1*, est constamment exprimée dans les LAM mais aussi dans les progéniteurs hématopoïétiques CD34+ normaux. L'inhibition d'expression de la *GLS1* par des shARN inductibles ou bien par le composé CB-839 réduit la phosphorylation oxydative, conduisant à une inhibition de prolifération et à une induction d'apoptose des cellules leucémiques. L'inactivation génétique de la *GLS1* inhibe la formation de tumeur et améliore la survie des souris dans un modèle de xénotransplantation. A l'inverse, le ciblage de la *GLS1* n'a pas d'effets cytotoxiques ni cytostatiques sur les progéniteurs hématopoïétiques normaux. Ces effets anti-leucémiques sont inhibés par l'adjonction d' α -cétoglutarate, et ceux induit par le CB-839 sont abrogés lorsqu'est exprimé de façon ectopique un mutant GAC^{K320A} hyperactif, attestant du rôle essentiel du maintien d'un cycle TCA actif dans les cellules de LAM. Enfin, nous

montrons que l'inhibition de la glutaminolyse active la voie d'apoptose mitochondriale intrinsèque et agit en synergie avec l'inhibition spécifique de BCL-2 par l'ABT-199. Ces résultats démontrent que le ciblage spécifique de la glutaminolyse est une autre façon d'exploiter l'addiction à la glutamine des cellules leucémiques de LAM et que le maintien d'un cycle TCA actif est essentiel à la survie de ces cellules.

Mots clés :

LAM, mTORC1, glutamine, SLC1A5, L-asparaginase, cycle TCA, glutaminolyse, GAC, CB-839

Abstract:

Cancer cells survival is dependent on high energetic and biosynthetic activity, and glutamine is involved in many metabolic processes necessary for this adaptation. In acute myeloid leukemia (AML), growth and proliferation are promoted by activation of several signaling pathways, including mTORC1. Essential amino acids, in particular leucine, are required for mTORC1 activation. Glutamine enters into the cell via the SLC1A5 transporter and then allows the input of leucine via the bidirectional SLC7A5 transporter. Therefore, the intracellular glutamine concentration is a limiting step in the activation of mTORC1 by leucine. We studied the effects of glutamine deprivation in AML using different tools (medium without glutamine, shRNA against the SLC1A5 glutamine transporter and the drug L-asparaginase, which has an extracellular glutaminase activity) and observed mTORC1 and protein synthesis inhibition. SLC1A5 transporter knockdown inhibits tumor growth in a xenotransplantation model. L-asparaginase inhibits mTORC1 and induces apoptosis in proportion to its glutaminase activity and independently of asparagine concentration. Glutamine privation induces the expression of glutamine synthase and autophagy, and these two processes are involved in the resistance to glutamine privation in some leukemic cell lines. However, apoptosis induced by glutamine privation is not related to the inhibition of mTORC1, since it is not modified in the presence of a constitutively active mutant of mTOR. We next focused on the oxidative phosphorylation, another glutamine dependent pathway in many cancers. The initial step of the intracellular catabolism of glutamine is the conversion of glutamine to glutamate by enzymes called glutaminases. Different glutaminases isoforms exist that are encoded by the *GLS1* and *GLS2* genes. Glutamate is then converted to α -ketoglutarate, an essential TCA cycle intermediate. In AML cell lines, we observed that glutamine privation inhibits mitochondrial oxidative phosphorylation. The protein glutaminase C (GAC), an isoform of *GLS1*, is constantly expressed in AML but also in normal CD34 + hematopoietic progenitors. The knockdown of *GLS1* by inducible shRNA or by the CB-839 compound reduced oxidative phosphorylation, leading to proliferation inhibition and apoptosis induction in leukemia cells. Genetic invalidation of *GLS1* inhibits tumor formation and improves survival of mice in a xenograft model. Conversely, the targeting of *GLS1* has no cytotoxic or cytostatic effects on normal hematopoietic progenitors. These anti-leukemic effects are inhibited by the addition of α -ketoglutarate, and those induced by the CB-839 are suppressed in the presence of an ectopically expressed GAC^{K320A} hyperactive mutant, confirming the essential role of maintaining an active TCA cycle in AML cells. Finally, we showed that glutaminolysis inhibition induces the intrinsic mitochondrial pathway of apoptosis and acts synergistically with the specific inhibition of BCL-2 by ABT-199. These results demonstrate that specific targeting of glutaminolysis is another way to exploit glutamine addiction in AML and that an active TCA cycle is essential for AML cell survival.

Key words:

AML, mTORC1, glutamine, SLC1A5, L-asparaginase, TCA cycle, glutaminolysis, GAC, CB-839

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir évalué mon travail de thèse :

Le docteur Hana Raslova, merci de présider ce jury de thèse

Les docteurs Laurent Yvan-Charvet et Bruno Quesnel, merci d'avoir accepté le rôle de rapporteur et d'avoir pris le temps d'évaluer mon travail

Les docteurs Frédéric Bouillaud et Jean-Emmanuel Sarry, merci d'avoir accepté d'être examinateurs.

Un grand merci à mon directeur de thèse Didier Bouscary. Merci de m'avoir accueillie en Master 2 puis en Thèse, et de m'avoir proposé ce sujet. J'ai beaucoup appris (et progressé je crois !) pendant ces années grâce à ton encadrement. Merci pour la confiance et l'autonomie que tu m'as données sur ce projet si intéressant.

Merci également à Patrick Mayeux et Catherine Lacombe de m'avoir accueillie dans leur équipe. Je suis arrivée pour mon Master 2 en cours d'internat il y a maintenant presque 6 ans et je ne pensais pas alors poursuivre dans la recherche... Je pense que la qualité de l'encadrement, la compétence de tous et la bonne humeur qui règne au 7ème m'ont convaincue de rester quelques années de plus... Merci à tous car c'est une équipe formidable ! Je tiens à remercier particulièrement Frédérique Verdier et Mireille Lambert pour leur écoute et leur patience (je vous ai beaucoup sollicitées et vous avez toujours été disponibles pour mes nombreuses questions !). Merci également à Yaël, Lamyra, Ségolène et tous les post-doctorants, doctorants, et étudiants qui se sont succédés au labo pendant ces dernières années.

Je remercie également les membres de l'équipe voisine d'Isabelle Dusanter, en particulier Evelyne, Frédéric et Audrey.

Merci à l'équipe « LAM » :

Jérôme pour les discussions scientifiques toujours enrichissantes et pour m'avoir proposé de venir en Master 2 dans l'équipe,

Pierre avec qui j'ai passé ces 3 années de thèse, je te souhaite beaucoup de bonheur à Lyon !

Alexa qui m'a appris le rudiment des manips à mon arrivée en Master 2,

Les piliers du labo de cyto : Nicolas, Valérie, et Stéphanie, pour leur disponibilité et leur gentillesse,

Les étudiants en M2 des 3 dernières années : Sylvain, Laure, Adrien et surtout Anne-Marie, ça a été un plaisir de travailler avec vous tous !

Et puis il y a celles qui sont devenues des amies très chères et qui m'ont donné le courage et l'envie pendant ces 3 années :

Lise, tu m'as tout appris lorsque je suis arrivée en Master 2, avec le calme olympien qui te caractérise ! Et ce n'était pas facile, le temps que je comprenne la masse molaire... ! J'ai appris à réfléchir à tes cotés et tu as beaucoup participé à ma décision de poursuivre en thèse. Merci !!!

Anna et Célia, nos petite et grande sous unités de la « ribo-team »! Merci pour votre bonne humeur, pour les verres à l'acad, pour les gâteaux bretons ! Célia, je te souhaite de trouver le bonheur quelle que soit la prochaine carrière que te choisiras, tu es une scientifique remarquable et la recherche perd beaucoup si elle te perd... Anna, je suis très heureuse d'avoir eu la chance de te connaître grâce au labo, et je sais que ce n'est que le début d'une belle amitié...

Marie-Anne, on a appris à se connaître un peu plus que dans les diners d'internes, et j'avoue que c'est une des plus belles choses que m'a apporté la thèse ! Difficile de dire plus, sinon je vais pleurer... Je vous souhaite beaucoup de bonheur dans votre nouvelle vie à 3 !

Et enfin Laury, ma Lolo !!! Je t'ai connue toute petite (« comme ça ») et timide à ton arrivée, et je t'ai vu grandir, grandir... Tu as des capacités que tu n'imaginais pas et c'était génial de te voir progresser d'année en année. Merci aussi pour les fous rires grâce à tes perles (qui seront révélées au grand jour quand viendra ton tour... !). Tu es comme une petite sœur pour moi tu le sais...

Pour finir, je voudrais remercier mes parents pour leur présence à mes côtés malgré de très (trop ?) longues études... Vous êtes les meilleurs !

Et enfin, merci à Jean-Philippe, mon amour, pour ton soutien de chaque instant.

Table des matières

Liste des abréviations	12
Liste des illustrations	16

INTRODUCTION..... 17

1. Généralités sur les leucémies aiguës myéloïdes..... 17

1.1. Epidémiologie	17
1.2. Physiopathologie	18
1.2.1. Anomalies génétiques.....	18
1.2.2. La cellule souche leucémique.....	20
1.2.3. La cellule souche pré-leucémique	21
1.3. Classification et pronostic	23
1.4. Traitement	25

2. Métabolisme et cancer..... 27

2.1. Reprogrammation métabolique des cancers.....	27
2.1.1. L'effet Warburg.....	27
2.1.2. La glycolyse.....	29
a) Régulation du flux glycolytique dans les cancers	29
b) La voie des pentoses phosphates	30
c) La voie de biosynthèse de la sérine	31
d) La dégradation du pyruvate	32
2.1.3. Le cycle TCA	33
2.1.4. Métabolisme du citrate et lipogenèse	33
2.1.5. Glutaminolyse.....	34
2.2. Mutations de gènes impliqués dans le métabolisme.....	35
2.2.1. Mutations de la succinate déshydrogénase	35
2.2.2. Mutations de la fumarate hydratase.....	36
2.2.3. Mutations des isocitrates déshydrogénases	36
a) Mutations IDH et cancers.....	36

b) Mutants IDH et oncogenèse	37
c) Mécanismes d'action des mutants d'IDH.....	38
i. Les altérations épigénétiques.....	38
ii. L'effet sur HIF1 α et les prolyl hydroxylases.....	38
iii. Autres hypothèses.....	38
2.2.4. SIRT6	39
2.3. Ciblage du métabolisme des cancers	39
2.3.1. Ciblage du métabolisme du glucose	39
a) Premières étapes du métabolisme du glucose.....	39
b) Métabolisme du pyruvate	40
c) Métabolisme du lactate.....	40
2.3.2. Ciblage du métabolisme lipidique	41
2.3.3. Ciblage de la glutaminolyse	41
2.3.4. Les inhibiteurs spécifiques d'IDH1/2.....	41
3. Glutamine et cancer	42
3.1. Métabolisme de la glutamine.....	42
3.1.1. Schéma général.....	42
3.1.2. Transport de la glutamine	43
a) Le transporteur SLC1A5	43
b) Les autres transporteurs de la glutamine	44
3.1.3. Synthèse de la glutamine : la glutamine synthétase.....	44
3.2. Rôle de la glutamine dans la synthèse protéique	45
3.2.1. Synthèse des AANE	45
3.2.2. Régulation du complexe mTORC1	45
a) Le complexe mTORC1 : généralités	45
i. Régulation	46
ii. Cibles et fonctions	47
iii. Régulation de mTORC1 en aval des AA.....	48
iv. Régulation de mTORC1 par la glutamine	50
c) Rôle de mTORC1 dans les LAM	51
3.3. La glutaminolyse	52
3.3.1. Utilisation des produits de la glutaminolyse.....	52
a) Voie des hexosamines	52
b) Synthèse des acides nucléiques	52
c) Lutte contre le stress oxydatif par le glutathion	53
d) Cycle TCA.....	53

3.3.2. Les glutaminases.....	53
a) La KGA (ou GLS1, gène <i>GLS</i>)	53
i. Structure	53
ii. Fonction.....	55
iii. Expression tissulaire normale et tumorale.....	55
iv. Régulation	56
b) La LGA (ou GLS2, gène <i>GLS2</i>).....	57
3.4. Métabolisme de la glutamine dans les cancers	58
3.4.1. Utilisation de la glutamine par les cellules cancéreuses	58
3.4.2. Régulation du métabolisme de la glutamine.....	59
a) MYC.....	59
b) KRAS	60
c) PI3K/AKT et mTORC1.....	61
d) Régulation par des suppresseurs de tumeurs	61
i. Famille p53.....	61
ii. Protéine du rétinoblastome (Rb).....	61
3.4.3. Ciblage thérapeutique du métabolisme de la glutamine	62
a) Inhibition des transporteurs membranaires.....	63
i. Import de glutamine	63
ii. Co-transport glutamine/leucine	63
b) La L-asparaginase.....	64
c) Inhibition de la glutaminolyse	65
i. Inhibiteurs biochimiques	65
ii. Effet antitumoral de l'inhibition de la GLS1	66
4. Métabolisme des LAM.....	68
4.1. Métabolisme des cellules souches hématopoïétiques	68
4.2. Métabolisme des LAM.....	69
RESULTATS	71
PARTIE I: Etude de l'implication de la Gln dans l'activation de mTORC1 dans les LAM	71
PARTIE II: Etude de la glutaminolyse dans les LAM	73
CONCLUSIONS et PERSPECTIVES	101
BIBLIOGRAPHIE	106

Annexe 1. Inhibiting glutamine uptake represents an attractive new strategy to treating AML: Figures supplémentaires.....	130
Annexe 2. Editorial Blood: Asparaginase unveils glutamine-addicted AML.....	130
Annexe 3. Targeting glutamine uptake in AML: Editorial Oncoscience.....	131
Annexe 4. Targeting glutaminolysis has anti-leukemic activity in AML and synergizes with BCL-2 inhibition: Figures supplémentaires	131

Liste des abréviations

α KG : alpha-cétoglutarate
ACC : acétyl-CoA carboxylase
ACLY : ATP citrate lyase
AA: acides aminés
AANE: acides aminés (non) essentiels
Akt: PKB, protein kinase B
ALAT : alanine aminotransférase
ALDH : aldéhyde désydrégénase
AMPK: Adenosine monophosphate-activated protein kinase
ARNm: acide ribonucléique messenger
ASAT: aspartate aminotransférase
ASN: asparagine
ASNS: asparagine synthase
ASXL1: Additional sex combs like 1
ATP: adenosine tri-phosphate
BCL-2: B-cell lymphoma 2
CD: cluster of differentiation
CLL1: molecule 1 analogue a la lectine type C
CSH: cellules souches hématopoiétiques
Cycle TCA: cycle des acides tricarboxyliques
DEPTOR: DEP domain containing mammalian target of rapamycin (mTOR)-interacting protein
DNMT3A: DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A
eIF2 α : eukaryotic translation initiation factor 2 α
eIF4E: eukaryotic initiation factor 4E
ERK: extracellular signal-regulated kinase
FH: fumarate hydratase
FLT3-ITD: Fms like tyrosine kinase 3- Internal Tandem Duplication
FOXO: forkhead box class O
GA: glutaminase
GAC: glutaminase C
GAP: guanine triphosphate GTPase activating protein
GCSF: granulocyte colony stimulating factor
GDH: glutamate deshydrogénase

GLN: glutamine
GLS1/2: glutaminase 1/2
GLU: glutamate
GLUL: glutamate ammonia ligase
GLUT: glucose transporter
GS: glutamine synthase
GSH: glutathion
GSK3: glycogen synthase kinase-3
GTP: guanine triphosphate
G6P: glucose 6 phosphate
G6PDH: glucose 6 phosphate déshydrogénase
HK: hexokinase
HIF-1: hypoxia inducible factor
HSP70: heat shock protein 70kda
IDH: isocitrate deshydrogénase
IGF1: insulin growth factor 1
JHDM: Jumonji-C histone déméthylase
kDa: kiloDalton
KGA: kidney type GA
KO: knockout
LAM: leucémie aiguë myéloïde
LAL : leucémie aiguë lymphoblastique
L-ase : L-asparaginase
LDH : lactate déshydrogénase
LGA: liver type GA
MAPK: mitogen activated protein kinase
MCT: monocarboxylate transporter
mLST8: mammalian lethal with SEC13 protein 8
mTOR: mechanistic target of rapamycin
MLL: mixed-lineage leukemia
NADH : nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF- κ B: Nuclear factor κ B
NOD/SCID: Non-obese diabetic
NPM1: nucleophosmin 1
NRF2: nuclear factor (erythroid derived 2) like 2
OAA: oxaloacétate

PC: pyruvate carboxylase
PDH: pyruvate déshydrogénase
PDK1: PDH kinase 1
PFK: phospho-fructokinase
PH: pleckstrin homology
PIKK: phosphatidylinositol-3-kinase related kinase
PI3K: phosphatidylinositol-3-kinase
PKC- α : protein kinase C- α
PKM2: pyruvate kinase isoforme 2
PML-RAR: promyelocytic leukemia gene-retinoic acid receptor-alpha
PRAS40: proline-rich Akt substrate of 40-kDa
Protor: protein observed with Rictor
PTEN: phosphatase and tensin homologue
p27kip1: cyclin-dependant kinase inhibitor p27
P70S6K: p70 ribosomal S6 kinase
(R)-2HG: (R)-2-hydroxyglutare
Raptor : regulatory associated protein of mTOR
RBL2: Retinoblastoma-like 2
Rheb: small G protein Ras homologue enriched in brain
Rho GTPase: Ras homolog gene family GTPase
Rictor: rapamycine insensitive companion of mTOR
ROS: espèces réactives de l'oxygène
rpS6: ribosomal protein S6
RTK: récepteur tyrosine kinase
SCID: Severe combined immunodeficiency
Ser: serine
SDH: succinate déshydrogénase
SGK: serum-and glucocorticoid-induced protein kinase 1
shARN: small hairpin ARN
siARN: small interference ARN
SIN1: SAPK interacting protein
SLC1A5: Solute carrier family 1 member 5
SLC7A5: Solute carrier family 7 member 5
SNAT: Sodium-coupled neutral amino acid transporter
SREBP: sterol regulatory element-binding protein
STAT: signal transducer and activator of transcription
S6K1: p70 ribosomal S6 kinase

TET: Ten-Eleven-Translocation

Thr: thréonine

TSC2: tuberous sclerosis complex (tuberin)

WT1: Wilms' tumor suppressor

2DG: 2-déoxyglucose-phosphate

4E-BP1: eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1

Liste des illustrations

Figure 1. Incidence par âge des leucémies aiguës myéloïdes en 2012.....	17
Figure 2. Schéma général des grandes voies métaboliques.....	28
Figure 3. Régulation de la glycolyse dans les cancers.	30
Figure 4. Voie des pentoses phosphates.	31
Figure 5. Voie de biosynthèse de la sérine..	32
Figure 6. Métabolisme du citrate.....	34
Figure 7. Cycle TCA et chaîne respiratoire : principales enzymes mutées dans les cancers.	35
Figure 8. Schéma général du métabolisme de la glutamine..	42
Figure 9. La voie mTORC1.....	46
Figure 10. Régulation de mTORC1 par les AA.	49
Figure 11. Structures des 3 isoformes de la glutaminase 1.	54
Figure 12. Régulation du métabolisme de la glutamine.	62
Figure 13. Métabolisme des CSH.....	69
Tableau 1. Classification génétique des LAM	19
Tableau 2. Classification OMS 2008 des LAM	23
Tableau 3. Stratification pronostique des LAM.	24
Tableau 4. Classification pronostique révisée suggérée par Patel et al.	25
Tableau 5. Effet antitumoral des inhibiteurs de GLS1.	67

INTRODUCTION

1. Généralités sur les leucémies aiguës myéloïdes

1.1. Epidémiologie

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sont des hémopathies malignes rares qui constituent 1 à 2% des cancers de l'adulte. Selon les registres français des cancers, les LAM représentent 8.3% des hémopathies malignes, et 28.4% des hémopathies myéloïdes. En France en 2012, 2800 nouveaux cas de LAM ont été diagnostiqués, soit un taux d'incidence brut de 4.5 pour 100.000 chez l'homme et 4.3 pour 100.000 chez la femme. L'incidence de ces maladies augmente avec l'âge, puisqu'elle est de 1.8/100.000 avant 65 ans et 17.5/100.000 après 65 ans (Howlader, 2013). L'âge médian au diagnostic en France est actuellement de 71 ans ; le sexe ratio moyen est à 1.1, avec une incidence supérieure chez l'homme après 65 ans (Figure 1).

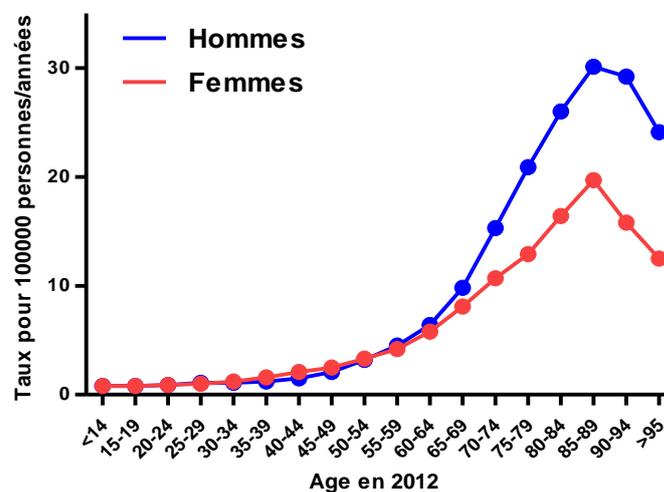


Figure 1. Incidence par âge des leucémies aiguës myéloïdes en 2012. Selon l'Estimation nationale de l'incidence des cancers en France entre 1980 et 2012

La majorité des cas de LAM est sporadique, mais la présence d'anomalies congénitales peut augmenter le risque de développer la maladie (syndrome de Fanconi, neutropénies congénitales, trisomie 21...). Les facteurs de risque principaux sont l'existence antérieure d'une autre hémopathie acquise (syndrome myéloprolifératif, syndrome myélodysplasique, hémoglobinurie paroxystique nocturne...) et/ou les traitements par radiothérapie et chimiothérapies par inhibiteurs des topoisomérases II ou agents alkylants. La proportion de ces leucémies dites « secondaires » augmente avec l'âge, pour atteindre 30 à 40% des cas de LAM après 60 ans (Juliusson et al., 2012).

L'amélioration de la prise en charge de ces maladies a permis d'améliorer la survie globale des patients: de moins de 10% avant 1980, la survie à 5 ans est actuellement de 25.8% tous âges confondus. Le pronostic des patients âgés de plus de 65 ans reste cependant très sombre, puisque la survie à 5 ans dans cette tranche d'âge n'est que de 5.6%, contre 42.8% pour les moins de 65 ans (Howlader, 2013).

1.2. Physiopathologie

Les LAM sont définies par la prolifération anormale et non contrôlée de cellules progénitrices myéloïdes bloquées dans leur différenciation. Ce processus entraîne un envahissement médullaire et/ou sanguin par ces cellules blastiques, venant perturber l'hématopoïèse normale et conduisant à des cytopénies, souvent révélatrices de la maladie.

1.2.1. Anomalies génétiques

Les LAM résultent de l'accumulation de plusieurs mutations somatiques acquises au sein d'un progéniteur hématopoïétique. Ces mutations sont de mieux en mieux décrites grâce aux techniques modernes de séquençage et leur identification a permis de mieux comprendre la pathogénèse des LAM. Le modèle initial décrit par Gilliland proposait un modèle de leucémogénèse basé sur deux types d'évènements séquentiels (« two-hit model ») regroupant les mutations identifiées à cette époque (Tableau 1) (Gilliland and Tallman, 2002). Les mutations de classe I, en activant des voies de signalisation, confèrent l'avantage de prolifération et de croissance ; il s'agit par exemple des mutations de FLT3, N-RAS, KIT ou de la fusion BCR-ABL. Les mutations de classe II, touchant des facteurs de transcription (PML-RAR α , AML1-ETO, fusion du gène MLL...), conduisent au blocage de différenciation. Dans ce modèle, les mutations de classe II sont nécessaires mais insuffisantes pour induire une leucémie et sont considérées comme des lésions initiatrices alors que celles de classe I apparaissent plus tardivement dans la leucémogénèse et sont coopérantes. Bien que les mutations identifiées depuis ne correspondent pas toujours à ces classes, elles produisent schématiquement les mêmes effets. Plus récemment, l'identification de mutations de gènes impliqués dans l'épigénétique

(TET2 (Ten Eleven Translocation 2), DNMT3A (DNA méthyl transférase), IDH1/2 (isocitrate déshydrogénase)...) a conduit à créer une troisième classe, mais cette classification a été récemment dépassée par la découverte d'autres anomalies grâce au séquençage du génome de patients atteints de LAM.

Le « Cancer Genome Atlas » est un projet ayant conduit au séquençage du génome et/ou de l'exome de 12 types de cancers différents, dont 200 cas de LAM (Kandoth et al., 2013). Avec environ 2600 mutations retrouvées au sein des régions codantes, les LAM présentent la plus faible fréquence de mutations (0.8 mutations par Mb contre 1 à 8/Mb pour les autres types de tumeurs), soit en moyenne 13 mutations par patient, dont 5 mutations récurrentes (Cancer Genome Atlas Research Network, 2013). Au total, 23 gènes ont été retrouvés comme étant mutés de façon significative dans les LAM. Les auteurs proposent une nouvelle classification en 9 groupes fonctionnels, dans lesquels s'intègre la quasi-totalité des patients (99.5% d'entre eux présentent au moins une de ces mutations) (Tableau 1).

Analysis	Before 2008	2008–12	From 2013	Prevalence in AML (%)
	Cytogenetic and molecular genetic analysis	Next-generation sequencing approaches	The Cancer Genome Atlas project	
Functional groups	Class I: activated signalling—eg, <i>FLT3</i> , <i>KIT</i> , <i>RAS</i> mutations	Class I: activated signalling—eg, <i>FLT3</i> , <i>KIT</i> , <i>RAS</i> mutations	Class 1: transcription factor fusions—eg, t(8;21), t(16;16), t(15;17), <i>MLL</i> fusions	18%
			Class 2: nucleophosmin 1, <i>NPM1</i> mutations	27%
			Class 3: tumour suppressor genes—eg, <i>TP53</i> , <i>WT1</i> , <i>PHF6</i> mutations	16%
	Class II: transcription and differentiation—eg, t(8;21), t(16;16), t(15;17) <i>CEBPA</i> mutations	Class II: transcription and differentiation—eg, t(8;21), t(16;16), t(15;17), <i>CEBPA</i> , <i>RUNX1</i> mutations	Class 4: DNA-methylation-related genes: DNA hydroxymethylation—eg, <i>TET2</i> , <i>IDH1</i> , <i>IDH2</i> DNA methyltransferases eg, <i>DNMT3A</i>	44%
			Class 5: activated signalling genes—eg, <i>FLT3</i> , <i>KIT</i> , <i>RAS</i> mutations	59%
			Class 6: chromatin-modifying genes, eg, <i>ASXL1</i> , <i>EZH2</i> mutations, <i>MLL</i> fusions, <i>MLL</i> partial tandem duplications	30%
			Class 7: myeloid transcription factor genes—eg, <i>CEBPA</i> , <i>RUNX1</i> mutations	22%
			Class 8: cohesin-complex genes—eg, <i>STAG2</i> , <i>RAD21</i> , <i>SMC1</i> , <i>SMC2</i> mutations	13%
			Class 9: spliceosome-complex genes—eg, <i>SRSF2</i> , <i>U2AF35</i> , <i>ZRSR2</i> mutations	14%
Class III: epigenetic modifiers—eg, <i>TET2</i> , <i>DNMT3A</i> , <i>ASXL1</i> mutations	Class III: epigenetic modifiers—eg, <i>TET2</i> , <i>DNMT3A</i> , <i>ASXL1</i> mutations			

Tableau 1. Classification génétique des LAM. Meyer et Levine, 2014.

En plus de ces mutations touchant un gène bien identifié, un autre type d'anomalie génétique a une place importante dans la leucémogénèse : la perte ou le gain de grande partie de matériel chromosomique, parmi lesquelles la délétion 5q, la monosomie 7 ou les trisomies 8, 11 et 13. Les gènes clés impliqués dans ces anomalies ne sont pas clairement identifiés.

Les modèles murins ont permis de mieux comprendre l'implication des mutations dans la leucémogénèse. Les souris mutées *FLT3*-ITD ont un phénotype de syndrome myéloprolifératif associé

à une diminution du pool de cellules normales capables d'auto-renouveaulement (Chu et al., 2012; Lee et al., 2007). Au contraire, les souris TET2 knockout (KO) présentent une augmentation des capacités d'auto-renouveaulement des cellules souches hématopoïétiques (CSH) (Moran-Crusio et al., 2011; Quivoron et al., 2011). Des études similaires ont montrés que la perte de DNMT3a conduisait à des anomalies de différenciation et à l'expansion des CSH (Challen et al., 2012). Dans la grande majorité des cas, on retrouve plusieurs anomalies ayant des effets fonctionnels différents au sein de la même maladie, ce qui implique la nécessité de plusieurs évènements oncogéniques pour aboutir à la leucémie. Cette hypothèse est confirmée par d'autres modèles murins, dans lesquels une seule mutation ne peut pas conduire à l'émergence d'une LAM (Yuan et al., 2001). Cependant, la combinaison de seulement 2 évènements lorsqu'ils sont très complémentaires peut dans certains cas être suffisante, comme par exemple l'association de la duplication en tandem de FLT3 et la mutation de NPM1 (Mupo et al., 2013).

1.2.2. La cellule souche leucémique

La mise en évidence de l'existence d'une cellule souche cancéreuse a été rapportée pour la première fois grâce des modèles de xénotransplantation de cellules de patients atteints de LAM dans des souris SCID ou NOD/SCID (Bonnet and Dick, 1997; Lapidot et al., 1994). En effet, seules quelques cellules du pool leucémique, caractérisées par un phénotype CD34+CD38-, ont été initialement montrées être capables d'initier et de maintenir l'expansion du clone leucémique in vivo chez la souris. De plus, des transplantations sériées ont montré que ces cellules possédaient des capacités d'auto-renouveaulement identiques à celle des CSH normales. Ces résultats sous-tendent l'hypothèse d'une architecture hiérarchique des LAM, avec des cellules fonctionnellement hétérogènes maintenues par un petit nombre de cellules souches leucémiques, capables d'initier et de maintenir la leucémogénèse. Par ailleurs, Hope et al. ont montré que plusieurs clones de cellules souches leucémiques (CSL) coexistaient, avec des capacités d'auto-renouveaulement plus ou moins importantes (Hope et al., 2004). Le paradigme initial stipulant que la population des CSL était contenue exclusivement dans la sous-population de phénotype CD34+CD38- a été remis en question par d'autres expériences montrant que la sous-population CD34+CD38+ ou les cellules CD34- avaient également des capacités de prise de greffes sériées dans des souris immunodéficientes (Felipe Rico et al., 2013). Cependant, des travaux menés par l'équipe de John Dick ont permis de montrer que la fréquence des CSL est différente selon les sous-populations : CD34+CD38- (93%), CD34+CD38+ (62%), CD34-CD38- (21%) et enfin CD34-CD38+ (8%) (Eppert et al., 2011). De nombreux marqueurs ont été testés pour améliorer l'identification phénotypique et le suivi en maladie résiduelle des CSL, souvent en addition au modèle CD34+CD38-. Ainsi, la positivité du CD123, de CLL1 (molécule 1 analogue à la lectine de type C)

ou l'activité ALDH (aldéhyde déshydrogénase) semblent corrélés avec un caractère souche et un pronostic plus défavorable (Cheung et al., 2007; Jordan et al., 2000; van Rhenen et al., 2007).

La CSL, comme la cellule souche hématopoïétique normale, est une cellule quiescente et probablement plus résistante aux chimiothérapies (Costello et al., 2000; Guan et al., 2003). La richesse en CSL semble avoir un impact pronostique puisqu'il a été montré que la capacité de prise de greffe de cellules issues de patients présentant une LAM de risque intermédiaire dans des souris NOD/SCID était un facteur péjoratif indépendant (Pearce et al., 2006). Un taux élevé (>3.5%) de cellules CD34+CD38- au diagnostic diminue la survie sans rechute de 16 à 5,6 mois (van Rhenen et al., 2005). Enfin, un profil d'expression génique des CSL a été réalisé à partir de 15 patients puis évalué sur plus de 1000 patients inclus dans des protocoles d'études. Une expression génique de type CSL élevée était associée à un moins bon pronostic, indépendamment du caryotype des LAM (Gentles et al., 2010). La même corrélation a été retrouvée par une autre équipe, avec un profil d'expression CSL identique à celui des cellules souches hématopoïétiques normales (Eppert et al., 2011).

Les moyens thérapeutiques visant à cibler les CSL sont multiples et résultent de la découverte de leur fonctionnement biologique. Les CSL sont situées dans la niche hématopoïétique et interagissent avec le microenvironnement médullaire ; le blocage de cette interaction est donc une première possibilité. Par exemple, l'utilisation d'inhibiteur du CXC chemokine receptor-4 (CXCR4) ou le G-CSF qui mobilise les CSH hors de la niche sont en cours d'étude (Felipe Rico et al., 2013). Les CSL sont également dépendantes de plusieurs voies de signalisation et facteurs anti-apoptotiques, comme les voies NFκB, PI3K/AKT/mTOR ou BCL-2. L'utilisation d'un inhibiteur de NFκB, le parthenolide, conduit à la mort des CSL et diminue la prise de greffe dans des souris NOD/SCID, tout en épargnant les CSH normales (Guzman et al., 2005). L'inhibition de mTOR par le temsirolimus potentialise les effets du parthenolide, en inhibant la voie de réponse au stress oxydant via le facteur de transcription NRF2 (nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) (Hassane et al., 2010). Enfin, l'inhibition de BCL-2 par l'ABT-737 a plus d'effet sur la population CD34+CD38-CD123+ que la chimiothérapie, en épargnant les CSH normales (Konopleva et al., 2008).

1.2.3. La cellule souche pré-leucémique

La cellule souche pré-leucémique est la cellule normale dans laquelle l'évènement oncogénique a lieu (appelée aussi cellule d'origine). Cette cellule présente une ou plusieurs anomalies génétiques spécifiques des leucémies mais n'a pas encore acquis l'évènement transformant. La première démonstration de son existence a été la détection du transcrit AML1-ETO au sein des cellules myéloïdes normales des patients en rémission (Miyamoto et al., 1996) ainsi qu'au sein des clones érythroïdes et myéloïdes issus de culture de CSH de ces patients (Yuan et al., 2001). Depuis, plusieurs études ont montré la présence de mutations récurrentes des LAM au sein des cellules

hématopoïétiques normales (Busque et al., 2012; Jan et al., 2012; Shlush et al., 2014). Ces mutations pré-leucémiques incluent des mutations « driver » comme TET2 ou DNMT3A, mais de façon intéressante, pas la mutation FLT3-ITD et ou la mutation de NPM1 qui sont donc des mutations secondaires.

Corces-Zimmerman et al. ont montré que les mutations touchant des gènes de classe 4, 6 et 8 du TGCA sont présentes dans les cellules pré-leucémiques, alors que les mutations de gènes impliqués dans la prolifération (classe 5) apparaissent plus tardivement et souvent dans des sous-clones (Corces-Zimmerman et al., 2014). Shlush et al ont retrouvé uniquement la mutation de DNMT3A dans les cellules T des patients présentant concomitamment les mutations de DNMT3A et de NPM1 au sein du pool leucémique. Les CSH normales DNMT3A mutées, appelées donc pré-leucémiques, étaient capables de se différencier en tous les lineages et étaient résistantes aux chimiothérapies puisque toujours présentes à la rémission (Shlush et al., 2014). Un séquençage d'exome réalisé chez des femmes en bonne santé âgées de plus de 65 ans a permis de retrouver des mutations de TET2 chez 5% de celles présentant une hématopoïèse clonale, et ces mutations étaient associées à des anomalies épigénétiques (Busque et al., 2012). Ces mutations sont rarement perdues ou gagnées à la rechute, alors que les mutations de FLT3, KIT, RAS ou NPM1 sont présentes dans des sous-clones et peuvent émerger ou disparaître au cours de l'évolution de la maladie (Welch, 2014).

Ainsi, les mutations présentes dès le stade de cellule souche pré-leucémique apparaissent comme des cibles thérapeutiques idéales, puisqu'elles sont présentes dans l'ensemble des cellules leucémiques, et pas uniquement dans un sous clone et persistent au moment de la rémission (Corces-Zimmerman et Majeti, 2014).

1.3. Classification et pronostic

La classification OMS actuelle des LAM est basée sur des données cytologiques, cytogénétiques et moléculaires (Tableau 2) (Döhner et al., 2010). Contrairement à l'ancienne classification cytologique FAB, elle reconnaît certaines anomalies génétiques récurrentes comme des entités clinico-biologiques à part entière (t(15;17), t(8;21), inv(16)...).

Categories

Acute myeloid leukemia with recurrent genetic abnormalities

AML with t(8;21)(q22;q22); *RUNX1-RUNX1T1*
 AML with inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11*
 APL with t(15;17)(q22;q12); *PML-RARA**
 AML with t(9;11)(p22;q23); *MLLT3-MLL†*
 AML with t(6;9)(p23;q34); *DEK-NUP214*
 AML with inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2); *RPN1-EVI1*
 AML (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13;q13); *RBM15-MKL1*
Provisional entity: AML with mutated NPM1
Provisional entity: AML with mutated CEBPA

Acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes‡

Therapy-related myeloid neoplasms§

Acute myeloid leukemia, not otherwise specified (NOS)

Acute myeloid leukemia with minimal differentiation
 Acute myeloid leukemia without maturation
 Acute myeloid leukemia with maturation
 Acute myelomonocytic leukemia
 Acute monoblastic/monocytic leukemia
 Acute erythroid leukemia
 Pure erythroid leukemia
 Erythroleukemia, erythroid/myeloid
 Acute megakaryoblastic leukemia
 Acute basophilic leukemia
 Acute panmyelosis with myelofibrosis (syn.: acute myelofibrosis; acute myelosclerosis)

Myeloid sarcoma (syn.: extramedullary myeloid tumor; granulocytic sarcoma)

Myeloid proliferations related to Down syndrome

Transient abnormal myelopoiesis (syn.: transient myeloproliferative disorder)
 Myeloid leukemia associated with Down syndrome

Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm

Acute leukemias of ambiguous lineage

Acute undifferentiated leukemia
 Mixed phenotype acute leukemia with t(9;22)(q34;q11.2); *BCR-ABL 1||*
 Mixed phenotype acute leukemia with t(v;11q23); *MLL* rearranged
 Mixed phenotype acute leukemia, B/myeloid, NOS
 Mixed phenotype acute leukemia, T/myeloid, NOS
Provisional entity: Natural killer (NK)-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma

Tableau 2. Classification OMS 2008 des LAM. D'après Döhner et al., 2010

Le premier score pronostic établi en 2000 séparait les LAM en 3 groupes de risque cytogénétiques: favorable, intermédiaire, défavorable. Ce score a été actualisé en 2010 par l'association European LeukemiaNet (ELN), avec l'ajout des mutations de FLT3, NPM1 et CEBP α (Tableau 3).

Genetic group	Subsets
Favorable	t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> Mutated <i>NPM1</i> without <i>FLT3</i> -ITD (normal karyotype) Mutated <i>CEBPA</i> (normal karyotype)
Intermediate-I*	Mutated <i>NPM1</i> and <i>FLT3</i> -ITD (normal karyotype) Wild-type <i>NPM1</i> and <i>FLT3</i> -ITD (normal karyotype) Wild-type <i>NPM1</i> without <i>FLT3</i> -ITD (normal karyotype)
Intermediate-II	t(9;11)(p22;q23); <i>MLL3-MLL</i> Cytogenetic abnormalities not classified as favorable or adverse†
Adverse	inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EV11</i> t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11)(v;q23); <i>MLL</i> rearranged -5 or del(5q); -7; abnl(17p); complex karyotype‡

Tableau 3. Stratification pronostique des LAM. D'après Döhner et al., 2010.

Le groupe de patients de risque « intermédiaire », qui représente une grande partie des patients (environ 45%), constitue un groupe de risque très hétérogène. L'étude du profil mutationnel des 18 gènes fréquemment mutés dans les LAM a permis d'affiner le pronostic de ce sous-groupe et de proposer une nouvelle classification: les LAM FLT3-ITD négatives et mutées pour NPM1+IDH1 ou IDH2 semblent avoir un pronostic favorable ; les LAM FLT3-ITD positives et mutées pour TET2 ou MLL ou DNMT3A ou associées à une trisomie 8 ainsi que les LAM FLT3-ITD négatives et mutées pour TET2 ou MLL ou ASXL1 ou PHF6 ont un pronostic défavorable (Patel et al., 2012) (Tableau 4).

Cytogenetic prognostication	Mutational profiling		Integrated prognostication
Favourable (19% de novo AML)	Any		Favourable (25% de novo AML)
Normal karyotype or intermediate-risk cytogenetics (63% de novo AML)	<i>FLT3</i> -ITD-negative	Mutant <i>NPM1</i> and <i>IDH1</i> or <i>IDH2</i>	Intermediate (35% de novo AML)
	<i>FLT3</i> -ITD-negative	Wild-type <i>ASXL1</i> , <i>MLL</i> , <i>PHF6</i> , <i>TET2</i>	
	<i>FLT3</i> -ITD-negative or positive	Mutant <i>CEBPA</i>	
	<i>FLT3</i> -ITD-positive	Wild-type <i>MLL</i> , <i>TET2</i> , and <i>DNMT3A</i> and trisomy 8-negative	
	<i>FLT3</i> -ITD-negative	Mutant <i>TET2</i> , <i>MLL</i> -PTD, <i>ASXL1</i> , or <i>PHF6</i>	Unfavourable (39% de novo AML)
<i>FLT3</i> -ITD-positive	Mutant <i>TET2</i> , <i>MLL</i> -PTD, <i>DNMT3A</i> , or trisomy 8 without mutant <i>CEBPA</i>		
Unfavourable (18% de novo AML)	Any		

Tableau 4. Classification pronostique révisée suggérée par Patel et al.

D'autres équipes ont cherché à mieux définir ce risque. Li et al. proposent également une révision de la classification ELN, cette fois basée sur le profil d'expression génétique d'un panel de 24 gènes, établi dans 2 cohortes indépendantes (Li et al., 2013b). Un profil d'expression génique « high » reclasse les patients ELN « favorables » en « intermédiaires » et les patients ELN « intermédiaires 1 ou 2 » en « défavorables ». Plus récemment, Pastore et al. ont proposé un score pronostic des LAM à caryotype normal basé sur des données cliniques (âge, performans status, taux de leucocytes) et moléculaires (statut mutationnel de *FLT3*, *NPM1* et *CEBPA*) (Pastore et al., 2014).

1.4. Traitement

Le traitement actuel des LAM repose sur la chimiothérapie (classiquement l'association d'une anthracycline et de cytarabine), suivie ou non d'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, en fonction de l'âge du patient et des facteurs pronostiques de la maladie. Ces traitements intensifs, possibles uniquement chez les patients jeunes, permettent d'obtenir une rémission complète dans plus de 75% des cas (Burnett et al., 2011). Les protocoles conduits ces 20 dernières années ont permis d'affiner les traitements en fonction de la stratification pronostique ELN, afin d'optimiser les doses et le type de chimiothérapie. Pour exemple, de fortes doses de daunorubicine améliorent le pronostic des patients présentant une mutation de *NPM1*, *MLL* ou *DNMT3A* mais pas celui des patients non mutés (Patel et al., 2012). Des données récentes ont montré l'intérêt de l'ajout du Gemtuzumab

Ozogamycine, un anticorps monoclonal anti-CD33 couplé à la calichéamicine, qui améliore la survie des patients de plus de 50 ans lorsqu'il est ajouté au traitement de première ligne classique, surtout dans les LAM à caryotype normal (Castaigne et al., 2012).

Chez les patients plus âgés, qui représentent la majorité des cas de LAM, ces traitements intensifs sont difficilement réalisables, et un traitement palliatif leur est souvent proposé. Ainsi, des thérapies moins toxiques et ciblées sur la cellule leucémique apparaissent intéressantes. Les agents déméthylants (5-azacitidine, décitabine), pouvant agir en aval des mutations touchant l'épigénétique, ont montré un avantage de survie mais sont peu efficaces pour obtenir une rémission complète, et pourraient avoir leur place en traitement d'entretien (Estey, 2013). Des inhibiteurs spécifiques d'anomalies génétiques sont en développement. Les inhibiteurs de FLT3 (sorafenib, quizartinib, crénolanib, etc...) permettent d'obtenir une rémission complète chez environ 50% des patients FLT3-ITD, mais avec un taux de rechute important et l'apparition de mutations de résistance (Estey, 2013). Les inhibiteurs d'IDH1 et IDH2 sont actuellement en cours d'études cliniques, avec des résultats très prometteurs. Ils permettent l'obtention de rémission complète chez des patients en échec et induisent une différenciation des cellules leucémiques. Plus récemment, les progrès en thérapie cellulaire ont permis de mettre au point des immunothérapies anti-cancéreuses. Les « CARs », pour « chimeric antigen receptors », sont des molécules permettant aux lymphocytes T du patient de reconnaître spécifiquement un marqueur tumoral. Les CARs développés dans les traitements des LAM ciblent le CD33 ou le CD123, mais présentent une toxicité hématologique freinant leur développement clinique pour le moment (Gill et al., 2014; Mardiros et al., 2013).

2. Métabolisme et cancer

2.1. Reprogrammation métabolique des cancers

Les cellules cancéreuses possèdent des caractéristiques uniques, définies par Hanahan et Weinberg comme les « hallmarks of cancer » : résistance à l'apoptose, maintien d'une signalisation de prolifération, échappement aux suppresseurs de croissance, réplication infinie, etc... (Hanahan et Weinberg, 2011). Pour être maintenues, ces propriétés biologiques doivent être accompagnées d'une adaptation du métabolisme de la cellule tumorale. Par exemple, la prolifération accrue des cellules cancéreuses nécessite un doublement rapide de leur biomasse (protéines, lipides, acides nucléiques) avant chaque division cellulaire. Ainsi, la reprogrammation du métabolisme pourrait constituer une nouvelle caractéristique des cancers et une cible thérapeutique (Cairns et al., 2011).

2.1.1. L'effet Warburg

Dans les années 1920, Otto Warburg a observé que les cellules d'ascite d'Ehrlich consommaient plus de glucose que des cellules normales, et qu'elles dégradèrent celui-ci en lactate via la glycolyse, même en condition de normoxie (Warburg, 1956a). Ce phénomène, appelé depuis « effet Warburg », conduit à la synthèse d'ATP via la glycolyse aérobie plutôt que via la phosphorylation oxydative mitochondriale (Figure 2). Cette observation était paradoxale, puisque cette voie de production d'ATP est moins efficace, conduisant à la formation de 2 moles d'ATP pour une molécule de glucose alors que la phosphorylation oxydative en produit 36. L'hypothèse de Warburg était que les cellules cancéreuses présentent un défaut irréversible de la respiration mitochondriale, conduisant à la fermentation du glucose en lactate pour maintenir les besoins en énergie (Warburg, 1956b). Bien que cette hypothèse soit valable dans certaines tumeurs associées à des mutations d'enzymes mitochondriales, elle a depuis été révisée, plusieurs équipes ayant montré une intégrité du métabolisme oxydatif des cellules cancéreuses (Moreno-Sánchez et al., 2007).

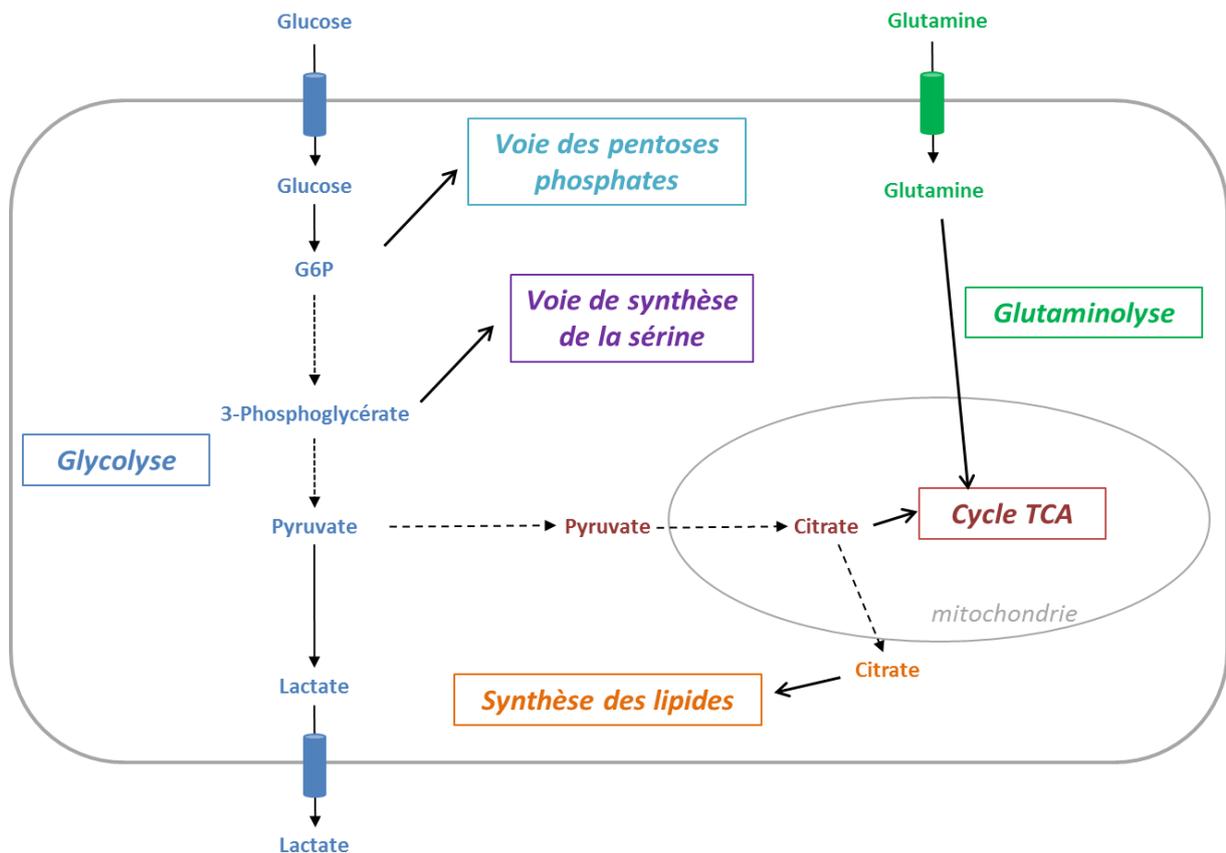


Figure 2. Schéma général des grandes voies métaboliques. La cellule cancéreuse capte le glucose extracellulaire et le transforme en pyruvate puis en lactate lors de la glycolyse aérobie. Les intermédiaires de la glycolyse sont utilisés dans des voies métaboliques alternes, la voie des pentoses phosphates et la voie de la sérine, importantes pour la synthèse des acides nucléiques et l'équilibre redox. La dégradation du pyruvate en lactate est favorisée et celui-ci n'est plus disponible pour le cycle tricarboxylique (TCA). La cellule utilise la glutamine pour maintenir le cycle TCA actif, via la glutaminolyse. Les produits du cycle TCA, et notamment le citrate, conduisent à la synthèse des lipides.

De plus, la production d'ATP par le flux glycolytique pourrait en fait dépasser celle de la phosphorylation oxydative, puisqu'elle est plus rapide, dépend d'un précurseur abondant et disponible et qu'elle a lieu dans le cytoplasme, espace bien plus important que la mitochondrie. Ce switch métabolique apparaît donc comme une adaptation de la cellule pour maintenir des taux élevés de croissance et de prolifération. Les différents oncogènes et les voies de signalisation identifiés dans les cancers participent à cette adaptation, en modulant l'expression de protéines impliquées dans les voies métaboliques.

2.1.2. La glycolyse

a) Régulation du flux glycolytique dans les cancers

La glycolyse est une succession de réactions enzymatiques conduisant à la dégradation du glucose en pyruvate (Figure 3). Dans les cellules non tumorales, en présence d'oxygène, le pyruvate entre dans la mitochondrie pour être transformé de façon irréversible en acétyl-CoA, intermédiaire du cycle tricarboxylique (TCA), alors qu'en hypoxie (< 2% d'O₂), il est dégradé en lactate (fermentation lactique). La glycolyse décrite par Warburg correspond à l'utilisation de la voie de la fermentation (effet Pasteur), même en présence d'oxygène. En plus de la production d'ATP, la glycolyse produit de nombreux intermédiaires pour les voies de biosynthèse: le glucose-6-phosphate (G6P) pour la voie des pentoses phosphates ; le 3-phosphoglycerate pour la voie de biosynthèse de la sérine (DeBerardinis et al., 2008).

Cette utilisation anabolique du glucose est favorisée par une captation et une glycolyse accrues, pouvant être régulées par de nombreux oncogènes. L'entrée du glucose dans la cellule est réalisée par des transporteurs appelés GLUT (glucose transporter) ; leur expression est augmentée par l'oncogène C-MYC (Osthus et al., 2000), par la kinase AKT (v-akt murine thymoma viral oncogene) (Elstrom et al., 2004) ou par le facteur de transcription HIF1 α (hypoxia inducible factor) (Macheda et al., 2005). Leur expression est inhibée en aval de p53, soit de façon directe (GLUT 1 et 4) (Schwartzenberg-Bar-Yoseph et al., 2004), soit par inhibition de la voie NF- κ B (GLUT3) (Kawauchi et al., 2008). Les mêmes oncogènes participent à l'augmentation de la glycolyse en régulant l'expression de ces différentes enzymes : l'hexokinase 2 (HK2) par C-MYC (Kim et al., 2007), HIF1 α (Gordan et al., 2007) et p53 (Mathupala et al., 1997) ; la phospho-fructokinase 2 (PFK2) par HIF1 α (Obach et al., 2004) ; la lactate déshydrogénase A (LDHA) par C-MYC (Shim et al., 1997) ou HIF1 α (Firth et al., 1995). La kinase AKT phosphoryle et active les enzymes HK2 et PFK2 (Majewski et al., 2004; Robey et Hay, 2009).

En plus d'une captation accrue, il existe un ralentissement du flux glycolytique au niveau de la dernière étape, la formation du pyruvate, permettant l'accumulation des précurseurs en amont. Ce blocage est réalisé par la réexpression, dans les cellules cancéreuses, d'une forme embryonnaire moins efficace de l'enzyme pyruvate kinase (PK), appelée PKM2. Cette activité enzymatique réduite participe à l'oncogenèse, puisque l'inhibition spécifique de PKM2 par un KO conditionnel dans un modèle de cancer du sein montre que les cellules non prolifératives ont réexprimé l'isoforme non tumorale et plus active PKM1, alors que les cellules proliférant le plus ont une activité pyruvate kinase faible (Israelsen et al., 2013). La PKM2 peut être phosphorylée en aval des récepteurs à activité tyrosine kinase, comme le fibroblast growth factor receptor (FGFR), ce qui diminue son activité (Christofk et al., 2008). Elle est également régulée transcriptionnellement, soit en aval de mTORC1 (mammalian target of rapamycin complexe 1) soit par HIF1 α (Sun et al., 2011), soit en aval de C-

MYC par les heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) qui permettent son épissage préférentiel par rapport à PKM1 (David et al., 2010).

Au total, l'entrée et la première étape de la glycolyse sont augmentées, alors que la dernière étape est diminuée, ce qui a pour conséquence une accumulation des différents métabolites utilisés dans les voies anaboliques couplées à la glycolyse.

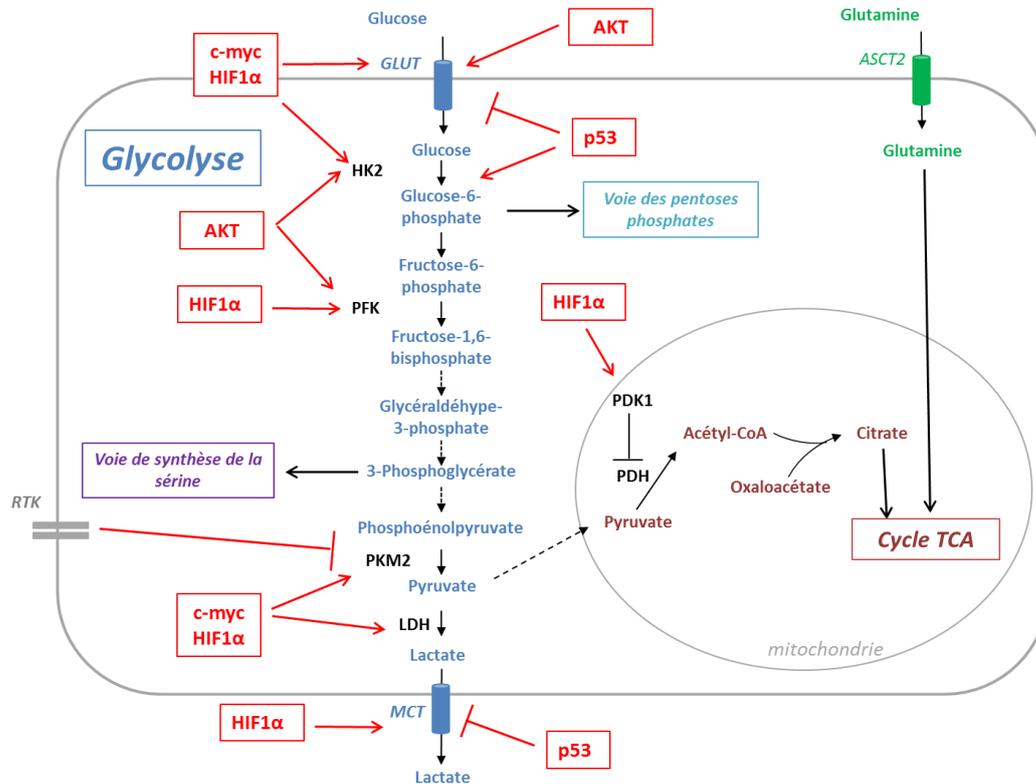


Figure 3. Régulation de la glycolyse dans les cancers. Le glucose entre dans la cellule par le transporteur GLUT puis est utilisé rapidement par l'hexokinase 2 (HK2) pour former du glucose-6-phosphate, première étape de la glycolyse, qui conduit à la formation du lactate, excrété par le transporteur MCT. Les différentes enzymes impliquées dans la glycolyse sont régulées par différents oncogènes (en rouge) afin de promouvoir l'effet Warburg. La dégradation du pyruvate mitochondrial est inhibée par HIF1α et le cycle TCA est maintenu actif par l'utilisation de la glutamine. PFK : phospho-fructokinase ; PKM2 : pyruvate kinase 2 ; PDH : pyruvate déshydrogénase ; PDK : pyruvate déshydrogénase kinase ; RTK : récepteurs à activité tyrosine kinase.

b) La voie des pentoses phosphates

La voie des pentoses phosphates est une branche de la glycolyse, indépendante du taux d'oxygène, initiée au niveau du premier intermédiaire de la glycolyse, le glucose-6-phosphate (Figure 4). Elle remplit 3 rôles cellulaires principaux, importants notamment pour les cellules proliférant rapidement :

- la production de NADPH à partir du NADP⁺. Le NADH est un cofacteur essentiel à la glutathion réductase, qui permet le maintien de l'état redox de la cellule et la lutte contre le stress oxydatif. Il participe également à la synthèse des acides gras et du cholestérol.
- la formation de ribose-5-phosphate, précurseur des acides nucléiques.

- la formation de l'érythrose-4-phosphate, précurseur des acides aminés aromatiques.

Le facteur de transcription p53 est un modulateur important de la voie des pentoses phosphates. En plus d'augmenter la synthèse de G6P par l'HK2, il inhibe la PFK1 via la protéine TIGAR (TP53 induced glycolysis and apoptosis regulator) (Bensaad et al., 2006) et augmente l'activité de la G6PDH (glucose-6-phosphate déshydrogénase), soit directement (jiang nat cell biol 2011), soit par l'intermédiaire des protéines ATM (ataxia telangiectasia mutated) et hsp70 (heat shock protein 70) (Cosentino et al., 2011; Jiang et al., 2011). Cependant, les personnes présentant une mutation de la G6PDH ne semblent pas protégées contre les cancers ou hémopathies malignes (Cocco et al., 1998; Ferraris et al., 1988).

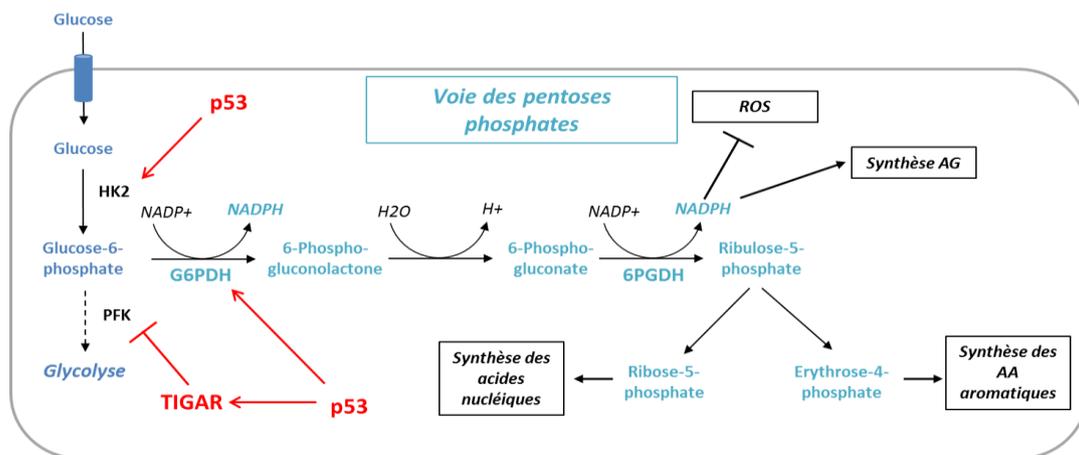


Figure 4. Voie des pentoses phosphates. La glycolyse peut être déviée au niveau de sa première étape par le shunt des pentoses phosphates. G6PDH : glucose-6-phosphate déshydrogénase, 6PGDH : 6-phosphogluconate déshydrogénase, NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, AG : acides gras

c) La voie de biosynthèse de la sérine

Une autre branche issue de la glycolyse impliquée dans les cancers est la formation de sérine à partir du 3-phosphoglycérate. La sérine participe à la synthèse de phosphatidylsérine, de cystéine et de glycine. La glycine a un rôle fondamental dans la synthèse des bases puriques, via le métabolisme des folates, ainsi que dans la synthèse de glutathion (Amelio et al., 2014). La voie de biosynthèse de la sérine se déroule en 3 étapes, faisant intervenir 3 enzymes : la 3-phosphoglycérate déshydrogénase (PHGDH), la phosphosérine aminotransférase 1 (PSAT1) et la phosphosérine phosphatase (PSPH). En utilisant un screening d'interférence ARN de 133 enzymes du métabolisme in vivo dans le cancer du sein, Possemato et al. ont identifié la PHGDH comme étant une enzyme clé : sa suppression inhibe la prolifération en diminuant d'anaplérose glutaminique du cycle TCA via l'alpha-cétoglutarate (α KG) (Possemato et al., 2011). En effet, l'activation de cette voie permet à l'enzyme PSAT1 de transformer le glutamate en α KG, intermédiaire du cycle TCA. Une étude métabolomique utilisant un marquage isotopique du glucose a montré l'augmentation de cette voie dans différentes lignées cancéreuses

(Locasale et al., 2011). Cette enzyme est aussi retrouvée surexprimée dans un certain nombre de mélanomes et cancers du sein (Locasale, 2013).

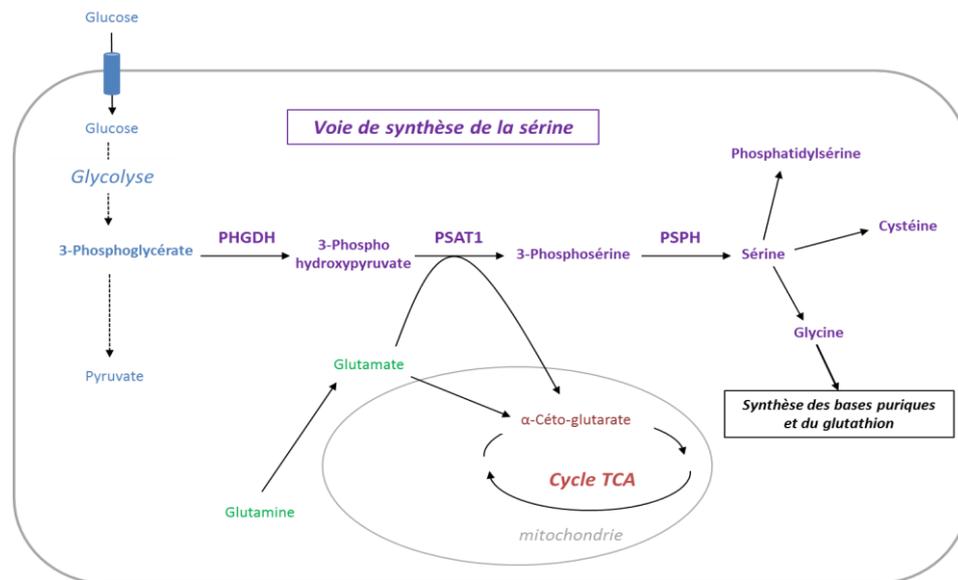


Figure 5. Voie de biosynthèse de la sérine. La synthèse de la sérine intègre des métabolites de la glycolyse et de la glutaminolyse, et permet de générer de l'alpha-cétoglutarate, des acides aminés non essentiels et participe à la synthèse des bases puriques et du glutathion. *PHGDH* : 3-phosphoglycérate déshydrogénase ; *PSAT1* : phosphosérine aminotransférase 1, *PSPH* : phosphosérine phosphatase.

d) La dégradation du pyruvate

Lors de la dernière étape de la glycolyse, le pyruvate est dégradé en lactate par l'enzyme LDH, utilisant le cofacteur NADH pour former du NAD⁺ (nicotinamide adénine dinucléotide). Le NAD⁺ générée lors de cette réaction est un cofacteur important pour les premières étapes de la glycolyse, la synthèse des bases pyrimidiques et participe à la réparation de l'ADN par la poly-ADP-ribose polymérase (PARP) (Icard et al., 2014). L'expression de la LDHA est sous la dépendance de C-MYC et HIF1 α (Firth et al., 1995; Shim et al., 1997). Le lactate sort ensuite de la cellule par un transporteur (monocarboxylate transporter (MCT)) et permet l'acidification du milieu extracellulaire, favorisant l'angiogénèse et formation de métastases (Kato et al., 2013). L'expression des transporteurs MCT (principalement MCT1 et MCT4) est retrouvée augmentée dans de nombreux cancers (Pinheiro et al., 2010). MCT1 est inhibé par p53 (Boidot et al., 2012), alors que la transcription de MCT4 est activée en condition d'hypoxie par HIF1 α (Ullah et al., 2006).

La dégradation du pyruvate en lactate est favorisée par l'inhibition de la pyruvate déshydrogénase (PDH) par la PDH kinase 1 (PDK1) dans de nombreux cancers, majorant la déconnexion glycolyse/cycle TCA. En effet, deux équipes ont montré l'activation de la PDK1 en aval de HIF1 α afin de promouvoir l'utilisation du pyruvate vers la glycolyse aérobie au détriment de la respiration mitochondriale (Kim et al., 2006; Papandreou et al., 2006).

2.1.3. Le cycle TCA

Le rôle principal du cycle TCA dans les cellules en prolifération est de fournir des intermédiaires pour la biosynthèse des lipides, protéines et acides nucléiques. Ceci constitue une différence importante par rapport aux cellules non prolifératives, qui utilisent les intermédiaires du cycle TCA principalement pour générer de l'ATP via la chaîne respiratoire mitochondriale. Ainsi dans les cellules cancéreuses, on observe, en plus de la synthèse d'ATP, un efflux continu des intermédiaires du cycle vers les voies de biosynthèse, phénomène appelé cataplérose. Par exemple, le citrate est dévié du cycle pour la synthèse des lipides, l'oxaloacétate et l' α KG pour la synthèse protéique. Un cycle TCA tronqué est donc nécessaire à la prolifération cellulaire (DeBerardinis et al., 2008). Pour maintenir un cycle actif, la cellule doit compenser les pertes liées à la cataplérose, en utilisant des voies alternes pour synthétiser les intermédiaires du cycle. La source principale d'anaplérose est le métabolisme des acides aminés, et en particulier de la glutamine, lors de la glutaminolyse (développée dans la partie 3). Une autre source possible d'anaplérose est la synthèse directe d'oxaloacétate à partir du pyruvate, par la pyruvate carboxylase (PC). L'activité enzymatique de la PC est augmentée dans des lymphocytes en prolifération (Curi et al., 1988), mais est plutôt retrouvée diminuée dans les cancers (DeBerardinis et al., 2008). Cependant, une étude réalisée dans un modèle de glioblastome montre son importance dans le maintien du cycle TCA actif lorsque le métabolisme de la glutamine est inhibé (Cheng et al., 2011).

2.1.4. Métabolisme du citrate et lipogénèse

Composant principal des membranes lipidiques, les acides gras sont essentiels pour maintenir la prolifération rapide des cellules cancéreuses. De nombreuses études ont montré que, dans les cancers, les acides gras utilisés provenaient surtout d'une synthèse de novo, plutôt que de la dégradation de lipides extracellulaires (Lin et al., 2013; Zaidi et al., 2012). Le métabolite clé de la lipogénèse est le citrate, produit soit par la citrate synthase à partir de l'oxaloacétate (OAA) et l'acétyl-CoA dans le cycle TCA, soit, en cas de défaut mitochondrial ou d'hypoxie, à partir de l'isocitrate provenant de la glutaminolyse (Figure 6) (Metallo et al., 2012; Mullen et al., 2012; Wise et al., 2011).

Le citrate mitochondrial est exporté dans le cytoplasme et dégradé en OAA et Acétyl-CoA par l'ATP-citrate lyase (ACLY) (Icard et al., 2012). L'ACLY a un rôle majeur en cancérogénèse, puisque son inhibition par interférence ARN ou par des inhibiteurs supprime la prolifération et induit la différenciation de plusieurs lignées de cancers in vitro et in vivo (Hatzivassiliou et al., 2005). Elle est retrouvée surexprimée dans de nombreux cancers (Zaidi et al., 2012). Elle est activée par phosphorylation en aval de la voie PI3K (phosphatidyl-inositol 3-kinase)/AKT (Bauer et al., 2005). L'acétyl-CoA produit permet ensuite la synthèse des acides gras à partir du malonyl-CoA par la protéine ACC (acétyl-CoA carboxylase), ou du cholestérol à partir de l'HMG-CoA (3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A). L'association à l'oncogène RAS de l'enzyme HMGCR

(hydroxyméthylglutaryl coenzyme A reductase) accélère la transformation de fibroblastes murins, soulignant l'importance de cette voie en cancérogénèse (Clendening et al., 2010). L'activité de l'ACLY pourrait également avoir un rôle dans l'expression des gènes, l'acétyl-CoA produit étant également utilisé pour l'acétylation des histones (Wellen et al., 2009).

Les gènes des enzymes impliqués dans la biosynthèse des lipides possèdent des séquences régulatrices spécifiques, reconnues par des facteurs de transcription appelés SREBP, pour sterol regulatory element-binding protein. Ces SREBPs sont activés par différents oncogènes, notamment mTORC1 (Düvel et al., 2010; Porstmann et al., 2005) ou la protéine p53 mutée (Freed-Pastor et al., 2012).

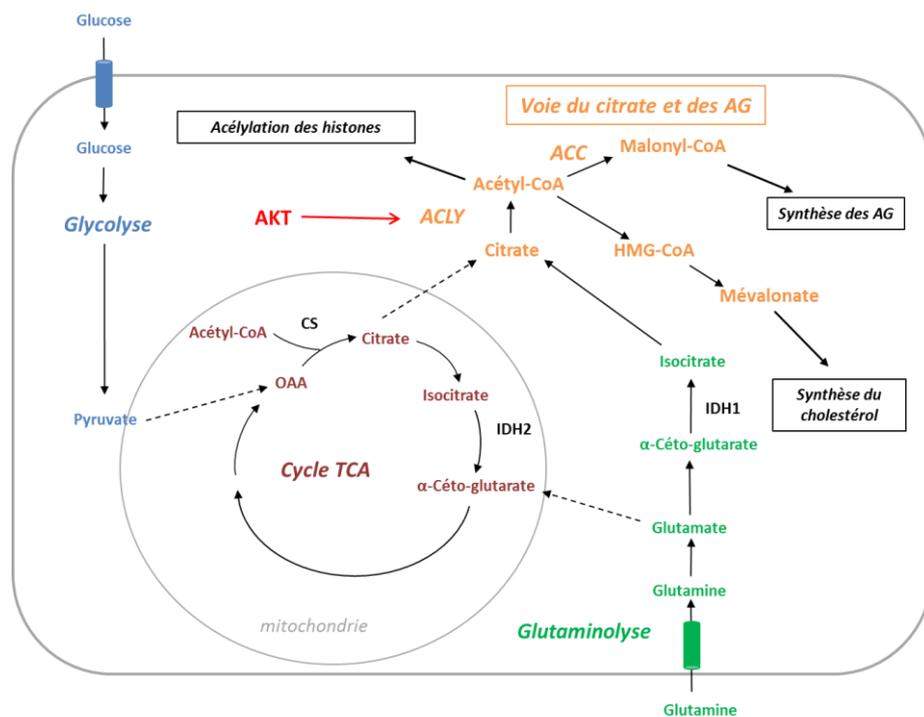


Figure 6. Métabolisme du citrate. Le citrate produit dans la mitochondrie par le cycle TCA ou dans le cytosol à partir de la glutamine en cas de défaut mitochondrial ou d'hypoxie est dégradé en acétyl-CoA par l'ATP-citrate lyase (ACLY); celui-ci est utilisé dans 3 voies métaboliques : la synthèse du cholestérol, celle des acides gras (AG) et l'acétylation des histones. OAA : oxaloacétate, CS : citrate synthase, ACC : acétyl-CoA carboxylase, HMG-CoA : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A, IDH : isocitrate déshydrogénase.

2.1.5. Glutaminolyse

La glutaminolyse est la voie catabolique qui conduit à la dégradation de la glutamine en glutamate puis en αKG, afin de maintenir le cycle TCA actif. Son fonctionnement et ses mécanismes de régulation dans les cancers sont développés plus loin.

2.2. Mutations de gènes impliqués dans le métabolisme

En plus de participer à l'oncogénèse, certaines altérations métaboliques peuvent être à l'origine du processus de transformation. C'est le cas des cancers associés à des mutations d'enzymes mitochondriales : la succinate déshydrogénase (SDH), la fumarate hydratase (FH) ou les isocitrate déshydrogénases (IDH) (Figure 7).

2.2.1. Mutations de la succinate déshydrogénase

La SDH est un complexe enzymatique de la membrane interne mitochondriale, qui lie le cycle TCA à la chaîne respiratoire mitochondriale en oxydant le succinate en fumarate et en transférant 2 électrons au coenzyme Q. Des mutations de la SDH sont retrouvées dans 10 à 70% des paragangliomes sporadiques ou familiaux et dans certains cas de phéochromocytomes (Bardella et al., 2011). Elles entraînent une augmentation du succinate cytosolique, qui inhibe les prolyl hydroxylases, ce qui stabilise HIF1 α et active un métabolisme glycolytique. Le succinate accumulé peut par ailleurs inhiber les dioxygénases dépendantes de l' α KG (Jumonji-C histone déméthylase (JHDM), TET2, etc), ce qui entraîne des dérégulations épigénétiques. Les cellules déficientes pour SDH présentent également une augmentation de la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et donc un stress oxydatif (Wallace, 2012).

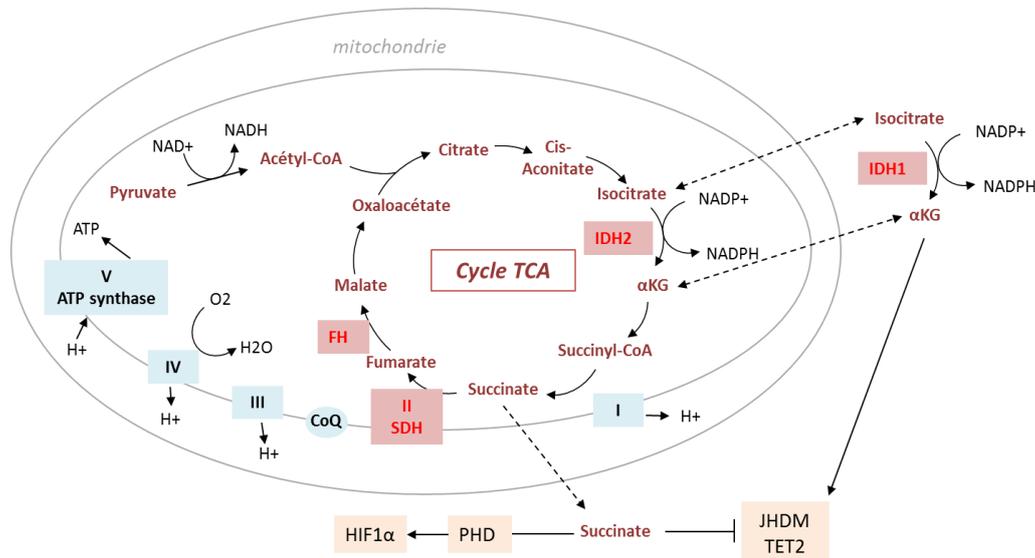


Figure 7. Cycle TCA et chaîne respiratoire : principales enzymes mutées dans les cancers.

2.2.2. Mutations de la fumarate hydratase

Les mutations homozygotes du gène de la FH sont associées à des léiomyomes utérins et cutanés, ainsi qu'à des formes agressives de cancers du rein (Picaud et al., 2011). La FH converti le fumarate en malate, et sa mutation entraîne une accumulation de fumarate et de succinate et induit une diminution marquée de malate et de citrate. En plus de l'effet sur HIF1 α lié à l'augmentation du succinate, l'accumulation de fumarate peut activer la voie de réponse au stress oxydant régulée par NRF2, en inactivant son régulateur KEAP1 (kelch-like ECH-associated protein 1) (Wallace, 2012).

2.2.3. Mutations des isocitrates déshydrogénases

Les cellules eucaryotes expriment 3 isoformes différentes de la protéine IDH : la forme IDH1 est cytosolique alors que les formes IDH2 et 3 sont mitochondriales. Les protéines IDH1 et 2 catalysent la décarboxylation oxydative réversible de l'isocitrate en α KG en utilisant le NADP⁺ comme co-substrat alors qu'IDH3 utilise le NAD⁺ lors d'une réaction irréversible. L' α KG produit par IDH1 dans le cytosol est nécessaire au fonctionnement de nombreuses dioxygénases, notamment JMDH et TET2, impliquées dans les processus de méthylation des histones et de l'ADN. Le NADPH est important dans le maintien de l'équilibre d'oxydo-réduction via le glutathion et est un cofacteur important de la synthèse des lipides à partir du citrate. L' α KG produit par IDH3 assure le fonctionnement du cycle TCA et de la chaîne respiratoire, alors qu'IDH2 apparaît plutôt comme un modulateur, permettant d'adapter cette réaction en fonction des conditions énergétiques (DeBerardinis et al., 2008). Par exemple, la réaction inverse, c'est-à-dire la carboxylation réductive de l' α KG en isocitrate par IDH2 est favorisée en condition d'hypoxie, et assure la synthèse lipidique (Metallo et al., 2012).

a) Mutations IDH et cancers

Depuis quelques années, des mutations hétérozygotes des isoformes 1 et 2 ont été décrites dans plusieurs types de cancers, alors qu'aucune mutation d'IDH3 n'a été retrouvée. La première mutation décrite d'IDH1 est la mutation d'une arginine en position 132, découverte lors du séquençage d'une cohorte de patients atteints de glioblastomes multiformes (Parsons et al., 2008). Des études ultérieures ont établi que la mutation d'IDH1 en R132 représentait 70% des gliomes de l'adulte de grade II et III et 80% des glioblastomes. Lorsque ces mutations sont absentes, beaucoup de patients présentent une mutation d'IDH2 sur le codon analogue R172. Les mutations d'IDH1/2 représentent donc au total presque 90% des cas dans ces tumeurs (Losman et Kaelin, 2013).

L'identification des mutations d'IDH dans les hémopathies a été faite lors du séquençage de 187 LAM, retrouvant la mutation IDH1 en R132 dans 15 cas, dont 16% de LAM à caryotype normal (Mardis et al., 2009). Selon les études, les mutations d'IDH1 ou 2 sont retrouvées en fréquence égale et en moyenne dans 10 à 20% des LAM (Im et al., 2014). Une mutation d'IDH2 différente de celle

retrouvée dans les gliomes existe dans les hémopathies myéloïdes, la mutation de l'arginine 140. Cette mutation est plus fréquente que la mutation en R172. Les mutations d'IDH sont aussi présentes dans les syndromes myéloprolifératifs et myélodysplasiques, mais pourraient être associées à la progression d'un clone leucémique (Tefferi et al., 2010). Par ailleurs, les lymphomes angio-immunoblastiques présentent dans 10 à 40% des cas des mutations d'IDH (IDH2 uniquement) (Cairns et al., 2012). Cinquante pour cent des chondrosarcomes et 20% des cholangiocarcinomes présentent des mutations d'IDH1 (Losman et Kaelin, 2013).

b) Mutants IDH et oncogénèse

Plusieurs équipes ont étudié le rôle de ces mutations dans l'oncogénèse, *in vitro* et *in vivo*. L'expression des protéines mutées IDH1 ou 2 augmente la prolifération des astrocytes et de la lignée érythroleucémique TF-1 (Koivunen et al., 2012; Losman et al., 2013), et leur confère une indépendance aux facteurs de croissance (Losman et al., 2013). Elle bloque la différenciation dans plusieurs modèles : la différenciation en réponse à l'érythropoïétine (EPO) de la lignée TF-1 (Losman et al., 2013), la différenciation myéloïde des cellules de moelle osseuse murine (Figuerola et al., 2010; Patel et al., 2012) ou la différenciation adipocytaire (Lu et al., 2012).

Les mutations d'IDH1 et 2 sont situées dans les sites actifs et conduisent à la formation d'une protéine IDH ayant plus d'affinité pour le NADPH et moins pour l'isocitrate. Cette néo-enzyme catalyse une réaction nouvelle : la formation de (R)-2HG ((R)-2-hydroxyglutarate) à partir du NADPH et de l' α KG (Dang et al., 2009; Ward et al., 2010). Cette molécule est qualifiée d' « oncométabolite », puisqu'elle reproduit à elle seule les effets retrouvés sur la prolifération et la différenciation cellulaire (Losman et al., 2013; Lu et al., 2012). Le (R)-2HG est retrouvé dans le sang et les urines des patients atteints de LAM et de tumeurs neurologiques IDH mutées en quantités augmentées (Choi et al., 2012; Gross et al., 2010). Malgré ces effets oncogéniques *in vitro*, la présence de la protéine IDH mutante n'est pas suffisante à la transformation *in vivo*. La même équipe a mis au point un modèle murin de knockin conditionnel d'IDH1 R132H dans le cerveau ou le système hématopoïétique. L'expression d'IDH1 R132H dans le cerveau entraîne une mort périnatale par hémorragie cérébrale, sans développement de tumeur (Sasaki et al., 2012). Celui réalisé dans le système hématopoïétique n'engendre pas de leucémie mais les souris présentent un enrichissement de la moelle en cellules progénitrices immatures, associé à une anémie et une splénomégalie par érythropoïèse extra-médullaire (Sasaki et al., 2012). L'expression d'IDH2 R140 produit à peu près le même phénotype, mais sans impact sur les cellules progénitrices (Kats et al., 2014). Ainsi, les mutations d'IDH seules ne semblent pas suffisantes à la leucémogénèse, mais nécessitent la coopération d'autres événements mutationnels. La co-expression de FLT3-ITD et IDH2 R140 conduit à la formation rapide de leucémie chez la souris (Kats et al., 2014).

c) Mécanismes d'action des mutants d'IDH

Plusieurs hypothèses expliquant les mécanismes d'action des mutants d'IDH ont été proposées, et participent, seules ou en interaction, à l'oncogenèse.

i. Les altérations épigénétiques

L'effet le plus étudié des mutations d'IDH 1/2 est l'effet compétitif du (R)-2HG sur les enzymes dioxygénases dépendantes de l' α KG qui participent aux modifications épigénétiques. En effet, les cellules des gliomes ou des LAM IDH mutées présentent un profil particulier d'hyperméthylation de l'ADN (Figuroa et al., 2010; Turcan et al., 2012). L'implication de deux dioxygénases a été étudiée dans l'oncogenèse liée à la mutation d'IDH :

- TET2, qui est une enzyme qui hydroxyle les 5-méthylcytosines, participant à la déméthylation de l'ADN. Son activité catalytique est inhibée par le (R)-2HG (Koivunen et al., 2012; Xu et al., 2011) et le KO de TET2 dans la lignée TF-1 récapitule les effets de la mutation R132H ou du (R)-2HG (Losman et al., 2013). De façon importante, les mutations des IDH et de TET2 sont mutuellement exclusives dans les LAM et les profils de méthylation des LAM pour ces deux types de mutations sont proches (Figuroa et al., 2010).
- JHDM : cette famille d'histones déméthylases regroupe plus de 30 protéines régulant l'épigénétique. L'addition de (R)-2HG augmente les marques de méthylation des histones, et peut inhiber l'activité de plusieurs JHDM, notamment KMD4 (Lu et al., 2012). Lorsque le mutant IDH1 R132H est exprimé par « knockin » conditionnel dans le compartiment myéloïde, les cellules présentent un profil d'hyperméthylation des histones (Sasaki et al., 2012).

ii. L'effet sur HIF1 α et les prolyl hydroxylases

Une autre famille de dioxygénases dépendantes de l' α KG est au contraire activée par le (R)-2HG, les EglN prolyl-4-hydroxylases. Elles inhibent la protéine HIF1 α en l'hydroxylant, permettant sa reconnaissance par la protéine von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase (VHL) et sa dégradation vers le protéasome. Ainsi, les mutations d'IDH pourraient altérer la réponse à l'hypoxie médiée par HIF1 α . L'inhibition de EglN1 peut reverser le phénotype des cellules TF-1 mutées pour IDH1 (Losman et al., 2013).

iii. Autres hypothèses

Une étude métabolomique réalisée dans des cellules d'oligodendrogliome mutées IDH1/2 montre des altérations métaboliques, notamment une diminution des intermédiaires du cycle TCA, du métabolisme de la choline et du glutathion (Reitman et al., 2011). Les mutations d'IDH pourraient ainsi illustrer la cancérogénèse selon Warburg, avec une altération du métabolisme mitochondrial

comme évènement primitif. Par ailleurs, en plus de l'effet sur le glutathion, la réaction médiée par les protéines IDH mutées utilise le NADPH, ce qui pourrait le rendre moins disponible pour la cellule dans son rôle d'antioxydant. Cependant le ratio NADP⁺/NADPH dans la moelle des souris « knockin » pour IDH1 R132H n'a pas été retrouvé modifié (Sasaki et al., 2012).

2.2.4. SIRT6

En dehors de ces mutations, un lien direct entre altération du métabolisme et transformation oncogénique a été mis en évidence par l'étude de l'histone déacétylase SIRT6, qui appartient à la famille des sirtuines. Le KO du gène *SIRT6* dans des cellules MEF (mouse embryonic fibroblast) augmente leur prolifération et induit la formation de tumeur lorsqu'elles sont transplantées dans des souris SCID (Sebastián et al., 2012). Ces cellules présentent un métabolisme glycolytique augmenté et l'inhibition de PDK1, qui détourne le pyruvate de la glycolyse vers le cycle TCA, inhibe la prise des tumeurs. SIRT6 apparaît comme un co-répresseur transcriptionnel de C-MYC et de HIF1 α , puisque la perte de SIRT6 entraîne la réactivation de l'expression de gènes contrôlés par ces 2 facteurs, notamment les gènes d'enzymes de la glycolyse, de la glutaminolyse et des protéines ribosomiques.

2.3. Ciblage du métabolisme des cancers

L'intérêt accru pour l'étude du métabolisme des cancers a conduit au développement de nombreux inhibiteurs ciblant les différentes altérations métaboliques identifiées. Ces médicaments sont actuellement en cours d'études précliniques et/ou cliniques, avec pour certains des résultats encourageants.

2.3.1. Ciblage du métabolisme du glucose

a) Premières étapes du métabolisme du glucose

Le composé ayant le développement clinique le plus avancé est le 2DG (2-déoxyglucose-phosphate), molécule analogue du glucose. Après captation par la cellule via les GLUTs, il est phosphorylé par l'HK à la place du glucose. Le 2DG-6-P formé inhibe les GLUTs, l'HK et la PGI (phosphoglucose isomérase, enzyme qui transforme le G-6-P en F-6-P)), bloque la voie des pentoses phosphates à sa première réaction, et inhibe également la N-glycosylation des protéines, ce qui active le stress du réticulum endoplasmique par l'accumulation de protéines malformées et modifie l'expression de récepteurs à la surface cellulaire (Zhang et al., 2014). Le 2-DG apparaît donc comme un bon outil pour cibler le métabolisme glycolytique puisqu'il inhibe la glycolyse sur plusieurs niveaux. Il est bien toléré

seul ou associé à la chimiothérapie ou la radiothérapie, mais les quelques essais cliniques de phase I/II réalisés à ce jour n'ont pas retrouvé un effet antitumoral important (Raez et al., 2013; Singh et al., 2005; Stein et al., 2010).

Des inhibiteurs de l'HK, le 3-bromopyruvate, le methyl jasmonate ou la lonidamide, ont été testés en phase précliniques ou cliniques, mais leur utilisation pour cibler la glycolyse est limitée par leur manque de spécificité (Galluzzi et al., 2013). Le 3PO, un inhibiteur de la 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3), enzyme activatrice de la PFK, a un effet anti-tumoral in vitro et in vivo dans plusieurs modèles de cancers, et est actuellement en essai de phase I (Clem et al., 2013). Enfin, des inhibiteurs de GLUT1 ont été testés uniquement en études précliniques chez l'animal: le STF-31 inhibe la croissance du cancer du rein (Chan et al., 2011) et le WZB117 celle du cancer pulmonaire (Liu et al., 2012b).

b) Métabolisme du pyruvate

Une étape clé dans la reprogrammation métabolique est l'utilisation du pyruvate pour la synthèse du lactate plutôt que par la mitochondrie. Deux enzymes majeures régulent cette réaction et constituent des cibles intéressantes dans les cancers, les protéines PKM2 et PDK1. Deux façons différentes de moduler PKM2 sont à l'étude, l'activation ou l'inhibition. Plusieurs molécules activatrices existent, qui permettent de stabiliser PKM2 sous forme de tétramères actifs, non phosphorylables par les tyrosines kinases. Ces activateurs inhibent la formation de lactate, les voies de biosynthèses en amont de PKM2 et ont un effet antiprolifératif in vivo et permettent de reprogrammer la cellule vers une oxydation du glucose (Anastasiou et al., 2012; Walsh et al., 2010). Plusieurs molécules inhibitrices sont en cours d'identification mais aucune n'a pour le moment été testée en études précliniques (Vander Heiden et al., 2010).

Le dichloroacétate (DCA) inhibe PDK1 et est utilisé en clinique dans les acidoses lactiques héréditaires. Il induit l'apoptose de plusieurs lignées cancéreuses (poumon, sein, glioblastome) et inhibe la pousse tumorale dans un modèle de xénotransplantation de cellules de cancer pulmonaire (Bonnet et al., 2007). Ces résultats ont conduit la même équipe à réaliser une étude de phase I/II dans les cancers du sein et du poumon, arrêtée précocement en raison d'une toxicité imputable au DCA. (Garon et al., 2014).

c) Métabolisme du lactate

La dernière étape de la glycolyse, c'est-à-dire la formation et l'efflux du lactate, est également étudiée comme cible pharmacologique. L'inhibition de LDHA par une molécule spécifique inhibe la croissance des tumeurs dépendantes de KRAS et de l'EGFR (Xie et al., 2014a). L'AZD3965, un inhibiteur du transporteur MCT1, retarde la croissance tumorale chez la souris et est actuellement en étude de phase I dans les cancers solides (Sonveaux et al., 2008).

2.3.2. Ciblage du métabolisme lipidique

Le ciblage de la synthèse lipidique est également une approche séduisante pour le traitement des cancers. Plusieurs inhibiteurs de la FASN (fatty acid synthase) ont été testés in vitro et in vivo : l'orlistat inhibe la croissance tumorale dans des modèles de xénotransplantation de cancers solides et augmente la chimiosensibilité au cisplatine des lymphomes T (Agostini et al., 2014; Kant et al., 2014) ; la cerulenin inhibe la formation de métastases de cancer pulmonaire chez la souris (Murata et al., 2010) et le TVB2640 est un inhibiteur de la FASN actuellement en cours d'essai de phase I. L'inhibition de l'ACLY est aussi à l'étude, puisque son invalidation par shARN inhibe la pousse tumorale et induit la différenciation glandulaire des cancers pulmonaires xénotransplantés ; elle induit par ailleurs la différenciation érythroïde de la lignée K562 in vitro (Hatzivassiliou et al., 2005; Migita et al., 2008). Le SB-204990, inhibiteur spécifique, a été testé chez la souris et reproduit ces effets dans un modèle de cancer du poumon (Hatzivassiliou et al., 2005).

2.3.3. Ciblage de la glutaminolyse

Plusieurs inhibiteurs de la glutaminolyse sont actuellement développés en études précliniques et cliniques. Leurs caractéristiques et effets sont détaillés plus loin (partie 3).

2.3.4. Les inhibiteurs spécifiques d'IDH1/2

La découverte des mutations d'IDH1 et IDH2 dans les LAM et les tumeurs gliales a été rapidement suivie de l'identification, par screening haut débit, d'inhibiteurs spécifiques des enzymes mutés. Deux molécules sont actuellement en cours d'essai de phase I/II dans les hémopathies myéloïdes (LAM et syndromes myélodysplasiques) et les tumeurs solides mutées pour IDH1 ou 2. L'AGI-6780, inhibiteur d'IDH2 R140Q, diminue la production de (R)-2HG et induit la différenciation de la lignée érythroleucémique TF-1 et de cellules primaires de LAM in vitro (Wang et al., 2013a). L'AGI-5198 est un inhibiteur d'IDH1 R132H testé initialement dans les tumeurs gliales (Rohle et al., 2013). A faible doses, il inhibe la production de (R)-2HG et la croissance tumorale in vivo. Utilisé à forte dose, il inhibe la méthylation des histones en H3K9 et induit l'expression de gènes de différenciation. D'autres inhibiteurs d'IDH1 sont en cours de développement préclinique. Le ML-309 est un inhibiteur d'IDH1 R132H qui bloque la synthèse de (R)-2HG de façon réversible mais présente peu d'effets cytotoxiques dans les tumeurs gliales (Davis et al., 2014). L'HMS-101 inhibe la formation de colonies de progéniteurs leucémiques dans les LAM mutées pour IDH1 R132, mais n'a pas d'effet sur les cellules normales CD34+ (Chaturvedi et al., 2013).

3.1. Glutamine et cancer Métabolisme de la glutamine

3.1.1. Schéma général

Avec le glucose, la glutamine est le deuxième substrat majeur du métabolisme des cancers, puisqu'elle permet de satisfaire les besoins en énergie et en macromolécules. Elle est l'acide aminé (AA) non essentiel le plus abondant de l'organisme et le plus consommé par les cellules tumorales (Daye et Wellen, 2012). La glutamine sérique transporte l'azote sous forme non toxique entre les tissus. L'azote est utilisé pour la synthèse des nucléotides, des hexosamines et d'autres AA, alors que la chaîne carbonée est métabolisée pour former le glutamate, lui-même précurseur du glutathion et des intermédiaires du cycle TCA (Figure 8).

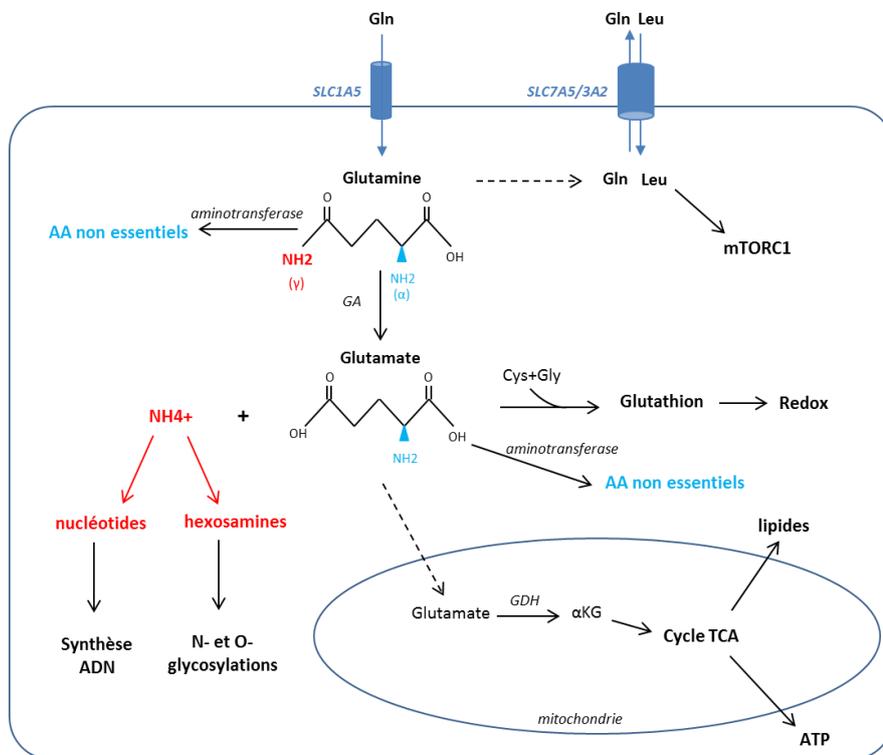


Figure 8. Schéma général du métabolisme de la glutamine. La glutamine (gln) entre dans la cellule par le transporteur SLC1A5, puis est soit échangée par le transporteur SLC7A5/3A2 pour permettre l'entrée de leucine, soit dégradée pour permettre la synthèse d'AA non essentiels. La glutaminase (GA) hydrolyse la gln en glutamate et le groupement azote en γ est alors utilisé pour la synthèse nucléotidique et celle des hexosamines. L'azote en α est utilisé soit à partir de la gln, soit à partir du glutamate pour la synthèse d'AA non essentiel via une réaction de transamination par des enzymes appelées aminotransférases. Le squelette carboné du glutamate participe à la synthèse du glutathion pour maintenir l'équilibre redox ou est à nouveau hydrolysé en α par la glutamate déshydrogénase (GDH) pour former l' α -cétoglutarate (α KG), intermédiaire du cycle TCA.

Dans les cancers, la glycolyse aérobie détourne le glucose du cycle TCA, et la glutamine devient alors indispensable pour maintenir la production d'ATP et de lipides nécessaires à la croissance. Dans plusieurs types cellulaires, notamment le foie et les muscles, la glutamine peut être synthétisée à partir

du glutamate par la glutamine synthétase (GS). Cette enzyme est présente de façon inconstante dans les tissus normaux et aussi dans les cancers, et la glutamine est alors importée du milieu extracellulaire par des transporteurs membranaires.

3.1.2. Transport de la glutamine

L'entrée de glutamine dans la cellule se fait de façon active et fait intervenir des transporteurs spécifiques. Les AA neutres, comme la glutamine, peuvent être transportés par 4 familles principales de transporteurs : les systèmes dépendants du Na⁺ A, ASC et N et le système L, indépendant du Na⁺. Ces transporteurs sont classés selon leur distribution dans les différents tissus et leur affinité pour les AA. Chez l'homme, plusieurs transporteurs de la glutamine ont été identifiés, le SLC1A5 (Solute linked carrier family 1 member A5), le SLC7A5 et le SLC38A2 étant les principaux transporteurs impliqués dans le métabolisme des cancers. En revanche, le transporteur mitochondrial de la glutamine n'a pas encore été identifié.

a) Le transporteur SLC1A5

SLC1A5, appelé aussi ASCT2 (pour alanine sérine cystéine transporteur 2), est un transporteur appartenant à la famille SLC1, qui comprend aussi 5 transporteurs du glutamate et un autre transporteur de la glutamine, le SLC1A4. Le gène *SLC1A5*, situé sur le chromosome 19, a été isolé en 1996 à partir de placenta humain (Kekuda et al., 1996). Il code pour une protéine de 541 AA, présentant 9 domaines transmembranaires. Il est exprimé dans de nombreux tissus sains : rein, intestin, cerveau, poumon, muscle, placenta et pancréas (Pochini et al., 2014). Dans la lignée d'hépatome HepG2, la glutamine peut réguler l'expression d'ASCT2 en activant un complexe transcriptionnel se fixant sur sa région promotrice (Bungard et McGivan, 2005). Son expression est également régulée en aval de plusieurs voies de signalisation : par l'EGF (epidermal growth factor) via les MAPK, par la voie PI3K et par les Rho-GTPases dans les cellules intestinales (Avissar et al., 2008), et également par l'insuline et l'IGF via PI3K, les kinases SGK et PKB/AKT dans un modèle d'ovocyte de xénope (Palmada et al., 2005). La régulation de SLC1A5 la plus clairement identifiée dans les cancers est celle exercée par l'oncogène C-MYC. Wise et al. ont montré, dans un modèle de tumeurs gliales, que l'expression du transporteur était inhibée lors de l'inactivation de C-MYC et que la protéine MYC interagissait directement avec la région promotrice du gène *SLC1A5* (Wise et al., 2008). Ces dernières années, une surexpression de ce transporteur a été retrouvée dans les cancers par plusieurs équipes, et constitue souvent un marqueur de mauvais pronostic (colon (Witte et al., 2002) ; poumon (Hassanein et al., 2013; Shimizu et al., 2014) ; mélanome (Wang et al., 2014a) ; langue (Toyoda et al., 2014)).

b) Les autres transporteurs de la glutamine

Deux autres transporteurs de la glutamine sont retrouvés surexprimés dans les cancers par rapport aux tissus normaux, le SLC7A5 et les SNATs (Sodium-Coupled Neutral Amino Acid Transporter) (Fuchs et Bode, 2005).

Le co-transporteur SLC7A5 permet l'efflux de glutamine en échange d'un AA (principalement la leucine, mais aussi le tryptophane, la phénylalanine, la thréonine ou l'histidine). Il s'agit d'une protéine de 507 AA appartenant au système L, indépendant du Na⁺, et qui fonctionne en hétérodimère avec la protéine SLC3A2 (appelée aussi 4F2c ou CD98). La protéine SLC7A5 est exprimé par presque tous les tissus sains (Pochini et al., 2014) et par de nombreux cancers où elle constitue le plus souvent un marqueur de mauvais pronostic (myélome (Isoda et al., 2014), prostate (Kaira et al., 2012; Patel et al., 2013; Segawa et al., 2013) ; foie (Li et al., 2013a) ; mésothéliome (Kaira et al., 2011) ; sein (Furuya et al., 2012) ; canaux biliaires (Yanagisawa et al., 2014) ; pharynx (Toyoda et al., 2014)). En revanche, sa régulation est encore peu connue.

Enfin, les transporteurs SNATs ou SLC38 regroupent plusieurs protéines qui appartiennent aux systèmes A et N (SNAT1, 2, 3, 5 et 7). Leur implication dans les cancers est peu connue. SNAT1 est présent dans les cancers gastriques (Xie et al., 2014b), hépatiques (Kondoh et al., 2007) et mammaires, où son expression est corrélée à un stade avancé et à la phosphorylation de la kinase AKT (Wang et al., 2013b). L'inhibition de SNAT2 dans la lignée de cancer du sein MCF7 a un effet antiprolifératif (Pinilla et al., 2011) et SNAT3 est un marqueur de malignité des tumeurs gliales (Sidoryk et al., 2004).

3.1.3. Synthèse de la glutamine : la glutamine synthétase

La glutamine synthétase (GS) est la seule enzyme permettant la formation de la glutamine. Elle est présente et active dans tous les tissus sauf l'intestin et le rein, et est produite en plus grande quantité par le foie, le muscle et les astrocytes. La GS est codée par le gène *GLUL* (glutamate amonia ligase) situé en 1q23 (Clancy et al., 1996). Elle est constituée de 8 sous-unités comportant chacune un site de fixation pour le glutamate, l'ammonium et l'ATP. De rares cas de mutations congénitales de *GLUL* inactivant l'activité de la GS ont été rapportés : les patients présentent des troubles neurologiques sévères le plus souvent létaux (Häberle et al., 2005). Dans les tumeurs hépatiques, son expression est régulée en aval de la voie Wnt/ β caténine et en coopération avec l'oncogène MET (Yuneva et al., 2012). Les cancers du sein de type luminal, non sensibles à la privation en glutamine, expriment fortement la GS (Kung et al., 2011). Enfin, la GS est un marqueur de bon pronostic dans le glioblastome, puisque les patients présentant une expression forte de la GS ont une survie globale prolongée (Rosati et al., 2013).

3.2. Rôle de la glutamine dans la synthèse protéique

La glutamine joue un rôle important dans la synthèse protéique, et ceci à 2 niveaux : comme donneur d'azote pour la synthèse d'AA non essentiels (AANE), et comme activateur indirect de la traduction via mTORC1.

3.2.1. Synthèse des AANE

La glutamine, et surtout le glutamate, sont donneurs d'azote pour la synthèse de plusieurs AANE : l'alanine, l'aspartate, et la sérine (Figure 8). Cette réaction est catalysée par les transaminases (alanine aminotransférase (ALAT) ; aspartate aminotransférase (ASAT), phosphosérine transaminase...), qui utilisent le groupement azoté en α et le transfèrent aux cétoacides. La glutamine est également cofacteur dans la synthèse d'asparagine à partir d'aspartate par l'asparagine synthase. Au total, la glutamine et le glutamate sont précurseurs de la synthèse de presque tous les AANE (à l'exception de la tyrosine) et ont donc un rôle majeur dans les synthèses protéiques.

3.2.2. Régulation du complexe mTORC1

La glutamine a été récemment décrite comme nécessaire à l'activation du complexe mTORC1 par les AA (Nicklin et al., 2009). Cette voie étant fréquemment dérégulée dans les cancers et notamment dans les LAM (Récher et al., 2005a; Tamburini et al., 2008), la glutamine pourrait avoir un rôle oncogénique via mTORC1 et la traduction.

a) Le complexe mTORC1 : généralités

La protéine mTOR est une sérine/thréonine kinase de 280KDa appartenant à la famille des PI3K related protein (PIKK). MTOR existe au sein de deux complexes multiprotéiques distincts, mTORC1 et mTORC2. MTORC1 comprend mTOR, regulatory associated protein of mTOR (raptor), mammalian lethal with SEC13 protein 8 (mLST8), AKT/PKB substrate 40 kDa (PRAS40) et DEP domain containing mTOR-interacting protéin (Deptor). Raptor est indispensable au fonctionnement de la kinase puisqu'elle permet la formation du complexe mTORC1 et le recrutement des substrats qui vont être phosphorylés par mTORC1. PRAS40 et Deptor ont des propriétés inhibitrices alors que mLST8 ne semble pas indispensable au fonctionnement du complexe (Hara et al., 2002; Kim et al., 2013a). Le complexe MTORC2 comporte les protéines Rictor (pour Raptor-independent companion of mTOR), mSin1, mLST8, Protor1 et Deptor et active entre autres la protéine kinase AKT qu'il phosphoryle sur la tyrosine 308 et participe à la formation du cytosquelette d'actine.

i. Régulation

mTORC1 agit comme un intégrateur de différents signaux cellulaires permettant ou non croissance et prolifération : il est activé par les facteurs de croissance et les AA et inhibé par la baisse du niveau d'énergie ou d'oxygène (Figure 9). Les mécanismes d'activation de mTORC1 en aval des facteurs de croissance sont bien caractérisés : l'activation du récepteur conduit à l'activation de la voie PI3K qui phosphoryle la kinase AKT ; AKT phosphoryle et inhibe le complexe hétérodimérique tuberous sclerosis complex protein 2 (TSC2)-TSC1 qui possède une activité GTPase pour Ras homolog enriched in brain (Rheb), activateur direct de mTORC1. Au total, la voie PI3K-AKT permet l'activation de mTORC1. La deuxième voie de modulation la plus décrite est l'inhibition de mTORC1 par la baisse d'énergie. Lorsque le ratio AMP/ATP augmente, la sérine-thréonine kinase AMP-activated protein kinase (AMPK) est activée et régule négativement mTORC1 en phosphorylant deux substrats : TSC2 (activé par phosphorylation sur la serine 1345) et Raptor (sa phosphorylation entraîne sa liaison à la protéine 14-3-3) et induit la dissociation du complexe (Gwinn et al., 2008; Inoki et al., 2003). Enfin, la troisième voie d'activation la plus récemment décrite est celle en aval des AA, détaillée plus loin.

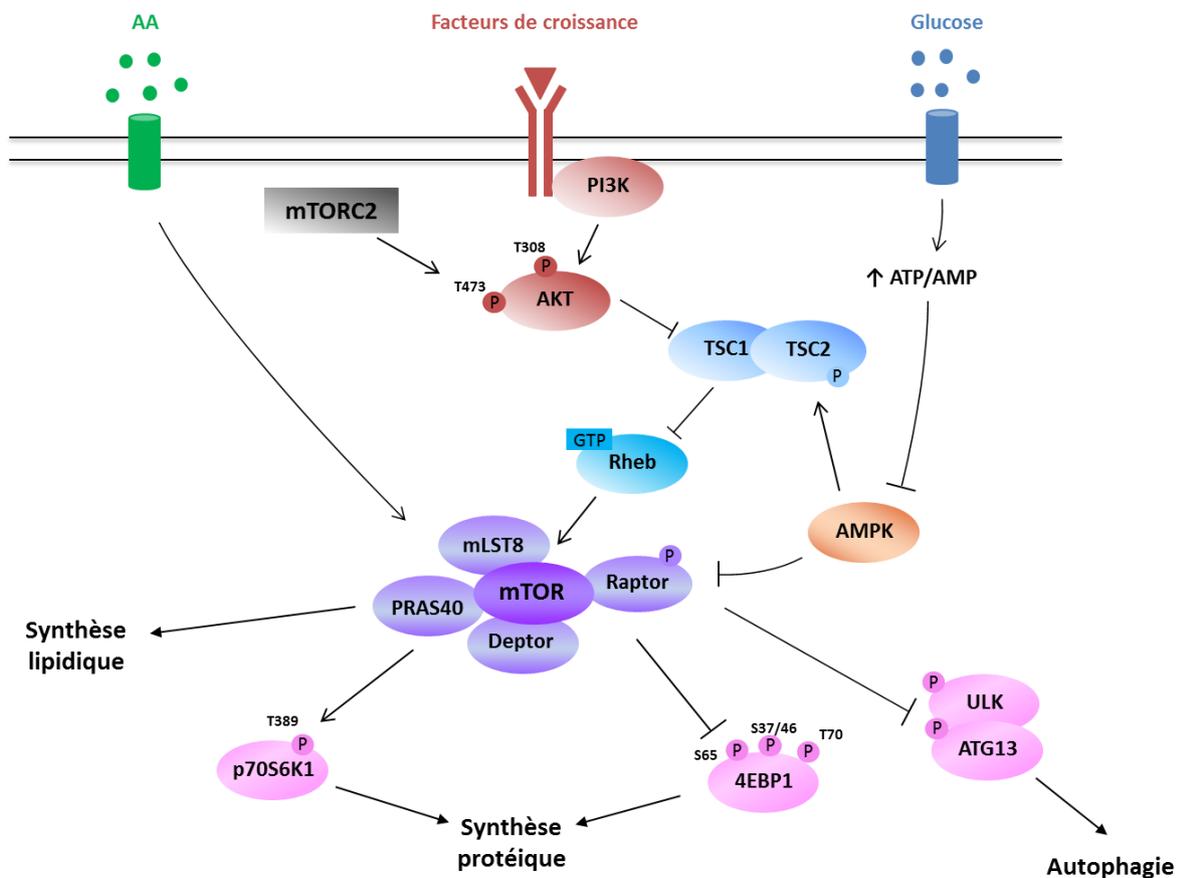


Figure 9. La voie mTORC1. La sérine thréonine kinase mTOR s'associe à Raptor, mLST8, PRAS40 et Deptor pour former le complexe mTORC1. mTORC1 est activé en aval de plusieurs signaux extra et intracellulaires. La fixation de facteurs de croissance à leurs récepteurs active la voie PI3K/AKT,

AKT inhibe l'hétérodimère TSC1/TSC2 lui-même activateur de Rheb ce qui permet l'activation de mTORC1. Un ratio AMP/ATP élevé active la kinase AMPK, qui inhibe mTORC1 soit directement par phosphorylation de Raptor, soit via TSC2. Enfin, les AA sont indispensables à l'activation de mTORC1. mTORC1 intègre ces signaux pour promouvoir la biosynthèse : activation de la synthèse protéique via p70S6K1 et 4EBP1, activation de la synthèse lipidique et inhibition de l'autophagie. AA: acides aminés, mTOR : mammalian target of rapamycine, PI3K : phosphatidylinositol-3-kinase, AKT: PKB, protein kinase B, TSC: tuberous sclerosis complex, Rheb: small G protein Ras homologue enriched in brain, mLST8 : mammalian lethal with SEC13 protein 8, PRAS40 : proline-rich Akt substrate of 40-kDa, Raptor : regulatory associated protein of mTOR, Deptor: DEP domain containing mammalian target of rapamycin (mTOR)-interacting protein, AMPK: Adenosine monophosphate-activated protein kinase, p70S6K1: p70 ribosomal S6 kinase 1, 4EBP1: eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1, ULK: unc51-like kinase 1, ATG: autophagy related gene

ii. Cibles et fonctions

mTORC1 possède de nombreux substrats impliqués dans la synthèse protéique, la biosynthèse des lipides et des nucléotides et dans l'autophagie. Ses principaux substrats directs sont les protéines p70 ribosomal S6 kinase 1 (p70S6K1) et eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1 (4EBP1).

mTORC1 active la sérine-thréonine kinase p70S6K1 par phosphorylation sur la thréonine 389, qui phosphoryle à son tour de nombreux substrats, parmi lesquels la protéine S6 ribosomale (rpS6), composante de la sous-unité ribosomique 40s, indispensable à la traduction des protéines. p70S6K1 module également la synthèse des bases pyrimidiques en régulant l'activité du complexe enzymatique CAD (carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamoylase, dihydroorotase) par phosphorylation directe sur la serine 1859 (Robitaille et al., 2013; Ben-Sahra et al., 2013).

La deuxième protéine impliquée dans la traduction en aval de mTORC1 est 4EBP1, qui est un répresseur traductionnel puisqu'elle inhibe le complexe d'initiation de la traduction en se fixant sur l'eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) à la place d'eIF4G. Une fois phosphorylée sur 3 sites (dans l'ordre chronologique : Thr 37/46, Ser 65 puis T70), 4EBP1 se détache d'eIF4E ce qui permet la traduction des ARNm munis d'une structure cap dans leur partie 5' terminale (Gingras et al., 2001). mTORC1 est responsable du premier évènement de phosphorylation, qui est lui-même indispensable aux 2 autres et à l'inhibition complète de 4EBP1.

Deux autres substrats de mTORC1 bien décrits sont unc51-like kinase 1 (ULK) et autophagy related gene 13 (ATG13), protéines impliquées dans l'autophagie. En les phosphorylant, mTORC1 inhibe la formation du complexe ULK-ATG13 indispensable à la première étape de l'autophagie, la formation du phagosome. mTORC1 régule également plusieurs protéines impliquées dans le métabolisme lipidique dont le facteur de transcription SREBP1, Lipin-1 (régulateur négatif de SREBP1) (Peterson et al., 2011) et PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) (Laplante and Sabatini, 2009).

iii. Régulation de mTORC1 en aval des AA

La première observation suggérant un lien entre la disponibilité en AA et mTORC1 a été faite en 1995 sur des hépatocytes dans lesquels la privation en AA entraînait une déphosphorylation de p70S6K1 (Blommaert et al., 1995). Deux équipes ont ensuite confirmé cette observation, en montrant l'activation de mTORC1, de la p70S6K1 et l'initiation de la traduction par les AA, par un mécanisme non connu mais inhibé par de fortes doses de rapamycin (Hara et al., 1998; Wang et al., 1998). Parmi tous les AA, la privation en leucine et en arginine avaient le plus d'effet sur l'activité kinase de p70S6K1 (Hara et al., 1998). Ce contrôle semble en partie indépendant de TSC2 puisque la privation en AA inhibe mTORC1 dans des cellules TSC2^{-/-} (Smith et al., 2005), mais pas autant que dans des cellules TSC2^{+/+} (Gao et al., 2002).

En 2008, la découverte du rôle des protéines Rag a permis d'avancer dans les mécanismes de régulation de mTORC1 (Figure 10). Les protéines Rag appartiennent à la famille des Rag GTPases qui comprend 4 membres : RagA, RagB, RagC et RagD. Elles fonctionnent en hétérodimères : RagA ou RagB liant RagC ou RagD. Chez la drosophile, les protéines Gtr1p et Gtr2p sont les homologues de RagA/B et RagC/D respectivement. Pour être actifs, les dimères doivent se présenter sous la forme RagA/B-GTP et RagC/D-GDP (ou Gtr1p-GTP et Gtr2p-GDP). Deux équipes ont montré, chez l'homme et la drosophile, que la présence de RagA/B sous forme activée liant le GTP était nécessaire et suffisante à l'activation de mTORC1 par les AA (Kim et al., 2008b; Sancak et al., 2008). En effet, mTORC1 est inhibé même en présence d'AA quand RagA ou RagB sont constitutivement inactifs (donc liant GDP), et activé même en absence d'AA quand RagA ou RagB sont constitutivement actifs (donc liant GTP). En revanche, les mutants inactifs de RagC et RagD n'auraient pas d'effet drastique, et pourraient agir comme co-stimulateurs, renforçant l'effet des RagA/B (Sancak et al., 2008). De plus, les AA augmentent la forme RagA/B GTP par rapport à la forme GDP.

Les Rag n'activent pas directement mTORC1 mais agissent sur sa localisation en interagissant avec la protéine Raptor (Sancak et al., 2008). En présence d'AA et de protéines Rag actives, mTORC1, initialement réparti de façon diffuse dans le cytoplasme, est relocalisé à la membrane du lysosome, où il peut interagir avec son activateur Rheb, qui y est présent de façon constitutive (Bar-Peled et al., 2012). Au contraire, en condition de privation en AA, les RagA/B-GDP recrutent TSC2 au lysosome pour inhiber Rheb et donc mTORC1 (Demetriades et al., 2014).

Entre 2010 et 2013, l'équipe de Sabatini a identifié plusieurs partenaires régulant l'activité des protéines Rags. Le premier est un complexe multiprotéique baptisé Ragulator, situé à la membrane du lysosome au contact des Rag, indispensable à la régulation de mTOR par les AA (Bar-Peled et al., 2012; Sancak et al., 2010). Le Ragulator comporte 5 protéines (p18, p14, MAPK scaffold protein 1 (MP1), C7orf59 et hepatitis B virus X interacting protein (HBXIP), codés par les gènes *LAMTOR 1* à 5 respectivement), identifiées par immunoprécipitation puis spectrométrie de masse à partir des protéines Rag taguées. Ces protéines régulent l'activation de mTORC1 de 2 façons : elles ont une

activité GEF (guanine exchange factor) pour RagA/B-GDP et les maintiennent au lysosome proche de mTORC1. En présence d'AA, le Ragulator active et libère les RagA/B-GTP qui permettent alors l'activation de mTORC1. En plus de ce complexe activateur, un autre complexe régulateur appelé GATOR a été décrit en 2013 (Bar-Peled et al., 2013). GATOR est composé de 2 sous-unités, GATOR1 (DEPDC5, Npr12, et Npr13) et GATOR2 (Mios, WDR24, WDR59, Seh1L, et Sec13) ; GATOR2 inhibe GATOR1 qui lui-même inhibe mTORC1, puisqu'il a une activité GTPase pour RagA/B. L'inhibition des composants de GATOR1 rend mTORC1 actif malgré une privation en AA. Enfin, la protéine Folliculine (FLCN) et son partenaire FNIP1 (folliculin interacting protein) ont été identifiés comme ayant une activité GAP pour RagC/D (Tsun et al., 2013). Contrairement à d'autres études, la protéine RagC liée au GDP est dans ce modèle indispensable à l'association mTORC1-Rag et à l'activation de mTORC1 à la surface du lysosome.

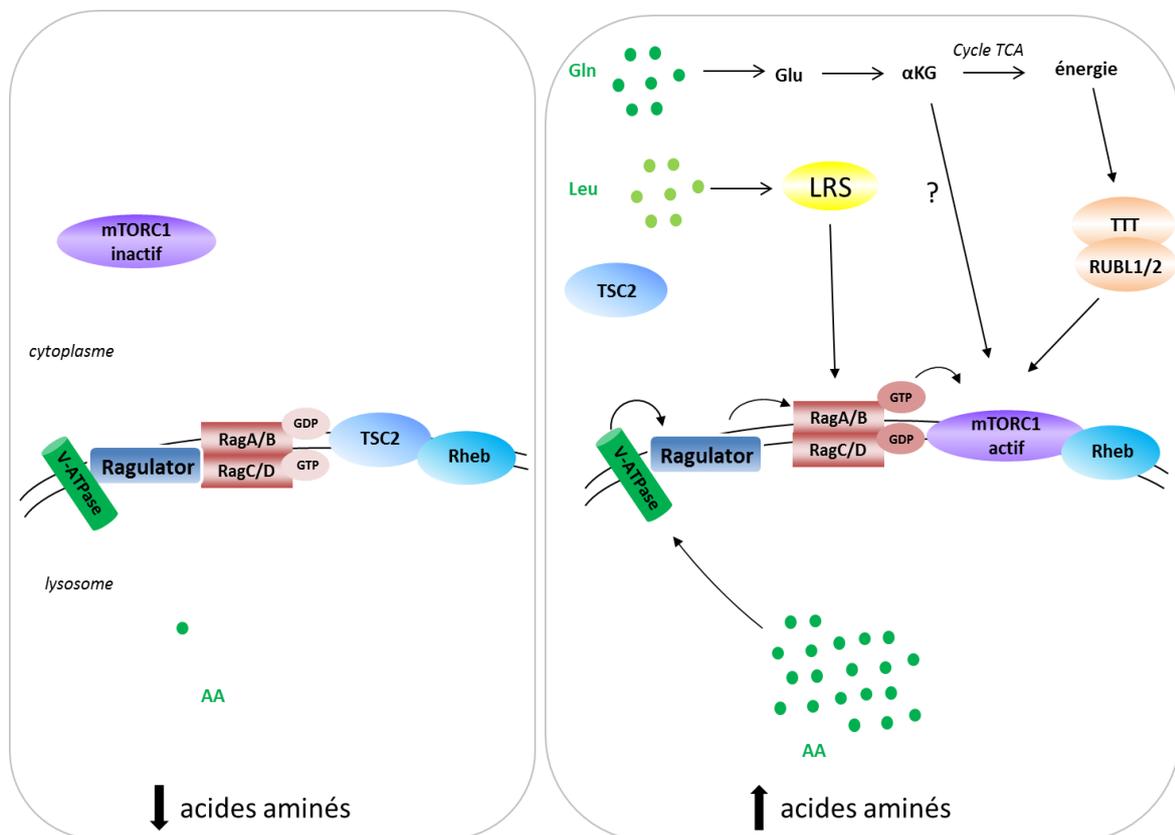


Figure 10. Régulation de mTORC1 par les AA. En absence d'AA, le complexe mTORC1 est localisé de façon diffuse dans le cytoplasme, loin de son activateur Rheb. Les protéines Rag et le ragulator sont inactifs : RagA/B lie le GDP alors que les Rag C/D lie le GTP, ce qui permet la localisation de TSC2 au lysosome. La présence d'AA est perçue par le Ragulator via la v-ATPase, ce qui active les Rag et permet le recrutement de mTORC1 au lysosome et son activation par Rheb. La leucine est perçue par la LRS qui active les Rag. La glutamine augmente l'énergie intracellulaire en aval du cycle TCA, ce qui active mTORC1 via le complexe TTT/RUBL1/2 ou par l' α KG par un mécanisme non connu. *Gln* : glutamine, *Leu* : leucine, α KG : alpha-cétoglutarate, *TSC* : tuberin sclérosis complex, *LRS* : leucyl-tARN synthétase.

La méthode de détection de la quantité d'AA disponibles pour activer ou non mTORC1 reste encore inconnue. Elle pourrait avoir lieu dans le lysosome, puisque une fraction purifiée de lysosome est capable de recruter la protéine Raptor en présence d'AA (Zoncu et al., 2011). Par screening d'ARN interférence de gènes connus pour avoir un rôle dans les fonctions lysosomales, Zoncu et al. ont identifié la vacuolar H⁺-adenosine triphosphatase (v-ATPase) comme étant indispensable à l'activation de mTORC1 par les AA. La v-ATPase est une pompe à protons qui permet l'acidification de la lumière lysosomale. Sa partie cytosolique V1 est responsable de l'hydrolyse de l'ATP, qui entraîne la rotation du domaine membranaire V0 et le transport de protons dans le lysosome. Son inhibition spécifique par la concanavaleine A ou par interférence ARN d'une de ses sous unités rend impossible l'activation de mTORC1 par les AA. De plus, elle interagit directement avec le Ragulator (p14 et p18), et cette interaction est diminuée en présence d'AA. Le flux d'AA lysosomal pourrait également être régulé par un autre type de transporteur, de la famille des proton-assisted amino-acid transporters (PAT). PAT1 est un transporteur intracellulaire, décrit comme pouvant être localisé à la surface lysosomale, et dont l'inhibition par ARN interférence empêche l'activation de mTORC1 par les AA (Heublein et al., 2010).

Enfin, un mécanisme différent et indépendant du lysosome a été proposé simultanément par deux équipes, dans lequel le niveau de leucine est détecté via la leucyl-tARN synthétase (LRS), enzyme qui charge la leucine sur son ARN de transfert (Bonfils et al., 2012; Han et al., 2012). Chez le mammifère, une LRS fonctionnelle est indispensable à l'activation de mTORC1 par les AA et agit comme GAP pour RagD (Han et al., 2012). Chez la levure, le mécanisme est différent puisque la LRS hydrolyse Gtr1, l'homologue de RagA/B (Bonfils et al., 2012).

iv. Régulation de mTORC1 par la glutamine

Bien que n'activant pas directement mTORC1, le métabolisme de la glutamine a un rôle majeur dans sa régulation. L'entrée de glutamine dans la cellule par le transporteur SLC1A5 permet ensuite l'entrée de la leucine par le transporteur bidirectionnel SLC7A5/SLC3A2. La leucine étant indispensable à l'activation de mTORC1 par la voie des AA, l'absence de glutamine ou l'inhibition des transporteurs inactive mTORC1 et induit l'autophagie (Nicklin et al., 2009). Ce mécanisme d'activation semble indépendant de la glutaminolyse, puisque la présence de glutamate ou d' α KG ne permet pas dans ce modèle d'activer mTORC1 par les AA, contrairement à la glutamine. Cependant, deux équipes ont retrouvé une connexion directe entre mTORC1 et glutaminolyse, en aval de la glutamine et indépendamment de la leucine. Duran et al. ont montré que l'inhibition des enzymes glutaminase (GA) ou glutamate déshydrogénase (GDH) diminuait la charge en GTP de RagB, conduisant à la délocalisation de mTORC1 du lysosome (Durán et al., 2012). Dans cette étude, la leucine était nécessaire à l'activation mTORC1 en tant que régulateur allostérique de la GDH, et l' α KG seul pouvait activer mTORC1. Dans l'autre modèle proposé par Kim et al., l'ATP fourni par le cycle TCA en aval de la glutaminolyse ou de la glycolyse permet la stabilisation de mTORC1 indépendamment

de l'AMPK ou de TSC2 (Kim et al., 2013b). La privation simultanée en glutamine et glucose délocalise mTORC1 du lysosome même en présence d'un mutant actif de RagB. Le complexe TTT-RUVBL1/2 a été identifié par screening d'ARN interférence comme étant le lien entre l'ATP et mTORC1. En présence d'ATP, le complexe protéique TTT (composé de Tel2, Tti1, et Tti2) s'associe aux RUVBL1/2 ATPases, ce qui permet l'interaction de mTOR avec Tel2 d'une part et RagB d'autre part. Cependant, la localisation forcée de mTORC1 au lysosome par une protéine chimérique Raptor-Rheb, qui confère une activation constitutive de mTORC1 même en condition de privation en AA, ne rend pas son activation indépendante du niveau d'énergie. Les auteurs montrent que le complexe TTT-RUVBL1/2 permet la dimérisation de mTORC1, indispensable à son activité catalytique.

c) Rôle de mTORC1 dans les LAM

Plusieurs études ont montré qu'il existe une activation de mTORC1 dans les LAM (Récher et al., 2005b; Tamburini et al., 2008; Xu et al., 2003), de façon indépendante de la voie PI3K/AKT, puisque l'inhibition de spécifique de la voie PI3K dans des cellules primaires de LAM n'inhibe pas la signalisation mTORC1. mTORC1 pourrait être activé en aval de Lyn (Dos Santos et al., 2008) ou résulter d'une dérégulation de TSC2 par hyperméthylation de son promoteur (Xu et al., 2009), mais le mécanisme exact d'activation n'est pas encore identifié. Dans un modèle murin, la déplétion de TSC1 entraîne une augmentation de la prolifération des cellules souches hématopoïétiques et leur entrée en cycle accompagnée d'une diminution de leur capacité de repopulation à long terme (Chen et al., 2008; Gan et al., 2008). Lorsque la protéine Raptor est délétée dans des cellules transformées par l'oncogène MLL-AF9, les souris présentent une diminution du nombre de cellules blastiques dans le sang périphérique en rapport avec une apoptose importante. Cependant, mTORC1 n'est pas indispensable à la leucémogénèse, puisque la réexpression de Raptor permet la réexpansion du clone leucémique, soulignant la persistance d'une cellule souche leucémique dans la population Raptor -/- (Hoshii et al., 2012).

Plusieurs inhibiteurs de mTORC1 sont actuellement en cours d'évaluation en phase clinique, en association ou non avec la chimiothérapie. Il s'agit soit d'inhibiteurs spécifiques de mTORC1, comme le sirolimus (rapamycine), soit d'inhibiteurs moins spécifiques, à activité inhibitrice de l'activité kinase de mTOR, touchant également mTORC2 ou l'activité PI3K/Akt (AZD8055, PP242, NVP-BEZ235, etc). La rapamycine, qui est un inhibiteur allostérique de mTORC1, a uniquement un effet antiprolifératif probablement parce qu'elle ne permet pas d'inhiber les phosphorylations de la protéine cible 4EBP1 et n'inhibe donc pas complètement la traduction (Tamburini et al., 2009). Chez les patients, son association avec la chimiothérapie pourrait toutefois améliorer la réponse au traitement (Park et al., 2013). Les inhibiteurs de deuxième génération, ou Torkinhib, inhibent complètement la phosphorylation des substrats de mTORC1 en agissant sur son activité catalytique et induisent une apoptose plus marquée in vitro mais possiblement parce qu'ils inhibent aussi fortement le complexe

mTORC2 ou la PI3K (Chapuis et al., 2010; Willems et al., 2012). Ils sont actuellement en cours d'essais de phase I/II.

Le ciblage de mTORC1 par la voie des AA, indépendante de PI3K, pourrait donc constituer une autre approche intéressante dans les LAM.

3.3. La glutaminolyse

3.3.1. Utilisation des produits de la glutaminolyse

Après son entrée dans la cellule, la glutamine est rapidement dégradée pour être utilisée dans de nombreuses voies anaboliques et métaboliques. La première étape nécessaire à ces voies est la transformation de la glutamine en glutamate et en ammonium par les glutaminases lors de la glutaminolyse. Cette réaction permet de produire le glutamate à partir du squelette carboné alors que l'azote en gamma est utilisé dans la voie des hexosamines et la synthèse des bases (Figure 8).

a) Voie des hexosamines

Le groupement amide (azote en γ) de la glutamine peut être ajouté au fructose-6-phosphate par la glutamine-fructose-6-phosphate amidotransférase pour former du glucosamide-6-phosphate, première étape de la voie de synthèse des hexosamines (glucosamide dans ce cas). Le produit final de cette voie, l'uridine diphosphate N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc), est utilisé comme substrat pour les réactions de N- et O-glycosylations. La N-glycosylation a lieu dans le réticulum endoplasmique et consiste à ajouter un groupement glucidique sur un résidu asparagine des protéines en cours de traduction. L'O-glycosylation est réalisée dans l'appareil de Golgi par l'enzyme O-linked N-acetylglucosamine transferase (OGT) et correspond également à l'ajout d'un sucre, mais cette fois sur les thréonines et/ou sérines des protéines, sur des sites pouvant également être phosphorylés. Cette modification post-traductionnelle a un rôle majeur car elle peut modifier les fonctions protéiques comme l'activité catalytique, la localisation ou la fonction transcriptionnelle. Dans les cancers, l'OGT ainsi que des gènes de la voie des hexosamines sont retrouvés surexprimés (Itkonen et al., 2013) et de nombreuses protéines impliquées dans le métabolisme ou l'épigénétique sont O-glycosylées (Hanover et al., 2012; de Queiroz et al., 2014).

b) Synthèse des acides nucléiques

L'azote en γ de la glutamine est également utilisé dans la synthèse des acides nucléiques. Les bases pyrimidiques et puriques contiennent respectivement 1 et 2 groupements amides issus de la glutamine. L'utilisation accrue de glutamine par les cellules cancéreuses pourrait être lié en partie à son rôle dans

la synthèse de l'ADN pour maintenir les cellules en prolifération. Dans un modèle de fibroblastes transformés par KRAS, la privation en glutamine entraîne un blocage des cellules en début de phase S, et la prolifération est restaurée par l'ajout de nucléotides (Gaglio et al., 2009). Par ailleurs, l'expression de l'enzyme glutaminase varie au cours du cycle cellulaire, avec une expression plus forte pendant la phase S qui diminue ensuite en G2/M (Colombo et al., 2010).

c) Lutte contre le stress oxydatif par le glutathion

Le glutathion (GSH) est un tripeptide composé d'une molécule de glutamate, d'une cystéine et d'une glycine (γ -L-Glutamyl-L-cystéinyglycine). Sa synthèse a lieu dans le cytosol et se fait en deux étapes : la formation de γ -glutamyl-cystéine par la γ -glutamate-cystéine ligase puis l'ajout de glycine par la GSH synthétase. La glutamine a un rôle majeur dans la formation du glutathion, puisque le glutamate sert également à importer la cystine extracellulaire, précurseur de la cystéine, via le co-transporteur SLC7A11, et que la disponibilité en cystéine est le facteur limitant de la formation du GSH. Le glutathion existe sous forme réduite (GSH) ou oxydée (GSSG) et permet de protéger la cellule contre le stress oxydant induit par les ROS.

d) Cycle TCA

Enfin, le glutamate issu de la glutaminolyse peut être transformé en α KG par l'enzyme glutamate déshydrogénase (GDH) ou par les transaminases (ASAT et ALAT). Dans les cancers, comme vu précédemment, l'utilisation préférentielle du pyruvate pour la synthèse de lactate rend la glutamine et ses intermédiaires nécessaires au maintien d'un cycle TCA actif.

3.3.2. Les glutaminases

L'hydrolyse de la glutamine en glutamate a été décrite pour la première fois par Krebs en 1935, qui décrivait l'existence d'au moins deux types de glutaminases (GA), différentes par leur propriétés biochimiques et leurs localisations tissulaires : la « brain ou kidney type » et la « liver type » (Krebs, 1935). L'identification précise de ces enzymes n'a été faite qu'à partir des années 1980, d'abord chez le rat puis chez l'homme. Actuellement, deux types de GA comportant chacune plusieurs isoformes sont identifiées : la kidney-type GA (KGA, appelée aussi plus simplement GLS1) et la liver-type GA (LGA, appelée aussi GLS2), qui sont codées par deux gènes différents.

a) La KGA (ou GLS1, gène *GLS*)

i. Structure

La GLS1 est codée par le gène *GLS* et son locus a été découvert en 1989 sur le chromosome 2 (Mock et al., 1989). Le cDNA a été isolé par hasard en 1998 à partir d'une librairie de cerveau humain et

identifié grâce à son homologie avec le cDNA de rat (Nagase et al., 1998). En 1999, l'équipe de N. Curthoys a réalisé le clonage de la GLS1 humaine et découvert 3 isoformes ayant l'extrémité N-terminale commune et issues d'épissages alternatifs, qu'ils ont appelées KGA, glutaminase C (GAC) et GAM (Elgadi et al., 1999). La KGA et la GAC sont des protéines de respectivement 669 aa et 598 aa. La GAM a une séquence de 169 aa uniquement, dont les 72 premiers sont clivés lors de l'entrée dans la mitochondrie, laissant une protéine tronquée de moins de 11kDa ne pouvant a priori pas avoir de fonction glutaminase. Cette isoforme est retrouvée uniquement dans le cœur et le muscle squelettique, tissus à activité glutaminase limitée. Cet épissage préférentiel pourrait représenter un moyen de limiter la glutaminolyse dans ces tissus.

Les structures cristallographiques des deux autres protéines (KGA et GAC) ont été réalisées et ont permis de mieux comprendre leurs fonctions (Cassago et al., 2012; DeLaBarre et al., 2011; Ferreira et al., 2013; Thangavelu et al., 2014) (Figure 11). Les 16 premiers résidus représentent une séquence d'adressage à la mitochondrie. Entre les résidus 144 et 149, on retrouve un motif LXXLL correspondant à une Nuclear Receptor Box (NR box) dont le rôle n'est pas connu. Le domaine enzymatique est situé entre les résidus 249 et 535, puis leurs séquences diffèrent à partir de l'AA 550. La KGA comporte 3 domaines de répétition ankyrine entre les résidus 556 et 656, puis une KEN box et une D box (séquence potentiellement reconnues par l'ubiquitine ligase Anaphase-Promoting Complex (APC/C)). L'extrémité C-terminale de la GAC ne présente pas de séquence particulière. Les deux isoformes sont actives à l'état de tétramères, formés en présence de phosphate inorganique à partir de dimères inactifs (Godfrey et al., 1977). Les sites d'interaction pour former les dimères et les tétramères sont situés dans la partie catalytique. La GAC activée forme ensuite une superstructure polymérique composée de multiples tétramères (Ferreira et al., 2013).

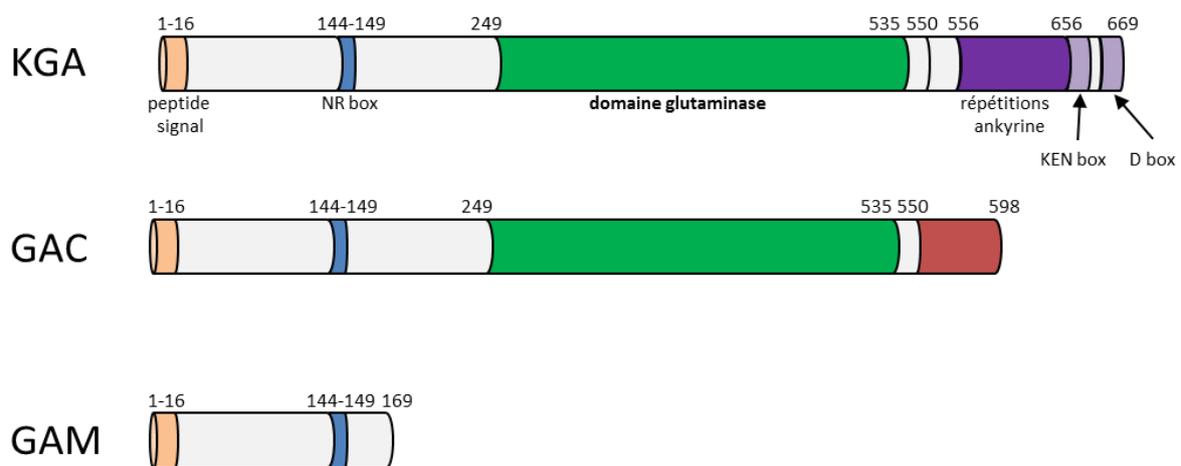


Figure 11. Structures des 3 isoformes de la glutaminase 1. NR box: Nuclear Receptor Box

ii. Fonction

Le KO du gène *GLS* chez la souris a permis de mieux comprendre les fonctions de l'enzyme (Masson et al., 2006). La glutamine est responsable de 70% de la synthèse de glutamate au niveau des neurones, et la *GLS1* est indispensable à la transmission synaptique glutamatergique. En effet, les souris *GLS*^{-/-} présentent des troubles du comportement entraînant l'absence de lactation associés à des troubles respiratoires à type d'hypoventilation, entraînant leur décès 36h après leur naissance. Les souris hétérozygotes sont viables et présentent uniquement des troubles modérés des fonctions hippocampiques et une insensibilité aux drogues pro-psychotiques (Gaisler-Salomon et al., 2009). Ces résultats sont obtenus par des équipes travaillant dans le domaine de la neurologie et l'effet de la déplétion de *GLS* sur d'autres fonctions biologiques n'a pas été analysé. Le rôle de la *GLS1* est décrit dans d'autres organes : elle permet la dégradation de l'ammoniaque par le rein (Curthoys and Watford, 1995) et est nécessaire à la prolifération des cellules intestinales (McCauley et al., 1999).

iii. Expression tissulaire normale et tumorale

Les deux isoformes de la *GLS1*, *KGA* et *GAC*, sont fonctionnelles et ont une répartition tissulaire différente. La *KGA* est surtout retrouvée dans les tissus non tumoraux avec une expression ubiquitaire mais plus marquée dans le rein, le cerveau, l'intestin et le poumon. La *GAC* est présente dans des cellules normales (cerveau, cœur, pancréas, placenta, poumon) mais est surtout retrouvée surexprimée dans de nombreux types de cancers (cerveau, sein, colon, prostate poumon, lymphome B). Dans le poumon, les 2 isoformes sont exprimées à l'état normal mais seule la *GAC* est surexprimée dans les cancers, alors que la *KGA* a une expression diminuée (van den Heuvel et al., 2012). La *GAC* est surexprimée dans les tumeurs cérébrales de haut grade (glioblastomes multiformes et astrocytomes anaplasiques) par rapport aux cellules gliales normales, alors que l'expression de la *KGA* ne varie pas (Szeliga et al., 2005). Enfin, alors que les deux isoformes sont surexprimées dans les cancers du sein par rapport au tissu sain, et ceci de façon proportionnelle au grade histologique (Cassago et al., 2012), seule la *GAC* est surexprimée dans les cancers du sein triple négatifs (c'est-à-dire sans expression de récepteurs hormonaux ou d'HER2) (Gross et al., 2014).

Les deux enzymes ont des propriétés enzymatiques différentes pouvant expliquer l'expression préférentielle de la *GAC* dans les cancers. En effet, les deux *GLS1* sont actives uniquement en présence de phosphate inorganique (Pi), mais l'affinité de la *GAC* pour la glutamine est très augmentée à des concentrations en Pi élevées (Cassago et al., 2012). Le Pi est utilisé par l'ATP synthase lors de la production d'ATP et doit donc s'accumuler lorsque le cycle TCA et la chaîne respiratoire sont inhibés, comme c'est le cas en hypoxie. Bien que le taux exact de Pi dans les mitochondries des cellules cancéreuses n'ait jamais été précisément mesuré, l'expression préférentielle de la *GAC* par rapport à la *KGA* pourrait être un mécanisme d'adaptation pour renforcer l'anaplasie

glutamique. De plus, l'extrémité C-terminale de la GAC pourrait participer à la stabilisation des tétramères et expliquer l'activité enzymatique plus importante de cette isoforme (DeLaBarre et al., 2011).

Par ailleurs, la KGA ne semble pas être constamment localisée à la mitochondrie dans les cancers. En effet, Cassago et al. ont montré que la KGA était retrouvée dans le cytosol dans des lignées de cancer du sein, du poumon et de la prostate, alors que la GAC y est mitochondriale. Les auteurs font l'hypothèse que la présence en C-terminal de domaines de répétition ankyrine uniquement sur la KGA pourrait expliquer la rétention cette isoforme en dehors de la mitochondrie, ces domaines étant connus pour favoriser les interactions protéines-protéines et participer à la régulation transcriptionnelle (Cassago et al., 2012).

iv. Régulation

Les mécanismes de régulation de l'expression et de l'activité enzymatique des deux isoformes de GLS1 ne sont pas encore bien connus. Dans les cellules rénales normales, l'ARNm de la GLS1 est augmenté en réponse à l'acidose grâce à une séquence de type « pH-response element » située en 3'UTR, qui permet la fixation de la pH-RE binding protein (Laterza et Curthoys, 2000). La GLS1 est également régulée en aval du TGF β via la voie ERK/p38MAPK (Andratsch et al., 2007). La KGA est exprimée de façon différente en fonction des phases du cycle cellulaire. Elle est augmentée en milieu-fin de phase G1 puis reste élevée pendant toute la phase S (Moncada et al., 2012). Cette expression serait régulée par le complexe E3 ubiquitine ligase APC/C-cadherin 1 (cdh1), diminué en milieu de phase G1 (Colombo et al., 2011). APC/C-Cdh1 cible des protéines présentant une séquence KEN box (Lys-Glu-Asn) ou D box (Arg-XX-Leu-XX-asp), et entraîne leur dégradation par le protéasome. Ce mécanisme de régulation ne concernerait que la KGA, la GAC n'ayant pas de séquence KEN ou D box. La GAC peut être détruite par la sérine protéase mitochondriale Lon en réponse à un agent toxique, l'acide diphenylarsinique (DPAA). Dans une lignée d'hépatocarcinome, le DPAA dissocie les tétramères de GAC, ce qui entraîne leur reconnaissance et leur dégradation par la protéase Lon, par l'intermédiaire de la protéine Hsp70 mitochondriale (Kita et al., 2012).

Le mécanisme de régulation le plus clairement identifié fait intervenir l'oncogène C-MYC. Dans des lignées de lymphome B et de cancer de prostate, Gao et al. ont montré que l'expression de la GAC était contrôlée par C-MYC de façon indirecte, via les miARN 23a/b (Gao et al., 2009). Cette observation est étayée par Rathore et al., qui ont montré dans la lignée leucémique Jurkatt que la glutamine entraînait la localisation nucléaire de la sous-unité p65 de NF- κ B, qui se lie au promoteur du miR23a et l'inhibe, permettant l'expression de la GLS 1 (Rathore et al., 2012).

La GAC est également activée par le facteur de transcription NF- κ B en aval des Ras homolog gene family (Rho) GTPase (Wang et al., 2010). Les Rho-GTPases sont des petites protéines G de la superfamille Ras, comprenant notamment les protéines RhoA, RhoC ou Cdc42 (cell division control

protein 42 homolog), ayant un rôle dans de nombreuses activités cellulaires (migration par le cytosquelette d'actine, trafic intracellulaire, etc.) et impliquées dans la prolifération tumorale. Dans des fibroblastes transformés par Dbl (activateur des Rho-GTPases), l'activité glutaminase de la GAC est indispensable à la tumorigénèse, par l'intermédiaire de NF- κ B.

Une autre équipe a montré que l'activité glutaminase de la KGA transfectée dans des cellules HEK-293 était régulée positivement par l'Epidermal Growth Factor (EGF) via la voie Raf-Mek-Erk, sans modifier son expression protéique (Thangavelu et al., 2012). Dans ce modèle, il n'y a pas de régulation par d'autres activateurs de MEK, comme le PDGF, le TGF β ou le FGF. Les auteurs proposent une régulation par phosphorylation, puisque l'activité de la KGA est réduite en présence de la phosphatase PP2A. L'hypothèse d'une régulation par phosphorylation est également proposée par Wang et al. en aval de NF- κ B.

Enfin, au cours des encéphalopathies liées au VIH ou en réponse à l'IFN α , l'activité glutaminase est augmentée dans les cellules microgliales, via l'activation du facteur de transcription STAT1. STAT1, actif et phosphorylé, se fixe sur le promoteur de la GLS1 et augmente son expression (Zhao et al., 2013).

b) La LGA (ou GLS2, gène *GLS2*)

Bien que décrite initialement dans le foie, la deuxième glutaminase décrite par Krebs a été clonée pour la première fois à partir de cellules de lignée de cancer du sein (ZR-75), et appelée Liver-type GA pour son homologie avec la LGA du rat (Gómez-Fabre et al., 2000). Elle est codée par le gène *GLS2* localisé sur le chromosome 12 et est aussi présente dans le cerveau, le pancréas et le foie (Aledo et al., 2000). Le gène *GLS2* est constitué de 18 exons et 17 introns, les exons 3 à 18 présentant une grande homologie avec la KGA. Deux transcrits ayant des sites d'initiation de la transcription et des séquences promotrices différentes ont été identifiés et codent pour deux protéines fonctionnelles : une isoforme longue appelée GAB, correspondant à la LGA initialement clonée dans la lignée ZR-75 (exons 1 à 18, 602 aa) et une isoforme courte appelée LGA (exons 2 à 18, 565 aa) (Martín-Rufián et al., 2012; de la Rosa et al., 2009). La répartition d'expression des deux isoformes en fonction des tissus n'est pas encore bien connue chez l'homme. Chez le rat, la LGA est plus exprimée dans le foie alors que la GAB est l'isoforme retrouvée dans le cerveau. Le résultat inverse est retrouvé chez la souris (Martín-Rufián et al., 2012).

Cette glutaminase a une activité enzymatique identique à la GLS1 mais présente des propriétés biochimiques différentes, puisqu'elle n'est pas dépendante du taux de Pi et n'est pas inhibée par le glutamate. Sa localisation subcellulaire exacte en fonction des tissus n'est pas bien connue. Elle possède une séquence peptidique d'adressage à la mitochondrie et une NR box sur l'exon 1. Elle est localisée à la fois dans la mitochondrie et dans le noyau des cellules neuronales et astrocytaires (Cardona et al., 2014; Olalla et al., 2002).

Contrairement à la GLS1, la GLS2 est retrouvée dérégulée dans de nombreux cancers, où elle a probablement un rôle suppresseur de tumeur. Dans le cancer du côlon, l'hépatocarcinome ou le glioblastome, son expression est diminuée par rapport aux cellules normales, possiblement par hyperméthylation de son promoteur (Szeliga et al., 2005; Zhang et al., 2013). Dans ces modèles, la réexpression de l'enzyme par un vecteur lentiviral diminue la prolifération de cellules cancéreuses (Martín-Rufián et al., 2014; Szeliga et al., 2014). L'effet suppresseur de tumeur de la GLS2 reposerait principalement sur son rôle antioxydant. En effet, deux équipes ont montré que la GLS2 était régulée directement par p53 et participait à sa fonction suppresseur de tumeur en augmentant la synthèse du glutathion et en diminuant les ROS (Hu et al., 2010; Suzuki et al., 2010). Cette fonction anti-tumorale pourrait également passer par un effet différenciant, puisque la GLS2 permet la différenciation des cellules de l'épiderme en aval de p63 (Giacobbe et al., 2013) et des cellules neuronales en aval de p73 (Velletri et al., 2013). Dans un modèle d'hépatocarcinome, la surexpression de GLS2 diminue la prolifération des cellules tumorales et inhibe la voie PI3K/AKT, étape indispensable à son effet anti-tumoral (Liu et al., 2014). Ce rôle anti-tumoral est cependant débattu, puisque la GLS2 est exprimée dans la lignée de cancer du foie HepG2 et que son inhibition par un inhibiteur biochimique diminue la viabilité cellulaire via l'activation d'AMPK (Lee et al., 2014).

3.4. Métabolisme de la glutamine dans les cancers

3.4.1. Utilisation de la glutamine par les cellules cancéreuses

La glutamine est importante pour la croissance et la survie dans la plupart des cancers et sa consommation dépasse celle des autres AA. Cependant, la part de chacune des voies d'utilisation de la glutamine décrites ci-dessus en fonction des différents cancers n'est pas bien connue. En 2007, l'équipe de DeBerardinis a réalisé un marquage sur carbone et azote (^{13}C et ^{15}N) du glucose et de la glutamine et étudié leur devenir dans une lignée de glioblastome, modèle cellulaire proliférant rapidement (DeBerardinis et al., 2007). Ils ont tout d'abord constaté un effet Warburg important, avec une production de lactate à partir du glucose. Une partie du glucose est cependant utilisée pour la synthèse du citrate via l'acétyl-CoA et la PDH, le groupement carboné du citrate provenant de la glutamine via l'OAA. Le marquage au ^{13}C de la glutamine montre surtout que la majorité du carbone utilisé par les intermédiaires du cycle TCA vient de l'anaplérose glutaminique. Une grande partie du carbone issu de la glutamine est retrouvé dans le lactate extracellulaire et provient du cycle TCA via le malate. La glutaminolyse est donc très active dans ces cellules, et le marquage au ^{15}N permet de voir que l' αKG est produit à la fois par la GDH et l'ALAT, puisque l'azote marqué est retrouvé dans le pool d'ammoniaque et d'alanine. L'alanine peut ensuite être utilisée dans les voies de biosynthèse d'acides nucléiques et de protéines. Cette étude constitue un exemple d'utilisation de la glutamine par

un certain type de cancer (neurologique, lignée délétée pour p53 et ne présentant pas d'activation constitutive d'AKT) mais n'est pas applicable à tous les cancers.

Un autre exemple de cancer dans lequel le métabolisme de la glutamine est bien étudié est le cancer du sein, qui présente la particularité d'avoir un métabolisme de la glutamine différent en fonction du type histologique. Les cellules de type « luminales » peuvent survivre sans glutamine alors que les cellules de type « basales » sont très dépendantes de la glutamine pour leur survie (Kung et al., 2011). Cette différence est sous tendue par le fait que les cellules luminales expriment fortement la glutamine synthase et la GLS2, alors que les basales les expriment peu mais ont une activité GLS1 importante. Les cellules de cancer du sein basales, qui sont souvent triple négatif, sont ainsi dites auxotrophes pour la glutamine, c'est-à-dire qu'elles sont incapables synthétiser la quantité nécessaire à sa consommation. Ces cellules utilisent une grande partie de la glutamine pour permettre l'entrée de la cystéine par le co-transporteur xCT (échange glutamate intracellulaire/cystéine extracellulaire), afin de synthétiser du glutathion pour combattre le stress oxydant (Timmerman et al., 2013).

3.4.2. Régulation du métabolisme de la glutamine

La dépendance à la glutamine d'un cancer varie donc en fonction du type histologique et des anomalies génétiques. Ainsi, les oncogènes peuvent modifier le métabolisme et rendre la cellule cancéreuse plus ou moins dépendante à la glutamine (Figure 12). Plusieurs oncogènes forts ou suppresseurs de tumeurs participent à ces modifications, notamment MYC, KRAS, PI3K/AKT ou p53.

a) MYC

Le proto-oncogène MYC est un facteur de transcription appartenant à la famille des gènes *MYC*, comprenant *MYC*, *MYCN* et *MYCL*. Il est activé dans de nombreux cancers, par amplification génique directe (trisomie 8, etc...), par translocation impliquant le locus MYC comme dans le lymphome de Burkitt ou par activation en aval de voies de signalisation, comme les voies MEK-ERK ou PI3K/AKT/mTORC1. L'expression de MYC modifie la dépendance à la glutamine. En effet, l'induction de MYC dans des fibroblastes les rend plus sensibles à la privation en glutamine, alors que les cellules n'exprimant pas MYC prolifèrent normalement (Yuneva et al., 2007). L'étude métabolomique d'une lignée de lymphome en condition « low » MYC (MYC endogène) ou « high » MYC (surexpression ectopique) montre une hyperactivation du cycle TCA, associée à une augmentation de la glutaminolyse bien supérieure à l'augmentation de la glycolyse dans les cellules « high » MYC (x4 versus x1.2) (Murphy et al., 2013). De la même façon, des lignées de lymphome ou de cancer de prostate qui surexpriment MYC sont beaucoup plus sensibles à la privation en glutamine qu'à la privation en glucose (Gao et al., 2009).

La glutamine semble surtout utilisée pour maintenir un cycle TCA actif, puisque l'effet de la privation en glutamine est prévenu par l'ajout des métabolites de cycle TCA. En revanche, dans l'étude de Yuneva et al., la mort cellulaire n'était pas liée à l'inhibition de mTORC1, à la baisse d'ATP ou au stress oxydant (Yuneva et al., 2007). Lorsque MYC est surexprimé dans la lignée de lymphome P493-6, le marquage au ^{13}C et ^{15}N de la glutamine montre qu'elle est rapidement hydrolysée en glutamate. Celui-ci est alors utilisé pour maintenir le cycle TCA actif via l' αKG . En hypoxie ou en condition de privation en glucose, le cycle TCA reste actif uniquement grâce à la glutamine, et celle-ci sert également à la synthèse du glutathion (Le et al., 2012). MYC induit également la biosynthèse des prolines à partir du glutamate (Liu et al., 2012a).

Cette utilisation de la glutamine est sous tendue par la surexpression de protéines impliquées dans chaque étape de son métabolisme. L'expression de MYC dans des fibroblastes embryonnaires murins augmente la captation de glutamine ainsi que l'expression de l'ARNm du transporteur SLC1A5 (Wise et al., 2008). Ce transporteur, ainsi que SNAT2 et le co-transporteur SLC7A5, sont aussi retrouvés surexprimés en aval de MYC dans d'autres modèles (Gao et al., 2009; Qing et al., 2012). L'augmentation de la glutaminolyse lorsque MYC est surexprimé est corrélée à l'induction de la transcription du gène de la GLS1 de façon indirecte, via les miR23a/b (Gao et al., 2009; Wise et al., 2008). Cependant, les effets de MYC sur le métabolisme de la glutamine peuvent varier en fonction du type histologique. Lorsque MYC est surexprimé dans un modèle de cancer du poumon, la GS et la GLS1 sont induites, alors que la même surexpression dans le cancer du foie diminue la GS et la GLS2, au profit de GLS1 (Yuneva et al., 2012).

b) KRAS

KRAS est une GTPase de la famille Ras, mutée ou amplifiée dans de nombreux cancers, aboutissant à l'activation constitutive de voies de signalisation. L'analyse des flux métaboliques montre que les cellules de cancer du pancréas présentant une activation de KRAS ont un métabolisme glucose/glutamine découplé, avec une glycolyse accrue, un métabolisme oxydatif diminué et l'utilisation de glutamine vers les voies de biosynthèse (acides aminés, nucléotides, glutathion) (Gaglio et al., 2011). Dans ces cellules, l'hyperactivation de KRAS reprogramme le métabolisme de la glutamine vers une voie non canonique, privilégiant la transamination du glutamate via l'ASAT plutôt que vers la synthèse d' αKG par la GDH (Son et al., 2013). Ce modèle semble tissu-spécifique, puisque l'induction de KRAS dans des fibroblastes entraîne la surexpression des deux enzymes, ASAT et GDH. Par ailleurs, la privation en glutamine de fibroblastes transformés par KRAS entraîne un arrêt du cycle cellulaire en phase S, et cet effet antiprolifératif est reversé par l'ajout de nucléotides (Gaglio et al., 2009).

c) PI3K/AKT et mTORC1

Alors que la voie PI3K/AKT active la glycolyse, elle n'a a priori pas d'effet sur le métabolisme de la glutamine. En effet, l'utilisation d'un inhibiteur d'AKT ou des PI3K (de la IA) dans des cellules de gliome n'inhibe pas la captation de glutamine. En revanche, Csibi et al. ont montré que mTORC1 contrôlait la glutaminolyse dans des fibroblastes embryonnaires murins TSC2^{-/-}. Ce contrôle est réalisé à deux niveaux différents. D'une part la GDH est augmentée en aval de mTORC1 via l'inhibition de SIRT4 : MTORC1 activé promeut la dégradation par le protéasome de cAMP-responsive element-binding (CREB) 2, ce qui inhibe la transcription de SIRT4, sirtuine mitochondriale activatrice de GDH (Csibi et al., 2013). D'autre part, mTORC1, via la p70S6K1, entraîne la traduction de MYC par la phosphorylation d'eIF4B, ce qui augmente l'expression de la GLS1 (Csibi et al., 2014).

d) Régulation par des suppresseurs de tumeurs

i. Famille p53

La famille p53 comporte 3 membres : TP53, TP63 et TP73 (ou p53, p63 et p73). Il s'agit de facteurs de transcription impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires (apoptose, cycle cellulaire, différenciation). Comme décrits précédemment, les 3 protéines de la famille p53 ont été décrites comme régulant positivement la GLS2.

ii. Protéine du rétinoblastome (Rb)

Les facteurs de transcription Rb (Rb-1, Rb11 and Rb12) sont des suppresseurs de tumeur retrouvés mutés dans de nombreux cancers. Rb-1 agit en s'associant au facteur de transcription E2F pour recruter des complexes corépresseurs de la transcription comme les histones déacétylases (Clem et Chesney, 2012). Ses cibles les mieux décrites sont des protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, mais également des régulateurs du métabolisme comme C-MYC, HIF-1 α ou RAS. Le KO de Rb-1 ainsi que le triple KO des gènes Rb dans des cellules MEF entraîne une reprogrammation du métabolisme de la glutamine : augmentation de l'import de glutamine et de la glutaminolyse (Reynolds et al., 2014). Cette régulation serait à la fois transcriptionnelle (pour SLC1A5) et post-transcriptionnelle (pour GLS1), mais les mécanismes précis ne sont pas décrits et pourraient faire intervenir le facteur de transcription MYC.

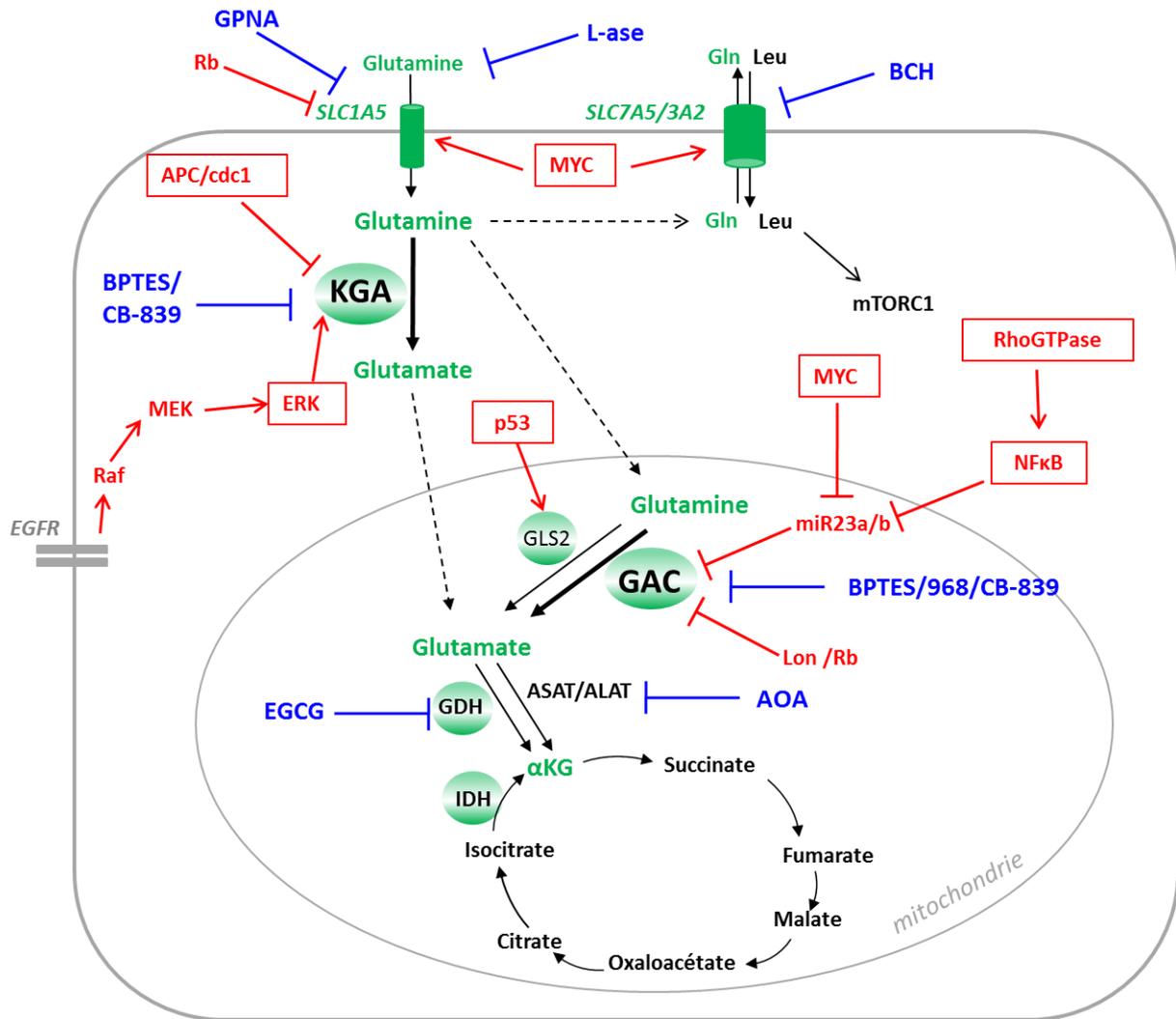


Figure 12. Régulation du métabolisme de la glutamine. La glutamine entre dans la cellule par le transporteur SLC1A5 puis est rapidement hydrolysée en glutamate par la KGA dans le cytoplasme ou par la GAC ou la GLS2 dans la mitochondrie. Le glutamate est transformé en α KG par les transaminases ou par la GDH puis entre dans le cycle TCA. La glutamine permet également l'entrée de leucine et l'activation de mTORC1. Ce métabolisme est régulé par de nombreuses voies impliquées en cancérogénèse (en rouge) et peut être inhibé par des molécules pharmacologiques à tous les niveaux (en bleu). *L-ase* : *L-asparaginase*, *KGA* : *kidney type glutaminase*, *GAC* : *Glutaminase C*, *GLS2* : *glutaminase de type 2 ou LGA*, *GDH* : *glutamate déshydrogénase*, *ASAT* : *aspartate aminotransférase*, *ALAT* : *alanine aminotransférase*, *IDH* : *isocitrate déshydrogénase*.

3.4.3. Ciblage thérapeutique du métabolisme de la glutamine

Le métabolisme de la glutamine apparaît donc comme une cible thérapeutique intéressante dans les cancers. Plusieurs inhibiteurs, ciblant son métabolisme de façon directe ou indirecte, sont actuellement en cours d'études.

a) Inhibition des transporteurs membranaires

i. Import de glutamine

Dans les cancers, l'import de glutamine du milieu extracellulaire se fait principalement par deux transporteurs : le SLC1A5 et SNAT2. L'inhibition de la captation de glutamine par utilisation d'AA analogues en concentration élevée inhibe la croissance de lignées de cancer du foie (Pawlik et al., 2000). Cette constatation a conduit à la synthèse d'un inhibiteur pharmacologique du transporteur SLC1A5, le GPNA (gamma-l-Glutamyl-p-Nitroanilide) (Esslinger et al., 2005). L'inhibition du transporteur par ARN interférence ou par le GPNA inhibe la croissance et induit l'apoptose de lignées de cancers du poumon et du foie (Fuchs et al., 2007; Hassanein et al., 2013). L'inhibition de la captation de glutamine inhibe mTORC1 dans les deux cas, bien que la corrélation entre inhibition de mTORC1 et apoptose ne soit pas démontrée. Par ailleurs, le GPNA augmente l'import de certaines molécules par le transporteur MCT1. L'inhibition de l'import de glutamine par le GPNA stabilise MCT1 et favorise la captation de l'inhibiteur de la glycolyse 3-bromopyruvate (Cardaci et al., 2012). La benzylsérine est un autre inhibiteur du SLC1A5 ayant un effet antiprolifératif *in vitro* dans le mélanome (Wang et al., 2014a). L'inhibition du transporteur SNAT2 par le Me-AIB a un effet antiprolifératif modeste dans la lignée de cancer du sein MCF7 (Pinilla et al., 2011).

ii. Co-transport glutamine/leucine

Plusieurs inhibiteurs du co-transporteur SLC7A5 ont été étudiés, principalement *in vitro*. L'acide 2-aminobicyclo-(2,2,1)-heptane-2-carboxylique (BCH) a été synthétisé en 1969 pour inhiber les transporteurs du système L, et inhibe LAT1, LAT2, et LAT3 (Christensen et al., 1969). Son utilisation comme agent anti-tumoral n'a été étudiée que dans les années 2000, suite à l'étude de Nicklin montrant l'effet de l'inhibition de LAT1 sur mTORC1 (Nicklin et al., 2009). Le BCH a un effet très variable selon les modèles, avec un effet uniquement antiprolifératif dans la plupart des cas (ORL (Yamauchi et al., 2009); sein (Shennan et Thomson, 2008); ovaire (Fan et al., 2010), prostate (Wang et al., 2011)). Une seule étude retrouve un effet pro-apoptotique, dans des lignées de cancer ORL, sarcome et gliome (Kim et al., 2008a) et le BCH n'a pas d'effet *in vitro* sur des lignées de mélanome (Wang et al., 2014b). Utilisé en association, il renforce les effets des chimiothérapies cisplatine et melphalan (Shennan and Thomson, 2008; Yamauchi et al., 2009). Son rôle antiprolifératif est principalement associé à l'inhibition de mTORC1 (Fan et al., 2010; Yamauchi et al., 2009).

Un autre inhibiteur, spécifique de LAT1 et plus efficace pour inhiber l'import de leucine a été développé, le KYT-0353 (appelé aussi JPH203) (Oda et al., 2010). Il induit l'apoptose de plusieurs lignées de cancer ORL et réduit la croissance des tumeurs dans un modèle de xénotransplantation de lignées de cancer colique dans la souris NUDE (Oda et al., 2010; Yun et al., 2014).

b) La L-asparaginase

L'effet antitumoral de la L-asparaginase (L-ase) a été découvert au début des années 1960, dans des sérums de cobayes ayant une efficacité contre le lymphome du rat (Broome, 1963). Elle est actuellement utilisée dans le traitement de première ligne des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) et des lymphomes de type NK. Il existe deux types de L-ases utilisées en clinique et issues de deux bactéries différentes : la Kidrolase® (ou Oncaspar® pour la forme pégylée) issue d'*Escherichia coli* et l'Erwiniase® issue d'*Erwinia chrysanthemi*. Son efficacité dans les LAL est expliquée par l'absence d'expression d'asparagine synthase (ASNS) en réponse à la déplétion en asparagine dans ces cellules (Chan et al., 2014). En plus de son activité asparaginase, la L-ase possède une activité glutaminase, plus importante pour l'Erwiniase® que pour la Kidrolase®.

Plusieurs études ont remis en question l'effet anti-asparagine seul sur l'efficacité de la L-ase. Premièrement, certaines LAL présentent une augmentation de l'ASNS en réponse à la L-ase, et cette augmentation n'est pas corrélée à la réponse thérapeutique (Appel et al., 2006). Par ailleurs, l'augmentation de l'ASNS ne modifie pas les effets de la L-ase sur le cycle cellulaire dans des LAL TEL-AML1 (Krejci et al., 2004). Bien que considérée initialement comme responsable uniquement des effets secondaires de la L-ase, l'activité glutaminase semble donc aussi impliquée dans son efficacité anti-tumorale, même dans les LAL. En effet, les deux activités sont importantes pour la cytotoxicité (Offman et al., 2011), et le relargage de glutamine par les adipocytes participe à la résistance à la L-ase (Ehsanipour et al., 2013). Enfin, l'inhibition de la glutamine synthétase augmente l'apoptose en réponse à la L-ase dans un modèle de sarcome chez le rat (Rotoli et al., 2005). Ces résultats sont controversés par d'autres études, qui montrent au contraire l'absence de supériorité et la toxicité des L-ases à activité glutaminase (Distasio et al., 1982). Une L-ase sans activité glutaminase développée à partir de *Wolinella succinogenes* a la même efficacité antitumorale mais moins de toxicité hépatique. Cet effet est tissu-spécifique et passerait par l'absence de phosphorylation de eIF2 α (Eukaryotic Initiation Factor 2) par la kinase GCN2 (general control nonderepressible 2) au niveau du foie mais pas du pancréas (Reinert et al., 2006).

L'intérêt de l'utilisation de la L-ase dans les LAM a été étudié dans les années 1980, principalement en association avec l'aracytine. En effet, les premiers tests en monothérapie étaient plutôt décevants, avec une rémission complète (RC) chez 4 patients sur 32 (Clarkson et al., 1970). L'association avec l'aracytine haute dose avait des résultats plus encourageants. Une étude préliminaire chez 13 patients présentant des LAM réfractaires permettait d'obtenir une RC chez 9 patients sur 13 (Ross et Capizzi, 1984). Une étude du CALGB randomisant 195 patients atteints de LAM réfractaires ou en rechute a montré un taux de réponse supérieur chez les patients réfractaires de tous âges et chez les patients en rechute âgés de plus de 60 ans (Capizzi et al., 1988). Ce résultat a motivé un essai identique en première ligne, et le taux de RC avoisinait celui obtenu par chimiothérapie conventionnelle. Dans ces études, l'effet synergique de la L-ase et de l'aracytine était expliqué par l'activité glutaminase de la L-

ase, qui déplete les cellules en nucléotide dCTP, les rendant plus sensibles à l'aracytine (Capizzi et White, 1988).

La sensibilité à la L-ase des différents sous types de LAM selon la classification FAB a été étudiée in vitro. Une première étude montre une sensibilité supérieure des LAM 5 par rapport aux LAM 1, 2 et 4, de des LAM ayant une activité ASNS de base inférieure (Dübbers et al., 2000; Zwaan et al., 2000). Une deuxième étude trouve une sensibilité des LAM 1, 4 et 5, avec les LAM 1 aussi sensibles que des LAL (Okada et al., 2003).

c) Inhibition de la glutaminolyse

i. Inhibiteurs biochimiques

La meilleure compréhension du métabolisme dans les cancers a conduit à la recherche d'outils thérapeutiques ciblant la glutamine et notamment la glutaminolyse, pierre d'angle de cette voie métabolique. Ainsi, plusieurs inhibiteurs ont été identifiés ou synthétisés ces dernières années.

- Le BPTES (bis-2-(5-phenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl) éthyl sulfide)

Le BPTES est une molécule synthétisée en 2002 qui inhibe les deux isoformes de la GLS1 mais n'a pas d'effet sur la GLS2 ou la GDH (Robinson et al., 2007). Le BPTES se lie de façon allostérique à la GLS1 et entraîne la formation de tétramères inactifs. Les études en cristallographie de la structure de la GAC et de la KGA en présence de BPTES ont été réalisées par deux équipes différentes et ont permis de montrer que, dans les deux cas, le BPTES se fixait à l'interface de dimères de GLS1 au niveau d'une poche allostérique, entraînant un changement conformationnel d'une boucle clé située près du site catalytique (DeLaBarre et al., 2011; Thangavelu et al., 2012). Le tétramère formé est alors incapable de fixer le Pi ou de constituer la superstructure polymérique active (Ferreira et al., 2013). Ce composé n'est cependant pas utilisable comme outil thérapeutique puisqu'il est peu soluble dans l'eau. Une molécule analogue, forme tronquée dérivée du BPTES et plus soluble a été récemment synthétisée (Shukla et al., 2012).

- Le composé 968

Ce composé a été découvert par screening d'une banque de petites molécules capables d'inhiber la transformation de fibroblastes par les Rho-GTPase (Wang et al., 2010). Il s'agit d'une molécule de la famille des dibenzophenanthridines qui inhiberait uniquement la GAC, son effet sur la KGA n'ayant pas été étudié. Les études enzymatiques montrent qu'il inhibe la GAC de façon allostérique et non compétitive avec la glutamine (Katt et al., 2012). La structure cristallographique de la GAC associée au 968 n'a pas encore pu être réalisée, et son mécanisme d'action exact n'est donc pas encore bien connu. Il est inactif sur les tétramères de GAC déjà activés par la Pi mais inhibe la formation de

tétramères lorsqu'il est ajouté même quelques secondes avant (Katt et Cerione, 2014). Tout comme le BPTES, le 968 est peu soluble dans l'eau et donc pas utilisable en clinique.

- Le CB-839

Cet inhibiteur est le dernier né des inhibiteurs de la GLS1 et possède l'avantage d'être utilisable en clinique. Il inhibe à la fois la KGA et la GAC et n'a pas d'effet sur la GLS2. Il inhibe l'activité glutaminase de façon temps dépendante et est moins réversible que le BPTES (Gross et al., 2010). Ses mécanismes d'action précis ne sont pas encore connus. Trois essais de phase I le testant dans les cancers solides et les hémopathies malignes lymphoïdes et myéloïdes ont débuté depuis mars 2014 (NCT02071862, NCT02071888 et NCT02071927).

- Autres inhibiteurs des glutaminases

Le DON (6-diazo-5-oxo-L-norleucine) est un analogue de la glutamine qui inhibe la KGA et la GAC en se fixant sur son site actif (Shapiro et al., 1979). Il n'est cependant pas du tout spécifique puisqu'il inhibe les autres enzymes utilisant la glutamine, comme la glutamine synthétase et les transaminases (Thangavelu et al., 2014). Il est par ailleurs moins efficace pour inhiber la KGA que le BPTES (Lee et al., 2014).

L'analogue du glutamate CK (L-2-amino-4-oxo-5- chloropentanoic acide) a été également décrit comme inhibant la KGA en se liant à son site actif, mais n'a pas été plus exploré (Shapiro et al., 1978). Le zaprinast, un inhibiteur des phosphodiesterases, a été identifié comme inhibant la production de 2-HG et s'avère être un inhibiteur de glutaminase (Elhammali et al., 2014). D'autres inhibiteurs (l'ebesen, la chelerythrine et l'apomorphine) ont été identifiés par screening mais n'ont pas encore été particulièrement investigués (Thomas et al., 2013). Les alkyl benzoquinone (notamment la molécule AV-1) inhibent les deux types de GLS 1 et 2, avec un effet 10 fois plus important sur l'isoforme GAB de la GLS2 que sur la KGA (Lee et al., 2014).

- Inhibition de l'hydrolyse du glutamate

La deuxième étape de la glutaminolyse, c'est-à-dire la formation d' α KG à partir du glutamate, peut aussi être inhibée. L'activité enzymatique de la GDH est inhibée par l'utilisation d'EGCG (epigallocatechin gallate). Il s'agit d'une molécule extraite du thé vert, possédant des propriétés antioxydantes et antitumorales connues depuis longtemps, et fonctionnant entre autre en inhibant la GDH (Choo et al., 2010). Une autre façon d'inhiber cette étape est d'utiliser un inhibiteur des transaminases, comme l' amino oxyacetate (AOA).

ii. Effet antitumoral de l'inhibition de la GLS1

De nombreuses études utilisant ces inhibiteurs ou des ARN interférences ont montré l'intérêt de l'inhibition de la GLS1 dans les cancers avec une inhibition de la prolifération et une induction

d'apoptose dans plusieurs modèles (prostate, lymphome B, sein, poumon,...), in vitro ou in vivo, avec des particularités pour chacun. Les effets des différents modes d'inhibition ainsi que le modèle tumoral utilisé sont colligés dans le tableau 3. Par exemple, l'inhibition de la GAC inhibe la croissance des lignées de cancer du poumon non à petites cellules alors que l'inhibition de la KGA n'a pas d'effet. L'inhibition de la GLS1 en association avec d'autres agents antitumoraux a été peu étudiée : elle synergise avec la metformine dans le cancer de prostate (Fendt et al., 2013) ou avec l'arsenic trioxide dans le gliome (Martín-Rufián et al., 2014).

Outils	Cible	Type cellulaire	Conditions	Effet	Référence
siARN	GLS1	Cancers c-myc+ (Prostate,	in vitro	antiprolifératif	Gao, 2009
siARN et BPTES	GLS1	gliome IDH1 muté	in vitro	antiprolifératif	Seltzer, 2010
968, siARN	GAC et/ou KGA	Cancers Rho-GPTase+, Lymphome, Sein	in vitro et in vivo (lymphome)	inhibitor de la transformation induite par Rho, de la clonogénicité, antiprolifératif et diminution de la taille des tumeurs xénotranplantées	Wang, 2010
968	GAC	Cancer du sein	in vitro	apoptose	Simpson, 2012
siARN	KGA	Gliome	in vivo	apoptose	Martin-Ruffian, 2012
siARN	GAC et KGA	Cancer du poumon	in vitro	effet antiprolifératif que si GAC inhibée	Van den Heuvel, 2013
968, BPTES	GLS1	Cancer de prostate	in vitro	antiprolifératif	Fendt, 2013
BPTES	GLS1	Cellules primaires LAM mutées IDH	ex vivo	antiprolifératif	Emadi, 2013
CB-839	GLS1	Cancer du sein	in vitro et in vivo	apoptose et diminution de la taille des tumeurs xénotranplantées	Gross, 2014

Tableau 5. Effet antitumoral des inhibiteurs de GLS1.

Le cas des maladies à mutations d'IDH est particulièrement intéressant. En effet, Seltzer et al. ont montré que l'inhibition de la GLS1 par le BPTES inhibait préférentiellement les gliomes présentant la mutation d'IDH1 R132H (Seltzer et al., 2010). Le BPTES entraîne une modification du métabolisme, avec une augmentation de la formation de citrate, mais cependant pas d'effet sur le taux de 2-HG. De façon contradictoire, le 968 ou un siARN de la GLS1 inhibent la synthèse de 2-HG dans deux lignées de cancer du sein (Terunuma et al., 2014). Dans les LAM, l'utilisation du BPTES sur 10 échantillons de cellules primaires mutées ou non pour IDH1 ou 2 semble inhiber préférentiellement la prolifération des LAM mutées pour ces gènes (Emadi et al., 2013).

Les mécanismes précis expliquant l'effet antitumoral de l'inhibition de la GLS1 ne sont pas toujours bien identifiés. Dans le cancer du sein, le 968 inhibe la transcription de gènes anti-apoptotiques ou pro-métastases comme *BCL2*, *CCND1* ou *MYC* (Simpson et al., 2012). Cette inhibition passe par une modification épigénétique : le 968 diminue la méthylation sur lysine 4 des histones au niveau du promoteur de ces gènes. Dans la lignée d'ostéosarcome U2OS, le BPTES ou des shARNs visant la GLS1 et la GDH inhibent mTORC1 en empêchant la formation de Rag-GTP et induisent de l'autophagie (Durán et al., 2012). mTORC1 est aussi inhibé par l'utilisation de l'inhibiteur AV-1 (Lee et al., 2014).

4. Métabolisme des LAM

Comme les autres cancers, les cellules de LAM ont un métabolisme adapté aux besoins de biosynthèse accrue. L'intérêt croissant pour le métabolisme permet actuellement de mieux identifier les mécanismes de cette reprogrammation dans ces pathologies.

4.1. Métabolisme des cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) restent à l'état quiescent dans la niche hématopoïétique et ont un métabolisme adapté à cet environnement hypoxique, qui détermine également la balance quiescence/prolifération et différenciation. Les CSH normales utilisent la glycolyse plutôt que la phosphorylation oxydative pour assurer leurs besoins en énergie.

Une étude métabolomique sur des CSH murines montre que celles-ci ont un métabolisme très différent des cellules sanguines plus matures, avec une glycolyse favorisée par la surexpression de la pyruvate déshydrogénase kinase (PDK) (Takubo et al., 2013). La PDK inhibe la pyruvate déshydrogénase, empêchant ainsi l'entrée du pyruvate vers le cycle TCA. Cette surexpression est favorisée par HIF1 α , lui-même induit par le facteur de transcription Meis1 (Simsek et al., 2010). L'inhibition de PDK ou de HIF1 α diminue les capacités d'auto-renouvellement des CSH, soulignant l'importance de la glycolyse pour maintenir les propriétés de cellule souche. Cette préférence peut être expliquée par la moindre toxicité de ce processus, la phosphorylation oxydative conduisant à la production de ROS. Les KO des enzymes PKM2 ou LDHA dans la moelle de souris altèrent les capacités de repopulation à long terme des CSH murines, mais seule la déplétion de LDHA diminue le taux de cellules souches après retransplantation (Wang et al., 2014c). Dans les deux modèles, l'inhibition de la glycolyse induit une augmentation de la respiration mitochondriale, mais de façon plus importante pour le KO de LDHA. Celle-ci est alors accompagnée d'une production élevée de ROS, et son inhibition par ajout de N-acétyl-cystéine reverse l'effet sur la CSH.

La β -oxydation des acides gras participe également aux besoins en énergie et est indispensable au caractère souche, puisque son inhibition induit la différenciation cellulaire (Ito et al., 2012).

L'absence de phosphorylation oxydative est une caractéristique importante pour la quiescence cellulaire. L'inhibition de la phosphatase mitochondriale PTEN-like Ptpmt1 dans la moelle des souris, qui inhibe la respiration mitochondriale, inhibe la différenciation alors qu'elle augmente le pool de CSH (Yu et al., 2013). L'augmentation des besoins en énergie lors de l'entrée en différenciation dépendrait donc en partie de la réactivation de la phosphorylation oxydative.

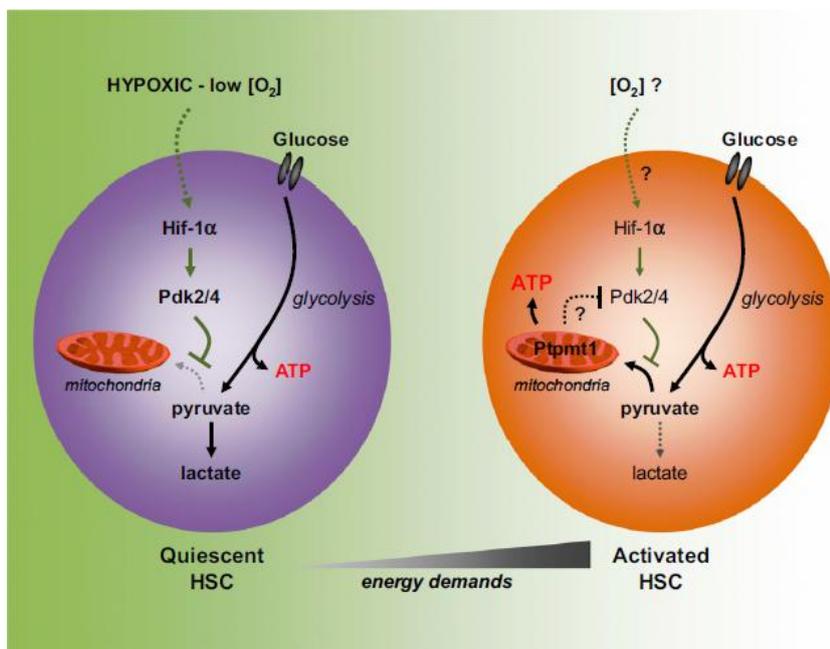


Figure 13. Métabolisme des CSH. Warr et Passegué, 2013.

Récemment, l'équipe de N. Taylor a montré l'importance du métabolisme de la glutamine pour le devenir et la spécification des CSH (Oburoglu et al., 2014). En effet, l'inhibition du transporteur de la glutamine SLC1A5 empêche la différenciation érythroïde et entraîne les cellules vers une différenciation myélo-monocytaire. Ce phénotype est reversé par l'ajout d'acides nucléiques mais pas par celui d' α KG. Dans ce cas, la glutamine est donc indispensable à la synthèse des bases plutôt qu'à la phosphorylation oxydative.

4.2. Métabolisme des LAM

Contrairement aux cellules hématopoïétiques normales, les cellules leucémiques présentent une glycolyse et une phosphorylation oxydative actives. La mesure du nombre de mitochondries dans des chloromes par rapport aux cellules médullaires normales chez la souris montre un nombre plus important de mitochondries. Ces mitochondries ont la capacité d'utiliser la glutamine pour respirer, ce qui démontre l'existence d'une enzyme à activité glutaminase dans les mitochondries (Abou-Khalil et al., 1983). Des études plus récentes ont confirmé ce résultat par plusieurs méthodes. La quantification de l'ADN mitochondrial ou le marquage au Mitotracker de cellules de LAM (CD34+, CD38+ et aussi CD34+, CD38-) par rapport aux cellules normales démontrent une augmentation de la masse mitochondriale (Skrtić et al., 2011). Cette augmentation s'accompagne d'une respiration mitochondriale accrue (par mesure de la consommation en oxygène) et d'une sensibilité particulière des cellules de LAM à l'inhibition de la traduction mitochondriale par la tigécycline.

L'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale par la metformine inhibe la consommation en oxygène, la production d'ATP par la mitochondrie et augmente le flux glycolytique (Scotland et al., 2013). Dans cette étude, la sensibilité à la metformine dépend des lignées et notamment de leur capacité à utiliser le glucose pour produire l'ATP (effet Pasteur), lui-même corrélé à la phosphorylation d'AKT. L'utilisation de 2-DG ou d'un inhibiteur d'AKT rend les lignées les plus résistantes à nouveau sensibles à la metformine.

Les cellules de LAM ont une glycolyse accrue, qui serait augmentée par la présence des cellules stromales (Samudio et al., 2008). En effet, la co-culture de lignées en présence de cellules stromales augmente la production de lactate, mais sans augmenter la captation du glucose. Ce phénomène est lié au découplage mitochondrie/glycolyse, via la surexpression de la protéine UCP2 (uncoupling protein 2). Cette protéine est située à la membrane interne mitochondriale et provoque un court-circuit dans le gradient de protons. Ceci diminue le potentiel de membrane mitochondrial et oriente le cycle TCA vers les voies anaplérotiques, expliquant le maintien de la respiration mitochondriale et l'excès de production de lactate sans surconsommation de glucose. La même équipe a montré que la β -oxydation des acides gras participait à la phosphorylation oxydative en fournissant l'acétyl-CoA à la place du pyruvate, la glutamine étant probablement l'autre métabolite indispensable pour fournir l'oxaloacétate (Samudio et al., 2010; Vélez et al., 2013).

La glycolyse et la glutaminolyse semblent donc être des cibles intéressantes dans les LAM. L'inhibiteur de la glycolyse 2-DG induit l'apoptose et inhibe la pousse des tumeurs dans un modèle de xéno-transplantation de lignées de LAM à la souris (Suganuma et al., 2010; Tsunekawa-Imai et al., 2013). De façon importante, les KO de PKM2 et de LDHA diminuent l'initiation et la maintenance des leucémies induites par les oncogènes MLL-AF9 ou BCR-ABL (Wang et al., 2014c). L'inhibition du métabolisme de la glutamine (par privation en glutamine ou inhibition de la formation d' α KG par l'EGCG ou l'AOA) dans 4 lignées cellulaires montre un effet sur la viabilité et la prolifération, corrélé à l'expression de la GLS1 (Goto et al., 2014).

Contrairement au « bulk » des cellules de LAM, les cellules souches leucémiques (CSL) semblent avoir des caractéristiques plus proches des CSH. En effet, Lagadinou et al. ont montré que les CSL étaient caractérisées par une faible production de ROS (Lagadinou et al., 2013). Les cellules « ROS-low » présentent une glycolyse et une consommation en oxygène diminuées mais indispensables à leur survie. Elles surexpriment la protéine anti-apoptotique BCL-2 dont l'inhibition par inhibiteurs pharmacologiques (BH3 mimétiques de type ABT-737 ou ABT-199) diminue la phosphorylation oxydative à la fois dans le bulk leucémique et dans la population ROS-low et induit leur apoptose. Celles-ci ne sont cependant pas capables d'augmenter la glycolyse en réponse à cette inhibition et le ciblage de la respiration mitochondriale pourrait donc être particulièrement intéressante dans la population de CSL.

RESULTATS

PARTIE I : Etude de l'implication de la Gln dans l'activation de mTORC1 dans les LAM

Dans la première partie de mon travail de thèse, j'ai étudié l'implication de la voie des AA dans l'activation de mTORC1 observée dans les LAM. En effet, plusieurs travaux antérieurs réalisés dans mon laboratoire d'accueil avaient montré l'existence d'une activation constitutive de mTORC1 dans la majorité des échantillons primaires de LAM, qui n'était pas retrouvée dans des cellules CD34+ normales (Tamburini et al., 2008). Les travaux de Nicklin et al (Nicklin et al., 2009) avaient démontré par ailleurs l'importance de deux AA, la leucine et la glutamine, dans l'activation de mTORC1 dans des cellules HEK-293, ce qui nous a conduits à étudier cette voie comme cible thérapeutique potentielle dans les LAM.

Nous avons tout d'abord vérifié que ces 2 AA étaient bien essentiels à l'activation de mTORC1 dans les LAM en cultivant les cellules dans des milieux déplétés en ces AA. La privation en gln et/ou leu conduit bien à l'inhibition rapide de mTORC1 dans des lignées et la plupart des cellules primaires de LAM. La privation en gln seule induit une mort cellulaire caspase-dépendante dans les LAM, mais n'a pas d'effet sur la viabilité des cellules CD34+ normale dans des conditions de culture identiques.

Nous avons ensuite utilisé plusieurs outils ciblant l'entrée de gln dans la cellule. L'inhibition du transporteur de la gln SLC1A5 par un shARN inducible par la doxycycline permet de reproduire les effets fonctionnels de la privation en gln, inhibe complètement la pousse tumorale dans un modèle de xénotransplantation de cellules leucémiques et améliore la survie des souris.

Il n'existe pas cependant à l'heure actuelle d'inhibiteur de ce transporteur utilisable en clinique, et nous avons donc poursuivi nos travaux en utilisant un deuxième outil, la L-asparaginase. En effet, ce médicament, déjà bien connu et utilisé de façon courante dans le traitement de LAL, a également une activité glutaminase, et permet de mimer les effets d'une privation brutale des cellules en gln. Nous avons observé une inhibition de l'activité de mTORC1 en présence de L-ase proportionnelle à la dégradation de la gln extracellulaire. Cet effet est indépendant de l'activité asparaginase de cette drogue puisque la privation en asn n'a aucun effet fonctionnel sur les blastes de LAM. La L-ase induit donc une importante mort cellulaire par apoptose qui est aussi inversement proportionnelle au taux de gln extracellulaires et inhibe la synthèse protéique via la suppression de la phosphorylation du répresseur de la traduction 4EBP1 en aval de mTORC1.

Nous nous sommes ensuite intéressés à deux éventuels mécanismes de résistance intrinsèque ou acquis à la privation en gln: l'expression de la glutamine synthase (GS) et l'autophagie. La privation en gln par culture dans un milieu déplété ou par exposition à la L-ase induit l'expression protéique de la GS (qui n'est pas exprimée de base) dans les cellulaires primaires et dans les lignées de LAM, et son inhibition d'expression concomitante par shARN permet de diminuer l'apoptose dans une seule lignée (MV4-11) sur les 4 testées. L'autophagie apparaît être un mécanisme de résistance plus intéressant. En effet, la privation en gln par nos différents outils induit une autophagie massive, notamment en présence de L-ase et son inhibition par des shARN anti-beclin ou anti-ATG5 augmente significativement l'apoptose dans la lignée OCI-AML3.

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans Blood dont je suis co-première auteur, ci après et en annexe 1 pour les données supplémentaires (Willems L et Jacque N et al., 2013), d'un éditorial associé à cette publication (Annexe 2) et d'un éditorial dans la revue Oncoscience qui sera prochainement indexée sur Pubmed (Annexe 3).

PARTIE II : Etude de la glutaminolyse dans les LAM

Les effets pro-apoptotiques que nous avons observés lors de la privation en glutamine des cellules leucémiques sont bien supérieurs à ceux que l'on peut observer en inhibant mTORC1 avec les inhibiteurs classiques, la rapamycine ou les Torkinhibs (Chapuis et al., 2010; Tamburini et al., 2008; Willems et al., 2012).

Pour savoir si l'inhibition de mTORC1 était impliquée dans la mort cellulaire induite par la privation en gln, nous avons utilisé un mutant de mTOR (mTORSL1+IT) qui maintient le complexe mTOR activé en l'absence d'AA. Nous avons observé un taux d'apoptose identique que le complexe mTORC1 soit inhibé ou non en situation de privation en glutamine alors même que les cellules exprimant le mutant mTORSL1+IT conservent bien une activation détectable de la voie mTORC1, comme en témoigne la phosphorylation de la p70S6K sur la thréonine 389 en situation de privation (figure 14).

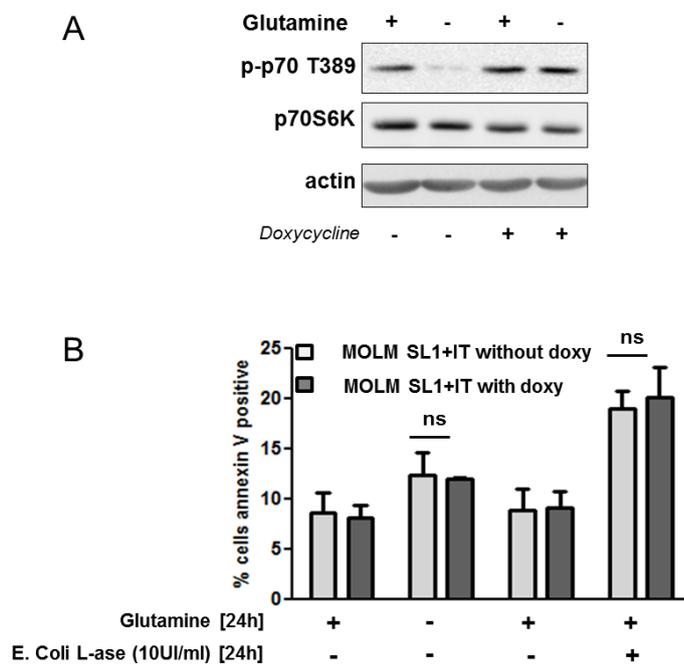


Figure 14. L'apoptose induite par la privation en gln n'implique pas mTORC1. **A.** Le mutant de mTOR SL1+IT est induit par la doxycycline dans la lignée MOLM-14 et la phosphorylation de p70S6K1 est étudiée en privation en gln. **B.** La lignée MOLM-14 SL1+IT est cultivée sans gln ou en présence de L-ase, et l'apoptose est étudiée par marquage annexine V.

Ces résultats nous ont donc conduits à étudier plus précisément le métabolisme de la gln dans les LAM afin de déterminer la voie métabolique exacte utilisée par ces cellules dont l'inhibition conduit aux effets pro-apoptotiques et anti-prolifératifs observés en cas de privation en cet AA.

Dans un premier temps, nous avons étendu l'étude de l'apoptose en condition de privation en gln à 11 lignées de LAM et avons observé une mort cellulaire constante mais hétérogène selon ces lignées. De façon intéressante, cette mort cellulaire est totalement inhibée lorsque les cellules sont cultivées en présence d' α KG, le métabolite essentiel du cycle TCA situé en aval de la glutaminolyse.

Nous nous sommes donc intéressés plus précisément au rôle de la gln dans le maintien d'un cycle TCA et d'une phosphorylation oxydative actifs. Comme attendu, nous montrons que la gln est indispensable à la respiration mitochondriale des cellules leucémiques puisque la consommation en oxygène, étudiée avec l'appareil Seahorse XF96 d'analyse de flux métaboliques, est totalement inhibée en condition de privation en gln, à la fois en situation basale et en présence d'un agent découplant mitochondrial qui permet d'engager les réserves respiratoires mitochondriale de la cellule. L'ajout d' α KG permet de maintenir la phosphorylation oxydative des cellules leucémiques en absence de gln.

Nous avons ensuite approfondi ce résultat en étudiant spécifiquement la glutaminolyse dans les LAM. L'enzyme responsable de ce processus dans les LAM est l'isoforme courte de la GLS1, la GAC. Celle-ci est la GA la plus exprimée au niveau protéique et ARNm dans toutes les cellules primaires et dans les lignées de LAM testées, alors que la KGA l'est à faible niveau ou de façon inconstante et que la GLS2 ne l'est pas du tout. Nous avons aussi montré que le profil d'expression des GA est identique dans les progéniteurs hématopoïétiques normaux CD34+ ce qui indique que l'expression ou la surexpression de la GAC n'est pas un fait observé dans les LAM à l'inverse de ce qui est décrit dans d'autres pathologies tumorales ou des surexpressions de GAC peuvent être rapportées. L'inhibition de la glutaminolyse par deux shARN inductibles par la doxycycline ciblant les deux isoformes de la GLS1 ou par une inhibition pharmacologique par le composé CB-839 (Calithera Biosciences) permet d'inhiber la respiration mitochondriale, réduit de façon drastique la prolifération et induit de l'apoptose dans la majorité des lignées de LAM testées. Ces effets sont également observés dans des cellules primaires alors que les cellules CD34 normales, bien qu'elles expriment la GAC à un niveau similaire, ne sont pas sensibles à l'inhibition de la glutaminolyse en termes d'induction d'apoptose ou d'inhibition de leur prolifération.

Enfin, la mort cellulaire observée est déclenchée par une apoptose mitochondriale intrinsèque, puisque le premier évènement de la cascade apoptotique est la dépolarisation de la membrane mitochondriale. Nous avons donc testé logiquement les effets de l'inhibition de la glutaminolyse en association avec l'inhibition de BCL-2 par l'ABT-199 afin de réaliser un priming mitochondrial et avons pu observer l'induction d'une réponse apoptotique synergique entre ces deux approches thérapeutiques dans deux lignées sensibles.

Ces résultats sont développés dans l'article ci-dessous et en annexe 4 pour les données supplémentaires, en cours de soumission à la revue Blood.

Targeting glutaminolysis has anti-leukemic activity in acute myeloid leukemia and synergizes with BCL-2 inhibition

Nathalie Jacque^{1,6}, Anne Marie Ronchetti^{1,6}, Lise Willems^{1,2,3,6}, Justine Decroocq⁴, Thiago Trovati Maciel⁴, Mireille Lambert^{1,6}, Laury Poulain^{1,6}, Marie Anne Hospital^{1,6}, Pierre Sujobert^{1,6}, Laure Joseph^{1,6}, Nicolas Chapuis^{1,3,6}, Catherine Lacombe^{1,3,6}, Ivan Cruz Moura⁴, Susan Demo⁵, Patrick Mayeux^{1,3,6}, Jérôme Tamburini^{1,2,3,6}, Didier Bouscary^{1, 2, 3,6}

¹Institut Cochin, Département Développement Reproduction Cancer, CNRS UMR8104, INSERM U1016. Paris, France.

²Service d'Hématologie, Hôpital Cochin, AP-HP. Paris, France.

³Université Paris Descartes, Faculté de Médecine Sorbonne Paris Cité.

⁴Inserm U699, Faculté de Médecine Xavier Bichat, Paris, France.

⁵Calithera Biosciences, South San Francisco, California.

⁶Ligue National contre le Cancer, Equipe labellisée

Correspondence:

Didier Bouscary: MD, PhD. Service d'Hématologie, Hôpital Cochin, 27 rue du Faubourg Saint Jacques, 75014, AP-HP. Paris, France. E-mail: didier.bouscary@cch.aphp.fr

Running title

Addiction to glutaminolysis in AML

Key points

Genetic or CB-839-induced GAC inhibition reduces the OXPHOS and has antileukemic activity in AML.

GAC inhibition synergizes with BCL-2 inhibition by ABT-199.

Abstract

Cancer cells require glutamine to adapt to increased biosynthetic activity. Limiting step of intracellular glutamine catabolism involves its conversion to glutamate by glutaminase (GA). Different GA isoforms are encoded by human *GLS1* or *GLS2* genes. We show that glutamine level controls mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) in AML cells. Glutaminase C (GAC) is the GA isoform most prominently expressed in AML. Genetic *GLS1* knockdown or pharmacological inhibition by the drug CB-839 reduces OXPHOS, leading to proliferation arrest and apoptosis of leukemic cells, without cytotoxic activity against normal human CD34+ progenitors. Strikingly, *GLS1* knockdown inhibits tumor formation in a mouse xenotransplantation model. Anti-leukemic activity of CB-839 was abrogated by the expression of a GAC^{K320A} hyperactive allele and by the addition of the TCA cycle product α -ketoglutarate, attesting for the critical nature of *GLS1* function in AML survival. Finally, glutaminolysis inhibition activates mitochondrial apoptosis and synergistically sensitizes leukemic cells to priming with the BCL-2 inhibitor ABT-199. These results show that targeting glutamine addiction through *GLS1* inhibition offers new therapeutic perspectives in AML.

Introduction

Cancer cells survival is dependent on sustained biosynthetic activities promoted by increased nutrients uptake such as glutamine. Energy production required for metabolism depends on glycolysis rather than mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) (Warburg effect), leading to lactate production from glucose¹. However, mitochondrial functions in cancer cells remain intact², allowing tricarboxylic acid (TCA) cycle intermediates to feed biosynthetic pathways. Consequently, cancer cells may become addicted to glutaminolysis – a limiting step of TCA cycle – as glutamine represents a major source of carbon molecules sustaining tumor growth-facilitating metabolic pathways³. The gatekeeper enzyme of glutaminolysis is glutaminase (GA), which catalyzes hydrolysis of glutamine to glutamate. In a second step, glutamate dehydrogenase (GDH) or transaminases produce α -ketoglutarate (α KG) from glutamate to feed the TCA cycle. In mammalian

cells, the GA family comprise two isoforms encoded by *GLS* known as kidney (K-type) glutaminase (KGA) and glutaminase C (GAC) and globally referred to as GLS1^{4,5}. GLS1 and essentially GAC are increased in many cancers compared to normal tissues and targeted inhibition proved antitumor effects⁶⁻⁹. Besides, *GLS2* encodes two liver (L-type) isoenzymes: LGA and GAB, collectively referred to as GLS2¹⁰⁻¹². *GLS2* is a p53 target gene with tumor suppressive functions^{13,14}.

We previously showed that targeting glutamine uptake has robust anti-leukemic activity in acute myeloid leukemia (AML) and we suggested an implication of the mTORC1 signaling pathway downstream glutamine addiction in this context¹⁵. However, little is known on mitochondrial metabolism in AML. Primary AML cells have an increased mitochondrial mass and oxygen consumption compared to normal hematopoietic cells and targeting mitochondrial translation has antileukemic effects¹⁶. Inhibition of mitochondrial respiratory chain complex I by metformin reduces oxygen consumption and induces cytotoxicity in AML¹⁷. Moreover, leukemic stem cells (LSCs) characterized by low reactive oxygen species (ROS) are addicted to OXPHOS rather than glycolysis as OXPHOS targeting using BCL-2 inhibitors results in apoptotic cell death that cannot be compensated by increased glycolysis¹⁸.

We report here that GLS1 and specially the GAC isoform is the major GA isoform expressed at the protein level in AML. Using genetic and pharmacological approaches we show that GLS1 inhibition reduces oxygen consumption rate (OCR), leading to cell proliferation inhibition and apoptosis. In a mouse xenotransplantation model of AML, doxycycline-inducible GLS1 knockdown reduces tumor growth and extends survival. Finally, glutaminolysis inhibition activates a caspase-dependent mitochondrial apoptotic pathway and synergizes with BCL-2 inhibition by CB-839. Our current results show that targeting glutaminolysis represents an interesting strategy to exploit glutamine addiction of AML cells as a therapeutic modality.

Material and methods

Human Primary Samples

Patients and healthy donors provided a written informed consent in accordance with the declaration of Helsinki and approval was obtained from the Cochin Hospital Institutional Ethic Committee. Bone marrow (BM) or peripheral blood (PB) samples

with > 70% blast cell content were obtained from 31 patients with newly diagnosed AML whose characteristics are provided in Supplemental Table 1. The CD34+ fraction enriched in hematopoietic progenitor cells (HPC) from BM healthy donors or umbilical cord blood were purified using MIDIMACS immunoaffinity columns (Milteny Biotech, Bergish Badgash, Germany).

Cell Lines and Reagents

We used MOLM-14, MV4-11, MOLM-13, OCI-AML2, OCI-AML3, HL60, K562, HEL, THP-1, U937 and KG1A AML cell lines, whose main characteristics are listed in Supplemental Table 2. Cells were cultured in RPMI with glutamine (Gibco 61870, Life technologies® Saint Aubin, France) or glutamine-free RPMI (Gibco 21870), supplemented with 10% dialyzed Fetal Bovine Serum (FBS) with or without 4 mM glutamine, as indicated. CB-839 was provided by Calithera Bioscience (San Francisco, CA, USA). Compound 968 was from Merck Millipore (Darmstadt, Germany). BPTES (SML0601) and dimethyl- α KG (34963-1) were from Sigma (St. Louis, MO, USA). Z-IETD-FMK (caspase 8 inhibitor) was from R&D systems (Minneapolis, MN, USA) and the Q-VD-OPh pan-caspase inhibitor (SML0063) was from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). ABT-199 (GDC-0199) was from Selleck Chemical (Houston, TX, USA).

Western Blotting

Whole-cell extracts and WB were performed as described¹⁵. Antibodies against PARP, cleaved-caspase-3, caspase 8, p21 and p27 were obtained from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA); anti- β -actin and anti-GLS2 (HPA038608) antibodies were from Sigma-Aldrich; anti-GAC antibody (19958-1-AP) and anti-GLS1 (20170-1-AP) were from Proteintech (Manchester, UK). Anti-P85 antibody was raised in-house.

Proliferation assays

Cells were seeded at 5×10^4 /ml on day 0 and counted using trypan blue staining after 3, 5 and 7 days.

Apoptosis assay

Apoptosis was quantified by annexin V-PE (Becton Dickinson Biosciences, Le Pont De Claix, France) or TMRE (ab113852 Abcam, Paris, France) staining by flow cytometry.

Lentiviral vectors

GLS1 [TCRN0000045630 (shRNA#5) and TCRN0000045632 (shRNA#7)] and non-targeted (control) shRNAs were purchased from Open Biosystems and cloned into a pLKO-Tet-On inducible or pLKO.1 plasmids (plasmid #21915¹⁹ and #8453²⁰; Addgene, Cambridge, MA). The GAC^{K320A} and GAC^{WT} alleles were cloned from pcDNA hGAC vectors²¹ into the pInducer plasmid²².

Metabolic assays

Intracellular ATP levels were quantified by a luminescence-based cellular assay (CellTiter-Glo®, Promega, Madison, WI, USA). Oxygen consumption was measured using the Seahorse XF96 extracellular flux analyzer as reported²³. Briefly, 2×10^5 cells per condition were seeded in 96-well XF96 well plates coated with BD Cell-Tack (Becton Dickinson Biosciences) and loaded with serum-free unbuffered Dulbecco's Modified Eagle's Medium with (102365-100) or without glutamine (102353-100). After 1 h incubation (37°C without CO₂), steady-state and post-intervention analysis (after 0.25; 0.5 and 1 μM CCCP or 10 μM antimycin) were recorded. Glutamate, malate and citrate concentrations were measured as reported²⁴.

AML xenografts in nude mice

MOLM-14 transduced with a doxycycline (Dox)-inducible GAC shRNA or a control shRNA were subcutaneously injected into nude mice as reported¹⁵. Mice were treated with Dox ad libitum every day for 20 days starting at d1 (n=10). Tumor growth was measured three times per week. All experiments were conducted in accordance with the guidelines of the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International.

Statistical analysis

All data are expressed as mean values with standard deviations. Statistical significance in the differences between experimental groups was determined using the Student's t-test; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ using Prism software

(GraphPad, La Jolla, CA, USA). Experiments done in AML cell lines were performed at least three times separately. Synergistic effects were evaluated using Chalice analyzer online.

Results

Glutamine controls mitochondrial OXPHOS in AML

We previously reported that inhibition of glutamine uptake has anti-leukemic effects in AML¹⁵. We extended this observation to a panel of 11 AML cell lines cultured with or without glutamine. Glutamine removal significantly induced apoptosis in all AML cell lines tested (figure 1A). As glutamine feeds the TCA cycle in many cancers, we hypothesized that apoptosis induced upon glutamine removal resulted from TCA cycle inhibition. In support of that, the TCA cycle intermediate α -ketoglutarate (α KG) prevented glutamine removal-induced apoptosis in OCI-AML2 and MOLM-14 cell lines (Figure 1B). Across 6 different AML cell lines, we observed a rapid decrease in intracellular ATP content upon glutamine removal (Figure S1). OCI-AML2 and MOLM-14 cell lines were cultured with or without glutamine and we observed a significant OCR decrease – as measured by a Seahorse XF96 analyzer – indicative of OXPHOS inhibition in glutamine-deprived AML cells (Figure 1C). The effect of glutamine privation on OCR was blunted by co-incubation with α KG in these cell lines (Figure 1D). These results indicate that AML cells are addicted to glutamine-dependent TCA cycle.

The GAC protein is prominently expressed among GA and controls OCR in AML

We studied the expression of KGA, GAC and GLS2 proteins in 26 primary AML samples, 11 AML cell lines, and 4 normal CD34+ hematopoietic progenitor cells (HPCs) (Figure 2A and S2A). Across these samples, the GAC isoform of GLS1 was constantly expressed while KGA was barely detectable and GLS2 was absent (Figures 2A and S2A). Similar results were observed at the mRNA level (data not shown). We utilized two Dox-inducible hairpins (shRNA#5 and shRNA#7) targeting both GLS1 isoforms. GLS1 knockdown induced in MOLM-14 and OCI-AML2 cells

reduced baseline and CCCP-induced OCR (Figure 2B), indicative of lowered OXPHOS metabolism. Similar results were observed in HL-60 cell line but not in OCI-AML3 (Figure S2B). We then tested the effects of 3 GSL1 inhibitors on OCR. CB-839²⁴ and BPTES²⁵ inhibit both isoforms whereas compound 968 is supposed to be GAC-specific⁸. In OCI-AML2, CB-839 but not BPTES or compound 968 inhibited baseline OCR (Figure 2C). After mitochondrial uncoupling by CCCP, both CB-839 and BPTES reduced OCR in contrast to compound 968. Similar results were observed in MOLM-14 cell line (Figure S2C). In addition to OCR modulations in OCI-AML2, CB-839 and BPTES, but not compound 968, decreased intracellular concentrations of glutamate, malate and citrate which suggests that these compounds are good tools to target glutaminolysis and TCA cycle (Figure 2D). In OCI-AML2, α KG reversed CB-839-induced inhibition of OCR both at the baseline and after decoupling, demonstrating that OCR suppression was related to CB-839-induced glutaminase inhibition in this context (Figure 2E). Similar results were obtained in MOLM-14 cell line (Figure S2D). OCI-AML2 cells were transduced with Dox-inducible GAC^{WT} or GAC^{K320A} alleles (Figure 2F). GAC^{K320A} allele encodes a fiber-prone superactive form of GAC which is insensitive to BPTES²¹. Expression of the GAC^{K320A} mutant in OCI-AML2 cells promoted resistance to CB-839 in terms of impact on the OCR (Figure 2G). Overall, these results indicate that targeting glutaminolysis impacts mitochondrial respiration and OCR.

Targeting glutaminase activity inhibits AML cell proliferation

Expression of shGLS1#5 and shGLS1#7 hairpins was induced in AML cell lines (OCI-AML2, MV4-11, MOLM-14, HL-60 and OCI-AML3) by Dox. Upon GLS1 knockdown, decreased cellular proliferation was observed in all conditions with a more dramatic effect in OCI-AML2 (Figures 3A-B and Supplemental Figure 3A). Cell proliferation was partially restored by co-incubation with α KG (Figure 3C). Among 10 distinct AML cell lines, the CB-839 compound reduced cellular proliferation (Figure 3D) which was blunted by co-incubation with α KG in OCI-AML2, HL-60, MOLM-14 and MV4-11 cell lines (Figure 3E and S3B). In agreement with proliferation blockade, we observed an accumulation of p21^{cip1} and P27^{kip1} proteins in 2 cell lines treated

with CB-839 (Figure S3C). In contrast, CB-839 did not reduce cellular proliferation across 4 different CD34-enriched HPCs samples (Figure 3F).

GLS1 controls AML survival through the TCA cycle

We observed apoptosis – as attested by annexin V staining – in 5 different AML cell lines upon GLS1 knockdown and particularly in OCI-AML2 (Figure 4A) and apoptosis was reduced in cells co-incubated with α KG (Figure S4A). In normal CD34+ HPCs, GLS1 knockdown did not result in significant apoptosis (Figure 4B). shGLS1#5-expressing or control shRNA-expressing MOLM-14 cells were xenografted to NUDE mice. Dox-induced GLS1 knockdown prevented tumor growth and extended mice survival (Figures 4C-D). The anti-leukemic activity resulting from GAC inhibition by CB-839 was then tested on 11 AML cell lines and CB-839 induced apoptosis in 7 of them (Figure 4E). This pro-apoptotic activity was reversed by co-incubation with α KG in OCI-AML2 and HL-60 cells (Figure 4F). Similarly, ectopic expression of the superactive GAC^{K320A} mutant preserved cell viability in CB-839-treated OCI-AML2 cells (Figure 4G). CB-839 also induced apoptosis in primary AML samples but not in normal CD34+ HPCs (Figure 4H). These results indicate that GLS1 inhibition targets leukemic but not normal hematopoietic cells.

GLS1 inhibition induces mitochondrial apoptosis and sensitizes leukemic cells to priming with ABT-199

In OCI-AML2 cells, GLS1 inhibition correlated to mitochondrial depolarization as shown by a decreased proportion of TMRE-positive cells in CB-839-treated and in GLS1-knockdown cells (Figure 5A, upper). Accordingly, GLS1 blockade induced caspase-8, caspase-3 and PARP cleavage (Figure 5A, lower). To determine which pro-apoptotic pathway was engaged downstream of GLS1 disruption, we used a specific caspase-8 inhibitor (IETD) and a pan-caspase inhibitor (QVD). CB-839-induced mitochondrial depolarization was reversed neither by IETD nor QVD while caspase-8 cleavage was abrogated by both inhibitors (Figure 5B). CB-839-induced annexin V staining was prevented by QVD, but not by IETD, ruling out an implication of the caspase-8-dependent extrinsic pathway in CB-839-induced apoptosis (Figure

5B, right panel). In agreement, we hypothesized that mitochondrial priming may potentiate the antileukemic effects resulting from GLS1 inhibition. We co-cultured AML cells with crescent doses of the BH3 mimetic ABT-199 - which specifically inhibits BCL-2²⁶ - and of CB-839. In OCI-AML2 and MOLM-14 cell lines, ABT-199 and CB-839 synergized to induce annexin V staining (Figures 5C-D). The specificity of our observation was corroborated by the absence of impact of BH3 mimetic priming on annexin V staining in the CB-839-resistant OCI-AML3 cell line (Supplemental Figure 5). Overall, these results indicate that glutaminolysis inhibition relies on mitochondrial depolarization and intrinsic caspase-dependent apoptosis to produce anti-leukemic activity and support combination of GLS1 inhibitors to BH3 mimetic compounds as a promising drug combination in a clinical perspective in AML.

Discussion

Targeting glutamine metabolism has recently emerged as a promising approach to cancer treatment because it controls energy formation, survival and growth of cancer cells²⁷. The SLC1A5 plasma membrane transporter promotes intracellular glutamine accumulation which in turns increases leucine uptake via the SLC7A5 amino acid translocator and this process is critical in the activation of the mTORC1 signalling pathway through the Ragulator-Rag complex²⁸. Next to this control of mTORC1 activity, glutamine catabolism begins with glutamine conversion to glutamate in reactions catalyzed by GA that either donate the amide nitrogen to biosynthetic pathways or release it as ammonia. Glutamate, the product of the GA reaction is the most important source of α KG which is a major TCA intermediate and the substrate for dioxygenases, among which are prolyl hydroxylases, histone demethylases and the TET2 5-methylcytosine hydroxylase. The major function of α KG is to sustain OXPHOS through the TCA cycle, thus becoming an important source of energy. However, glutamate also provides precursors for glutathione production which contributes to maintain the oxidative status of cells. It is also a source of amino groups for non-essential amino acids like alanine, aspartate, glycine and serine. Finally, glutamine-derived nitrogen is a component of hexosamine for N-glycosylation reactions and controls nucleic acid synthesis²⁹.

In AML, glutamine controls mTORC1 activity through the amino acid pathway and glutamine depletion blocks protein synthesis¹⁵. Besides mTORC1, the other metabolic pathways dependent on glutamine may account for the antileukemic activity resulting from glutamine privation. In our current report, we show that AML cells are generally addicted to glutamine, dependent on mitochondrial OXPHOS. The critical role of glutamine as a limiting step of the TCA cycle – as attested by the pro-survival activity of the TCA cycle intermediate α KG in glutamine-starved AML cells – prompted us to study the impact of glutaminolysis on AML cell proliferation and survival. In agreement with observations made in other cancer types, we found that GLS1, and particularly the GAC isoform, was the most frequently and strongly expressed GA isoform in AML cells⁷. GLS1 expression level was found within the same range across AML samples but also when compared to normal HPCs, indicating that GLS1 overexpression is probably not a leukemic feature, contrary to other cancer models³⁰.

Three GLS1 inhibitors are currently available: BPTES, compound 938 and CB-839. Among them, CB-839 is currently given in human in phase I clinical trials in solid tumors, lymphoid and myeloid malignancies (NCT02071862, NCT02071888 and NCT02071927). Compound 968 was identified following a small molecule screen in RhoGTPase-transformed fibroblasts and its activity is reported as directed against GAC but not KGA⁸. In our experiments, compound 968 had no effect on glutaminolysis: it did not reduce the measure of OCR and did not impact the TCA metabolite intermediates in AML. Moreover, compound 968 induced mild apoptosis in AML cell lines which was not rescued by α KG, highly suggesting that these functional effects were related to off-target effects (data not shown). In contrast, both BPTES and CB-839 had an impact on TCA cycle and OCR. Strikingly, the pro-apoptotic activity of the clinical candidate molecule CB-839 was blunted by both α KG co-treatment and by the expression of a GAC^{K320A} super-active mutant. These findings, using a pharmacological approach, were corroborated by the effect of GLS1 knockdown achieved by two distinct hairpin sequences in AML cell lines. From these data, we conclude that specific GLS1 blockade – particularly using the CB-839 compound – efficiently eradicates AML cells in a pre-clinical setting.

In normal hematopoiesis, metabolism recently emerged as critically involved in survival, proliferation and stem cell lineage specification. Normal murine HSCs exhibit

high rates of glycolysis favored by high expression of pyruvate dehydrogenase kinase (PDH) that suppresses mitochondrial glucose oxidation, and this process is essential to self-renewal capacities³¹. It was also shown that mice deficient in glycolysis enzymes like M2 pyruvate kinase (PKM2) or lactate dehydrogenase A (LDHA) have hematopoietic defects with abnormal progenitor functions and, in the case of LDHA knockdown, HSCs abnormalities with impaired long term reconstitution capacities³². Glutamine metabolism also regulates human HSCs lineage specification as it was demonstrated that the SLC1A5 glutamine transporter is necessary for erythroid specification by regulating de novo nucleotide biosynthesis³³. In a perspective of therapeutic application of GLS1-targeting in human, we investigated the potential toxicity resulting from GLS1 inhibition on normal haematopoiesis. *GLS1* homozygous deletion is lethal during the first postnatal day due to neurological disorders³⁴. However, the impact of *GLS1* knockout on blood formation has not been reported as yet³⁴. In normal immature CD34+ hematopoietic progenitor cells, our current data show that GLS1 inhibition did not translate to reduced cellular proliferation and/or survival. Moreover, orally given CB-839 did not modified the blood cell count parameters in a mouse xenotransplantation model of breast cancer²⁴. The results of ongoing clinical trials will probably confirm the favourable therapeutic index of GLS1-targeting found in our preclinical analysis.

We further showed that GLS1 inhibition-induced apoptosis engaged caspase activation and mostly involved the intrinsic mitochondrial apoptotic pathway. While the molecular mechanism leading from GLS1 disruption to mitochondrial membrane depolarization remains incompletely understood, this pattern of caspase activation might suggest new therapeutic combinations. Indeed, BH3-mimetic compounds - such as ABT-199 or ABT-737 - are specifically acting on BCL-2, leading to subsequent cytochrome C release and mitochondrial apoptosis through active Bak/Bax dimmers formation³⁵. In primary AML LSCs, high expression of BCL-2 supports a preponderant OXPHOS metabolism and correlates to a high sensitivity to BCL-2 inhibition in this cellular compartment¹⁸. Our current findings on the synergic antileukemic activity of combined BCL-2 (using ABT-199) and GLS1 (using CB-839) inhibition open a route for testing this strategy in clinical trials.

In conclusion, we show a unique sensitivity of AML cells to glutaminolysis inhibition due to a sustained TCA cycle and OXPHOS activity. Our analysis of the molecular

mechanisms of apoptosis downstream GLS1 inhibition also provides the molecular basis for synergistic GLS1 and BCL-2 inhibitors combination as a new therapeutic strategy in AML.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Institut National du Cancer (INCa; Projet recherche translationnelle TRANSLA13-087) for the funding of NJ and from the Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC; Equipe Labellisée EL2014. N° Projet : R14077KK). We thank Dr Andre LB Ambrosio for the pcDNA hGAC WT and K320A plasmids.

Authorship Contributions

NJ analysed data, performed the experiments and wrote the manuscript. AMR, LW, JD, LP, MAH, PS, LJ performed experiments. TTM and ICM performed in vivo experiments. ML helped designing the molecular constructions. NC performed the cytological and flow cytometry analysis on primary AML samples. CL and PM wrote the manuscript. SD provided the CB-839 compound and analysed data. JT analysed data and wrote the manuscript. DB designed the research plan, analyzed the data and wrote the manuscript.

Disclosure

The authors declare no competing financial interests.

References

1. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956;123(3191):309–314.
2. Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J*. 2007;274(6):1393–1418.
3. DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, et al. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2007;104(49):19345–19350.
4. Curthoys NP, Watford M. Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annu. Rev. Nutr*. 1995;15:133–159.

5. Elgadi KM, Meguid RA, Qian M, Souba WW, Abcouwer SF. Cloning and analysis of unique human glutaminase isoforms generated by tissue-specific alternative splicing. *Physiol. Genomics*. 1999;1(2):51–62.
6. Gao P, Tchernyshyov I, Chang T-C, et al. c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature*. 2009;458(7239):762–765.
7. Cassago A, Ferreira APS, Ferreira IM, et al. Mitochondrial localization and structure-based phosphate activation mechanism of Glutaminase C with implications for cancer metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012;109(4):1092–1097.
8. Wang J-B, Erickson JW, Fuji R, et al. Targeting mitochondrial glutaminase activity inhibits oncogenic transformation. *Cancer Cell*. 2010;18(3):207–219.
9. Seltzer MJ, Bennett BD, Joshi AD, et al. Inhibition of glutaminase preferentially slows growth of glioma cells with mutant IDH1. *Cancer Res*. 2010;70(22):8981–8987.
10. Aledo JC, Gómez-Fabre PM, Olalla L, Márquez J. Identification of two human glutaminase loci and tissue-specific expression of the two related genes. *Mamm. Genome Off. J. Int. Mamm. Genome Soc.* 2000;11(12):1107–1110.
11. De la Rosa V, Campos-Sandoval JA, Martín-Rufián M, et al. A novel glutaminase isoform in mammalian tissues. *Neurochem. Int.* 2009;55(1-3):76–84.
12. Martín-Rufián M, Tosina M, Campos-Sandoval JA, et al. Mammalian glutaminase Gls2 gene encodes two functional alternative transcripts by a surrogate promoter usage mechanism. *PLoS One*. 2012;7(6):e38380.
13. Hu W, Zhang C, Wu R, et al. Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010;107(16):7455–7460.
14. Suzuki S, Tanaka T, Poyurovsky MV, et al. Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a p53-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010;107(16):7461–7466.
15. Willems L, Jacque N, Jacquelin A, et al. Inhibiting glutamine uptake represents an attractive new strategy for treating acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013;122(20):3521–3532.
16. Skrtić M, Sriskanthadevan S, Jhas B, et al. Inhibition of mitochondrial translation as a therapeutic strategy for human acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2011;20(5):674–688.
17. Scotland S, Saland E, Skuli N, et al. Mitochondrial energetic and AKT status mediate metabolic effects and apoptosis of metformin in human leukemic cells. *Leukemia*. 2013;27(11):2129–2138.
18. Lagadinou ED, Sach A, Callahan K, et al. BCL-2 inhibition targets oxidative phosphorylation and selectively eradicates quiescent human leukemia stem cells. *Cell Stem Cell*. 2013;12(3):329–341.

19. Wiederschain D, Wee S, Chen L, et al. Single-vector inducible lentiviral RNAi system for oncology target validation. *Cell Cycle Georget. Tex.* 2009;8(3):498–504.
20. Stewart SA, Dykxhoorn DM, Palliser D, et al. Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *RNA N. Y. N.* 2003;9(4):493–501.
21. Ferreira APS, Cassago A, Gonçalves K de A, et al. Active glutaminase C self-assembles into a supratetrameric oligomer that can be disrupted by an allosteric inhibitor. *J. Biol. Chem.* 2013;288(39):28009–28020.
22. Meerbrey KL, Hu G, Kessler JD, et al. The pINDUCER lentiviral toolkit for inducible RNA interference in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011;108(9):3665–3670.
23. Varum S, Rodrigues AS, Moura MB, et al. Energy metabolism in human pluripotent stem cells and their differentiated counterparts. *PloS One.* 2011;6(6):e20914.
24. Gross MI, Demo SD, Dennison JB, et al. Antitumor activity of the glutaminase inhibitor CB-839 in triple-negative breast cancer. *Mol. Cancer Ther.* 2014;13(4):890–901.
25. Robinson MM, McBryant SJ, Tsukamoto T, et al. Novel mechanism of inhibition of rat kidney-type glutaminase by bis-2-(5-phenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide (BPTES). *Biochem. J.* 2007;406(3):407–414.
26. Pan R, Hogdal LJ, Benito JM, et al. Selective BCL-2 inhibition by ABT-199 causes on-target cell death in acute myeloid leukemia. *Cancer Discov.* 2014;4(3):362–375.
27. Hensley CT, Wasti AT, DeBerardinis RJ. Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities. *J. Clin. Invest.* 2013;123(9):3678–3684.
28. Nicklin P, Bergman P, Zhang B, et al. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell.* 2009;136(3):521–534.
29. Wellen KE, Lu C, Mancuso A, et al. The hexosamine biosynthetic pathway couples growth factor-induced glutamine uptake to glucose metabolism. *Genes Dev.* 2010;24(24):2784–2799.
30. Van den Heuvel APJ, Jing J, Wooster RF, Bachman KE. Analysis of glutamine dependency in non-small cell lung cancer: GLS1 splice variant GAC is essential for cancer cell growth. *Cancer Biol. Ther.* 2012;13(12):1185–1194.
31. Takubo K, Nagamatsu G, Kobayashi CI, et al. Regulation of glycolysis by Pdk functions as a metabolic checkpoint for cell cycle quiescence in hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2013;12(1):49–61.
32. Wang Y-H, Israelsen WJ, Lee D, et al. Cell-State-Specific Metabolic Dependency in Hematopoiesis and Leukemogenesis. *Cell.* 2014;158(6):1309–1323.

33. Oburoglu L, Tardito S, Fritz V, et al. Glucose and glutamine metabolism regulate human hematopoietic stem cell lineage specification. *Cell Stem Cell*. 2014;15(2):169–184.
34. Masson J, Darmon M, Conjard A, et al. Mice lacking brain/kidney phosphate-activated glutaminase have impaired glutamatergic synaptic transmission, altered breathing, disorganized goal-directed behavior and die shortly after birth. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 2006;26(17):4660–4671.
35. Konopleva M, Watt J, Contractor R, et al. Mechanisms of antileukemic activity of the novel Bcl-2 homology domain-3 mimetic GX15-070 (obatoclax). *Cancer Res.* 2008;68(9):3413–3420.

Figure 1

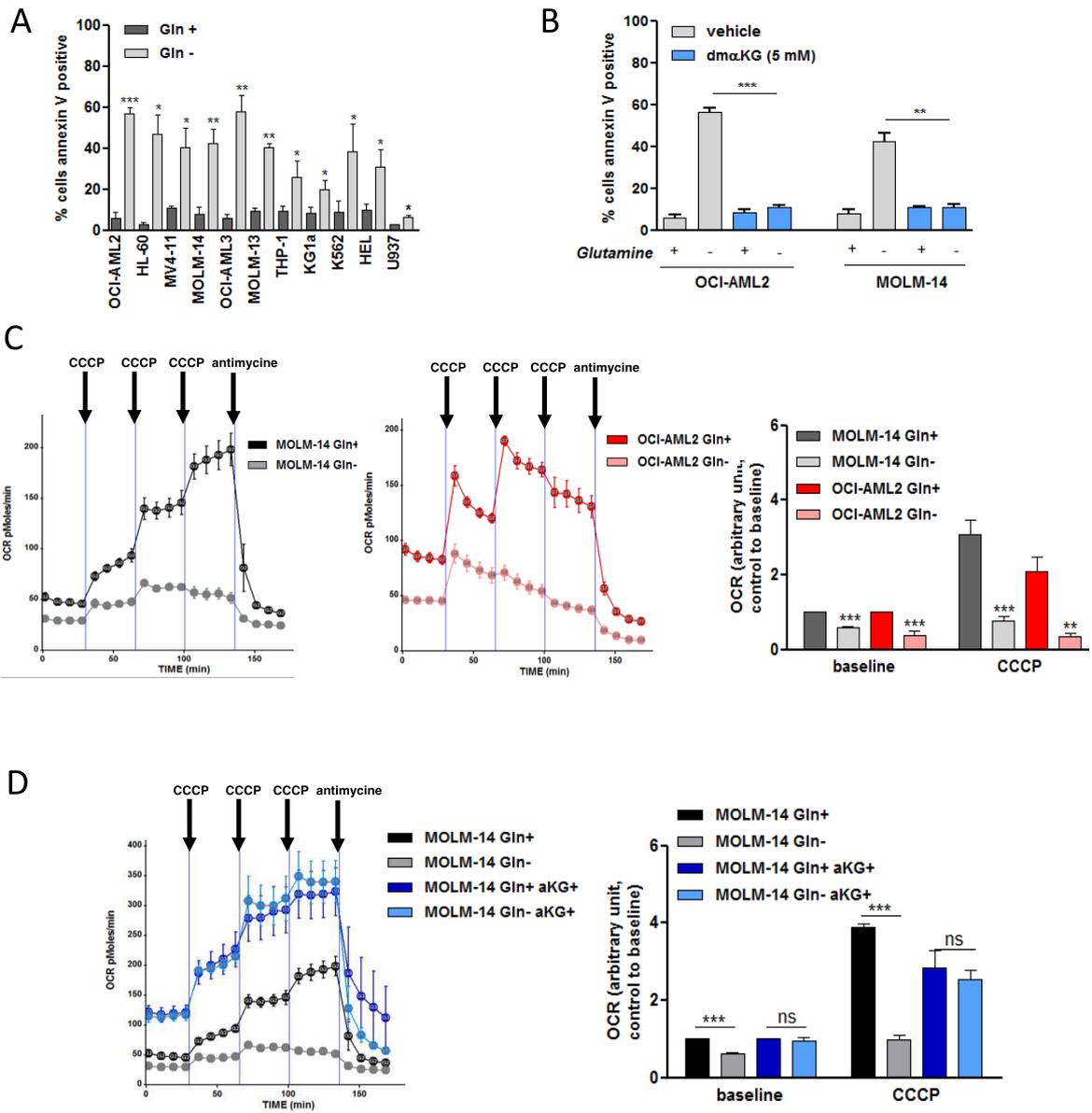
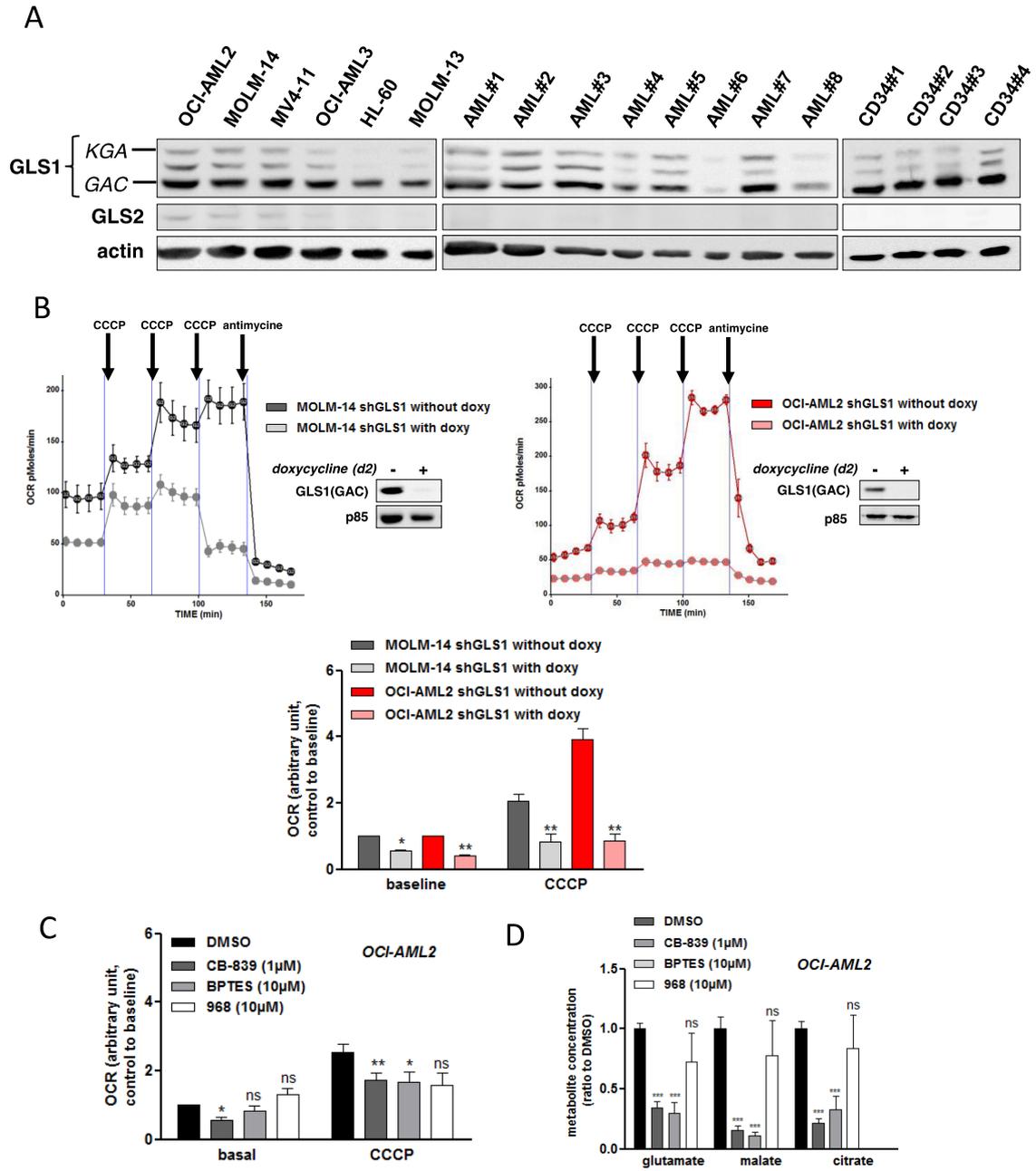


Figure 2



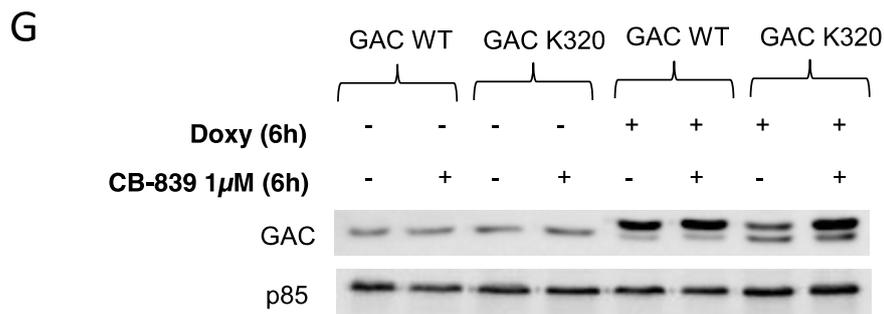
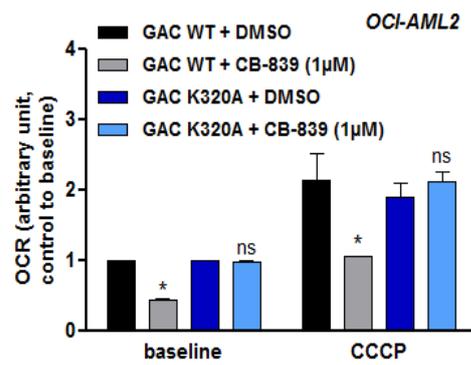
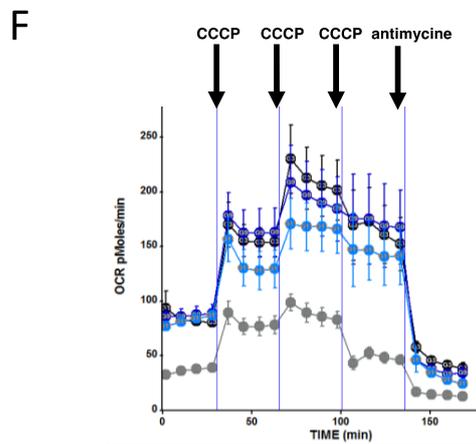
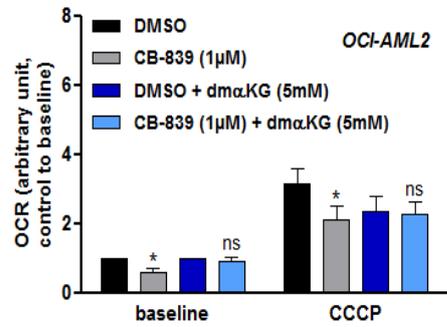
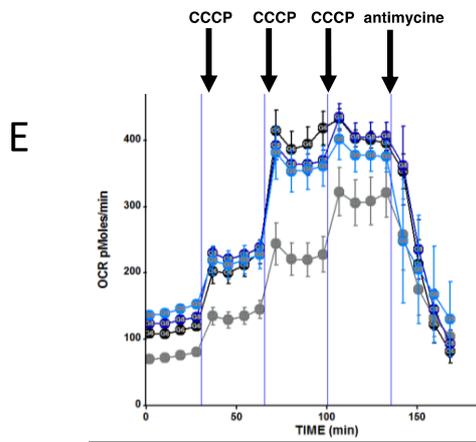
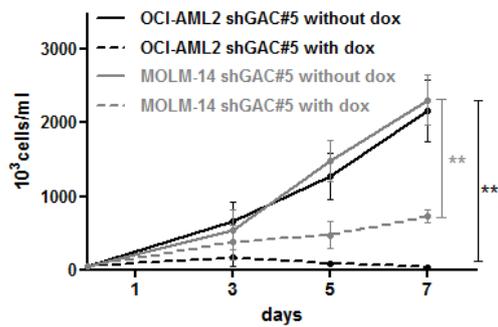
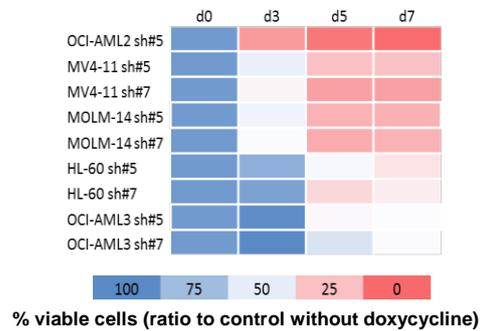


Figure 3

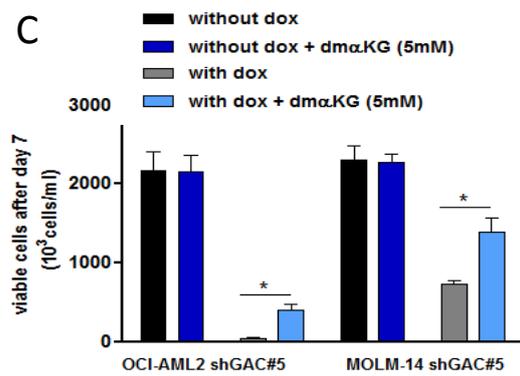
A



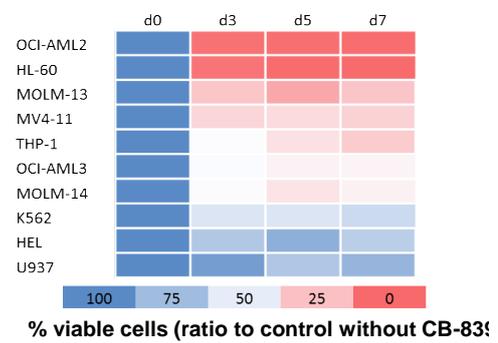
B



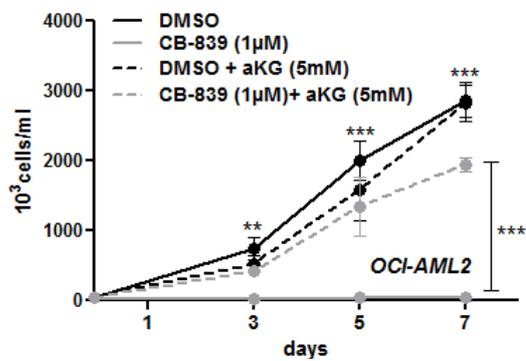
C



D



E



F

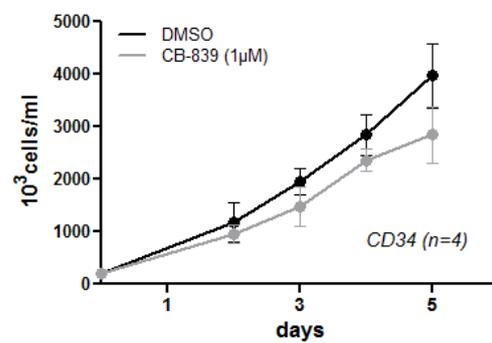


Figure 4

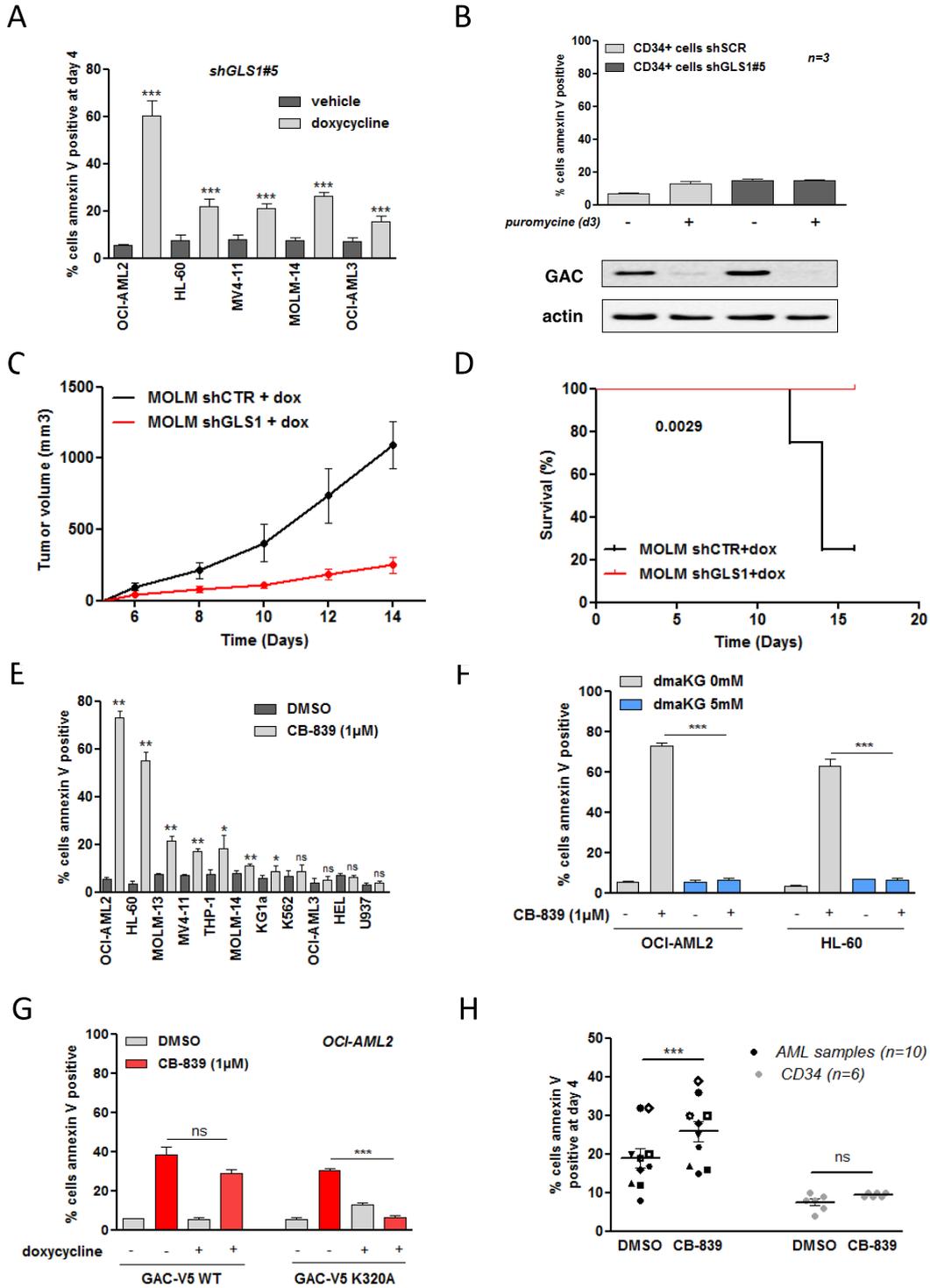
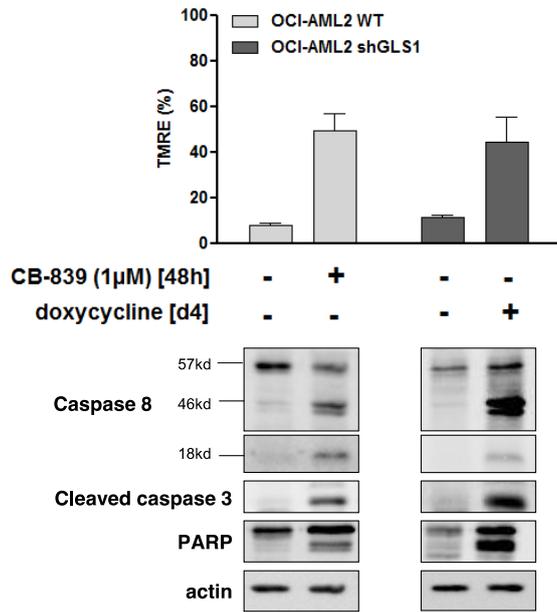
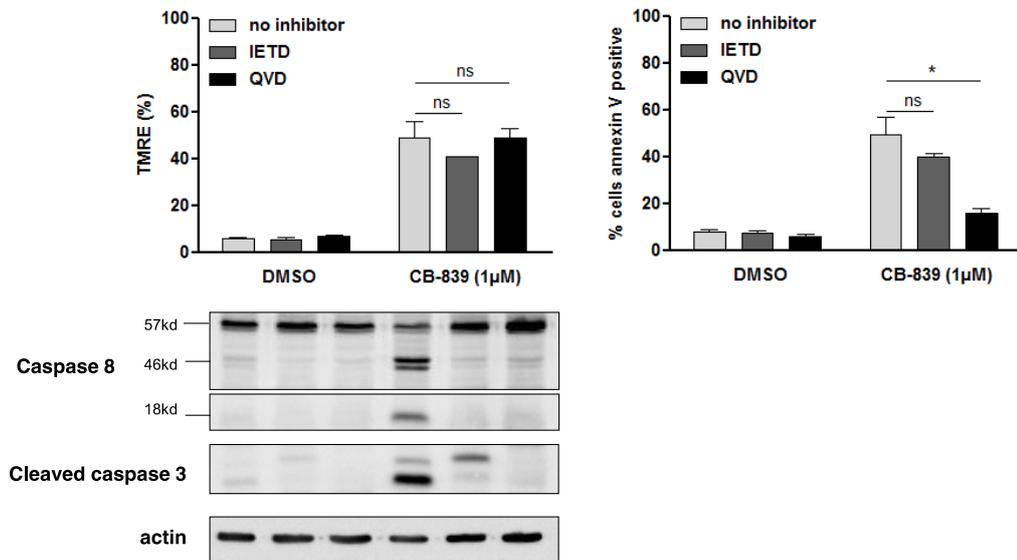


Figure 5

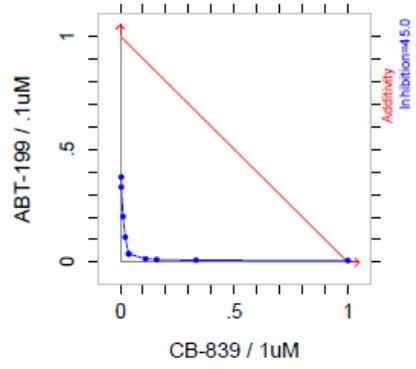
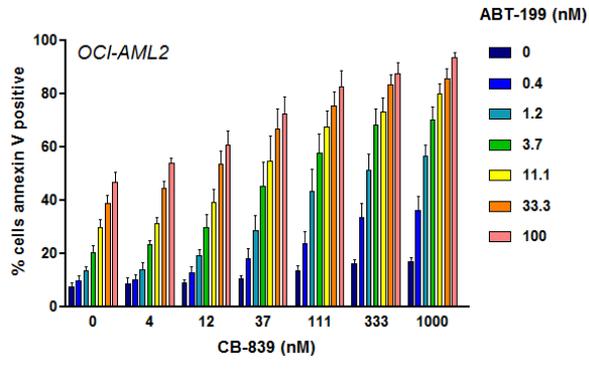
A



B



C



D

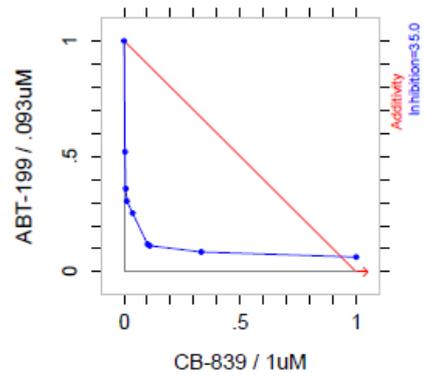
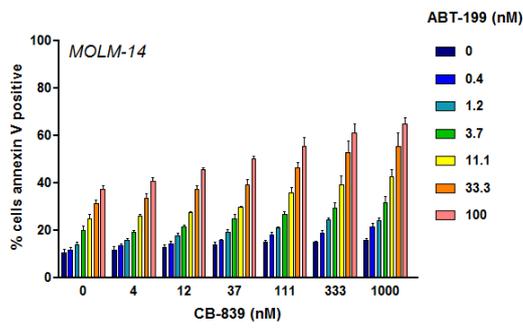


Figure Legends

Figure 1

A. Eleven AML cell lines were cultured with or without Gln (4 mM) for 48 hours. Apoptosis was then quantified by flow cytometric analysis of annexin V binding. **B.** OCI-AML2 and MOLM-14 cell lines were cultured for 48 hours with or without Gln (4 mM) and dmaKG (5 mM) as indicated, and apoptosis was quantified by annexin V binding. **C.** OCI-AML2 and MOLM-14 cell lines were cultured for 48 hours with or without Gln (4 mM) and the O₂ consumption rate (OCR) was then measured using the Seahorse XF96 extracellular flux analyzer, both under basal conditions and after the addition of increasing doses of CCCP (addition of 0.25, 0.25 and 0.5 μ M) and antimycin (10 μ M), as indicated. Histograms show the representation of 3 independent experiments, at baseline or after CCCP (cumulated dose 1 μ M). **D.** MOLM-14 cell lines were cultured for 48 hours with or without Gln (4mM) and dmaKG (5mM) as indicated and the O₂ consumption rate (OCR) was then measured as in C. Histograms show the representation of 3 independent experiments.

Figure 2

A. Human leukemic cell lines, AML cells from 8 patients and normal CD34⁺ HPCs from 4 healthy donors were analyzed by WB using anti-GLS1, anti-GLS2 and anti-actin antibodies. **B.** MOLM-14 (left panel) and OCI-AML2 (right panel) cells were infected with a lentiviral vector expressing a doxycycline inducible GLS1 shRNA (#5). Stably infected cell lines were established under puromycin selection. After 2 days of doxycycline exposure, the O₂ consumption rate (OCR) was measured using the Seahorse XF96 extracellular flux analyzer, both under basal conditions and after the addition of CCCP and antimycin, as indicated. The inhibition of GAC expression was controlled in WB using anti-GAC antibody. Histograms show the representation of 3 independent experiments. **C.** OCI-AML2 cells were cultured with or without CB-839 (1 μ M), BPTES (10 μ M) or 968 (10 μ M) for 6 hours and the O₂ consumption rate (OCR) was measured using the Seahorse XF96 extracellular flux analyzer. Histograms show the representation of 3 independent experiments. **D.** OCI-AML2 cells were cultured with or without CB-839 (1 μ M), BPTES (10 μ M) or 968 (10 μ M) for 4 hours and 5 million cells were washed twice in cold PBS; the pellet was frozen and the indicated metabolite was measured. **E.** OCI-AML2 cells were cultured with or without CB-839 (1 μ M) and dmaKG (5mM) for 6 hours and the O₂ consumption rate (OCR) was measured using the Seahorse XF96 extracellular flux analyzer. Histograms show the representation of 3 independent experiments. **F.** OCI-AML2 cells were infected

with a lentiviral vector expressing a doxycycline inducible GAC WT or GAC K320A both tagged with V5. Stably infected cell lines were established under puromycin selection. After 6 hours of doxycycline exposure with or without CB-839, the O₂ consumption rate (OCR) was measured using the Seahorse XF96 extracellular flux analyzer, both under basal conditions and after the addition of CCCP and antimycin, as indicated. Histograms show the representation of 3 independent experiments **G**. OCI-AML2 cells stably infected with GAC WT or GAC K320A were cultured 6 hours with or without doxycycline or CB-839 (1 μ M) and analyzed by WB using anti-GAC anti-actin antibodies.

Figure 3

A. OCI-AML2 and MOLM-14 shGLS1#5 leukemic cells were seeded at 5×10^5 cells/ml with and without doxycycline and viable cells were counted following trypan blue staining at days 3, 5 and 7. Each experiment was performed at least 3 times independently. **B.** OCI-AML2, MV4-11, MOLM-14, HL-60 and OCI-AML3 cells infected with shGLS1#5 or #7 were seeded at 5×10^5 cells/ml with and without doxycycline and viable cells were counted following trypan blue staining at days 3, 5 and 7. Each experiment was performed at least 3 times independently. **C.** OCI-AML2 and MOLM-14 shGLS1#5 leukemic cells were seeded at 5×10^5 cells/ml with and without doxycycline and dmaKG (5mM) and viable cells were counted following trypan blue staining at day 7. **D.** Ten cell lines were seeded at 5×10^5 cells/ml with and without CB-839 (1 μ M) and viable cells were counted following trypan blue staining at days 3, 5 and 7. **E.** OCI-AML2 cells were seeded at 5×10^5 cells/ml with and without CB-839 (1 μ M) and dmaKG (5mM) and viable cells were counted following trypan blue staining at days 3, 5 and 7. **F.** CD34+ HPCs from 4 healthy donors were seeded at 5×10^5 cells/ml with and without CB-839 (1 μ M) and viable cells were counted following trypan blue staining at days 2, 3, 4 and 5.

Figure 4

A. ShGLS1#5 was induced during 4 days in OCI-AML2, HL-60, MV4-11, MOLM-14 and OCI-AML3 leukemic cells with doxycycline, and apoptosis was evaluated using annexin-V binding. **B.** CD34+ HPCs from 3 healthy donors were infected with a lentiviral vector expressing a non-inducible GLS1 shRNA (#5) and selected in puromycin for 2 days; 3 days after, apoptosis was evaluated using annexin-V staining and protein extracts were immunoblotted with anti-GAC and actin antibodies. **C.** MOLM-14 shGLS1 cells or MOLM-14 shCTR cells were injected into 10 nude mice (2.5×10^6 in each side). The mice were then treated with doxycycline by oral gavage and the tumor volumes were

determined every two days during 14 days. **D.** Kaplan-Meier survival curves of nude mice treated with doxycycline. **E.** Eleven cell lines were cultured 4 days with and without CB-839 (1 μ M) and apoptosis was evaluated using annexin-V staining. **F.** OCI-AML2 and HL-60 cells were cultured 4 days with and without CB-839 (1 μ M) and dmaKG (5mM) and apoptosis was evaluated using annexin-V staining. **G.** OCI-AML2 cells stably infected with GAC WT or GAC K320A were cultured 2 days with or without doxycycline or CB-839 (1 μ M) and apoptosis was evaluated using annexin-V staining. **H.** AML samples from 10 patients and CD34+ HPCs from 6 healthy donors were cultured 4 days with and without CB-839 (1 μ M) and apoptosis was evaluated using annexin-V staining.

Figure 5

A. OCI-AML2 WT or infected with shGLS1#5 were cultured with or without CB-839 (1 μ M) or doxycycline as indicated. Apoptosis was evaluated in WB using anti-caspase 8, cleaved caspase 3, PARP and actin antibodies. **B.** OCI-AML2 cells were cultured with or without CB-839 (1 μ M) and with or without a caspase 8 inhibitor (IETD) or a pan-caspase inhibitor (QVD); protein extracts were immunoblotted with using anti-caspase 8, cleaved caspase 3 and actin antibodies. Mitochondrial depolarization was evaluated using TMRE staining and apoptosis using annexin V staining. **C.** OCI-AML2 cells were cultured 1 day with or without the indicated doses of CB-839 and ABT-199 and apoptosis was evaluated using annexin-V staining. Synergy was evaluated using Chalice software. **D.** MOLM-14 cells were cultured 1 day with or without the indicated doses of CB-839 and ABT-199 and apoptosis was evaluated using annexin-V staining. Synergy was evaluated using Chalice software.

CONCLUSIONS et PERSPECTIVES

La reprogrammation métabolique des cancers apparait ces dernières années comme un vaste champ d'investigations thérapeutiques. Les cellules cancéreuses, et notamment les cellules de LAM, sont dépendantes d'une biosynthèse accrue pour leur survie et leur prolifération. Plusieurs substrats métaboliques sont indispensables pour assurer ces besoins augmentés : le glucose, les lipides et la glutamine.

Dans mon travail de thèse, je me suis intéressée spécifiquement au métabolisme de la gln dans les LAM, en abordant deux voies métaboliques dépendantes de cet AA: la voie des synthèses protéiques, via le contrôle de l'activation du complexe mTORC1 et la phosphorylation oxydative via la régulation de la glutaminolyse.

Dans un premier temps, nous avons démontré que le ciblage de l'entrée de la gln dans les cellules de LAM inhibait fortement le complexe mTORC1, induisait l'apoptose des cellules leucémiques et avait des effets antileucémiques *in vivo* importants dans un modèle de xénotransplantation. Concernant l'import de la gln dans les cellules de LAM, nous avons observé que l'inhibition du transporteur principal de la gln, le SLC1A5, n'induisait pas l'apoptose dans toutes les lignées leucémiques testées. Cette variabilité pourrait être liée à l'expression d'autres transporteurs de la glutamine, notamment SNAT2 que nous n'avons pas explorée.

Nous avons montré que la L-ase avait un effet pro-apoptotique important dans les LAM. Cette drogue a été utilisée dès les années 1980 et a montré des résultats intéressants mais le rationnel à son utilisation n'était pas connu dans cette pathologie à l'inverse des LAL qui sont très sensibles à la privation en asparagine (Capizzi et al., 1988). Nous avons montré que les cellules de LAM ne sont pas sensibles à la privation en asparagine mais très sensibles par contre à la privation en glutamine qui est réalisée brutalement par la L-ase du fait de son activité de glutaminase. Ces résultats relancent donc l'intérêt de l'utilisation de la L-ase comme outil thérapeutique dans les LAM avec une approche mécanistique en partie élucidée et pourrait être incluse dans de nouveaux protocoles thérapeutiques. Par ailleurs, l'autophagie semble être un mécanisme de résistance à la L-ase, puisque l'apoptose induite par ce composé est en partie inhibée en présence de shARN anti-beclin ou anti-ATG5. Nous allons donc étudier l'intérêt d'associer la L-ase à un inhibiteur d'autophagie, comme le SAR405, inhibiteur de la PI3K de classe III Vps34, qui inhibe la formation d'endosomes tardifs et agit en synergie avec l'inhibition de mTORC1 dans un modèle de cancer du rein (Ronan et al., 2014).

Néanmoins, les effets fonctionnels observés lors de la privation en glutamine ou par la L-ase sont plus importants que ceux observés lors de l'inhibition de mTORC1 seule. En ce qui concerne l'effet sur la

mort cellulaire, on sait (et données du laboratoire) que les inhibiteurs de première génération de mTORC1, inhibiteurs allostériques dérivés de la rapamycine, n'induisent pas d'apoptose significative dans les lignées de LAM ou dans les blastes primaires mêmes à des concentrations élevées et des durées d'exposition prolongées. On sait également que les inhibiteurs de deuxième génération de mTOR, appelées Torkinhibs (tels que l'AZD8055 ou le NVP-BEZ235), qui agissent comme compétiteurs de la fixation d'ATP dans la poche kinase de mTOR au sein des deux complexes mTORC1 et mTORC2, ont des effets antiprolifératifs et induisent de l'apoptose dans les cellules leucémiques de LAM mais à des degrés moins importants que ce que nous observons en situation de privation en gln (Chapuis et al., 2010; Willems et al., 2012). De plus, lorsque l'activité du complexe mTORC1 est maintenue par le mutant mTOR SL1+IT, la privation en gln induit toujours de l'apoptose. L'inhibition de mTORC1 en aval de la gln a donc probablement des effets uniquement ou essentiellement antiprolifératifs, et l'apoptose observée est donc la conséquence d'autres phénomènes.

Le métabolisme de la glutamine est complexe et cet AA participe à de nombreux processus indispensables à la survie cellulaire. Lorsque la gln entre dans la cellule, elle est rapidement dégradée en glutamate par des glutaminases. Ces glutaminases sont soit cytoplasmiques, soit mitochondriales. Dans les LAM, nous avons observé une expression protéique principale de l'isoforme GAC de la GLS1 et celle-ci est localisée uniquement dans la mitochondrie (résultats non montrés). Nous n'avons pas étudié la localisation de l'isoforme KGA, peu exprimée dans nos cellules, et qui semble principalement cytoplasmique dans les modèles de cancers étudiés (Cassago et al., 2012). Le glutamate produit par la glutaminolyse peut être utilisé dans la mitochondrie par le cycle TCA via l' α KG ou servir dans la synthèse du glutathion au niveau cytoplasmique. Comme l'isoforme GAC est plus exprimé dans les LAM, nous pouvons faire l'hypothèse que l'utilisation de la gln vers la voie du cycle TCA est peut-être plus importante que son utilisation pour la synthèse du glutathion. Cependant, nous n'avons pas encore étudié les effets de la privation en gln et /ou de l'inhibition de la glutaminolyse sur le stress oxydatif. Par ailleurs, nos outils (shARN et inhibiteur pharmacologique CB-839) inhibent les deux isoformes (KGA et GAC) et il est donc possible que la synthèse du glutathion à partir du glutamate soit également affectée.

Une grande partie de mon travail de thèse a consisté à identifier le meilleur outil pour étudier l'inhibition de la glutaminolyse. En effet, depuis environ 5 ans, plusieurs inhibiteurs pharmacologiques ont été décrits et ont fait l'objet de publications dans le domaine de la cancérologie. Le premier synthétisé, le BPTES, est reconnu comme inhibant spécifiquement les deux isoformes de la GLS1, mais est peu utilisable en pratique car peu soluble dans l'eau (Robinson et al., 2007). Le deuxième inhibiteur décrit est le composé 968, identifié dans une banque pharmacologique et ayant un effet sur la transformation oncogénique par les Rho-GPTases (Wang et al., 2010). Ce composé est également peu soluble, et mes résultats montrent qu'il n'a sans doute pas d'activité anti-glutaminase

spécifique dans les LAM. En effet, le composé 968 ne diminue pas le glutamate intracellulaire, n'altère pas la phosphorylation oxydative et ses effets sur les lignées de LAM ne sont pas compensés par l' α KG (résultats non montrés). Cependant, ce composé a un effet anti leucémique potentiellement intéressant, puisqu'il inhibe la prolifération des lignées de LAM et induit l'apoptose des cellules primaires de LAM, sans affecter les cellules CD34+ normales (résultats non montrés), mais la cible exacte dans les cellules de LAM responsable de ces effets reste à identifier. Plus récemment, un inhibiteur spécifiques de la GLS1 et utilisable en clinique a été publié, le CB-839 (Calithera Biosciences) (Gross et al., 2014). Cet inhibiteur s'est en effet avéré être un très bon outil, puisqu'il diminue les concentrations de glutamate intracellulaire, inhibe la phosphorylation oxydative et ceci de façon GLS1-spécifique, puisqu'il n'a plus aucun effet métabolique ou fonctionnel lorsque on fait exprimer de façon ectopique un mutant super actif de la GAC (mutant GAC K320A).

J'ai ensuite pu étudier les effets réels et spécifiques liés à l'inhibition de la glutaminolyse grâce au CB-839. J'ai également utilisé deux shARN inductibles par la doxycycline qui ciblent les deux isoformes de la GLS1. Avec ces outils, j'ai observé un effet variable en fonction des lignées de LAM et des cellules de patients. En effet, bien que la plupart des cellules soient sensibles, certaines lignées, comme OCI-AML3, se sont avérées résistantes à l'inhibition spécifique de la glutaminolyse alors même qu'elles restent le plus souvent sensibles à la privation en glutamine. L'exemple de la lignée OCI-AML3 est particulièrement intéressant de ce point de vue puisqu'elle est paradoxalement très sensible à la privation en gln et à la L-ase, alors que le shARN GLS1 ne diminue pas sa consommation en oxygène de façon significative. L'utilisation de la gln dans cette lignée est donc évidemment très différente de celle des autres lignées leucémiques et le cycle TCA n'est potentiellement pas dépendant de la gln dans ce modèle. La suite immédiate du travail va être d'étudier précisément les voies métaboliques qu'utilise la glutamine dans les lignées sensibles ou non au CB-839 mais sensibles à la privation en glutamine, en utilisant la technique de marquage radioactif des carbones et azotes de la gln. Un prérequis pour comprendre ce qui se passe dans ces lignées résistantes à l'inhibition de la glutaminolyse est de vérifier que l'on observe bien une inhibition des métabolites du cycle TCA en présence de CB-839 comme nous l'avons vu dans les lignées sensibles. Il serait également intéressant d'étudier la glycolyse par marquage radioactif du glucose, afin de mieux comprendre le rôle de chaque voie métabolique dans les LAM. Une autre piste que nous allons explorer est de déterminer si les cellules résistantes ne pourraient pas exprimer, de base ou induite par le traitement par CB-839, l'enzyme pyruvate carboxylase (PC). La PC est une enzyme de type ligase qui catalyse la carboxylation de pyruvate en oxaloacétate, qui pourrait ensuite être consommé par le cycle TCA. Les lignées résistantes pourraient peut-être utiliser cette voie située en aval de la glycolyse pour maintenir un cycle TCA actif, même en absence de glutamate. A cet égard, j'ai pu montrer que la concentration en pyruvate du milieu de culture utilisé pour étudier les effets du CB-839 modifiait totalement la sensibilité à l'inhibition de la glutaminolyse. En effet, le CB-839 n'a plus d'effet lorsque l'on ajoute

du pyruvate à forte concentration (1mM) au milieu de culture (résultats non montrés), ce qui indique que la PC est probablement active dans les cellules de LAM. Il serait donc intéressant d'inhiber de la PC (par exemple par shARN) et d'étudier alors les effets de l'inhibiteur de la glutaminolyse.

Les mécanismes précis conduisant à la mort cellulaire des cellules de LAM après privation en glutamine ne sont pas encore bien identifiés. Nous observons une forte diminution de la respiration mitochondriale à la fois par la privation en glutamine et par l'inhibition de la glutaminolyse. La baisse de l'ATP consécutive pourrait induire l'apoptose via l'activation de l'AMPK. J'ai cependant observé l'absence d'activation de cette voie par la L-ase ou lors de la privation en gln, et une activation très transitoire en présence de CB-839 : les protéines AMPK et son substrat ACC sont faiblement phosphorylées après 4h d'exposition au CB-839 mais pas après 24h (données non montrées). Ces résultats indiquent une participation minime de l'AMPK dans l'apoptose induite en aval de la privation en gln ou de l'inhibition de la glutaminolyse. L'inhibition de la respiration mitochondriale semble avoir un effet antitumoral majeur dans les LAM. Très récemment, l'équipe de Marina Konopleva au MD Anderson a présenté l'utilisation d'un inhibiteur du complexe I de la chaîne respiratoire, l'IACS-1131, qui induit de l'apoptose dans certaines lignées de LAM (Matre et al., 2014). Cet inhibiteur perturbe le cycle TCA, inhibe la synthèse de nombreux AA et induit un stress oxydant, tous ces mécanismes pouvant être à l'origine ou additifs pour expliquer la mort cellulaire. Nous avons observé que l'inhibition de la chaîne respiratoire induisait la dépolarisation de la membrane interne mitochondriale et conduisait à l'apoptose. Cependant, les mécanismes moléculaires précis ainsi que les protéines pro-apoptotiques recrutées dans ce processus ne sont pas encore connues. L'utilisation du CB-839 sur une banque d'interférence ARN ciblée sur les molécules impliquées dans l'apoptose pourrait nous permettre de mieux identifier les protéines indispensables à l'apoptose induite par l'inhibition de la glutaminolyse. Enfin, nous avons retrouvé un effet antileucémique et une induction d'apoptose synergique lors de l'utilisation concomitante du CB-839 et de l'inhibiteur de BCL-2, l'ABT-199. Les mécanismes entraînant l'apoptose semblent donc être renforcés par un priming mitochondrial. Nous n'avons pas testé les effets d'un priming mitochondrial direct par peptides spécifiques (Bim, Bax, etc...) ni réalisé de profil BH3 dans nos cellules, mais nos résultats suggèrent que l'utilisation de ces deux agents pourrait avoir un intérêt en pratique clinique.

Les résultats hétérogènes obtenus en fonction des lignées et chez les patients ne sont pas expliqués par les anomalies moléculaires sous-jacentes. Le petit nombre de patients étudiés jusque-là ne nous permet pas d'extrapoler les résultats observés en fonction du type de LAM. Une étude réalisée sur quelques cellules primaires ex vivo montre une sensibilité préférentielle au BPTES des LAM à mutations d>IDH1 et IDH2 par rapport à des leucémies IDH WT. Lors de mon travail de thèse, j'ai mis au point des constructions lentivirales inductibles ou non pour faire exprimer les différentes formes d>IDH mutées (IDH1 R132C, IDH2R172H, et IDH2R140Q) dans des lignées de LAM ; j'ai cependant été limitée par l'expression très différente des protéines IDH en fonction du statut muté ou non, et n'ai pu

pour le moment tirer de conclusion. Une fois ces constructions mise au point, il serait intéressant d'étudier leur sensibilité au CB-839, de doser le 2HG et d'étudier la différenciation de ces lignées. Il sera également nécessaire d'étudier une grande cohorte de patients en fonction de leur statut mutationnel IDH1/2 et de comparer les effets avec celui des inhibiteurs spécifiques d'IDH1 et IDH2 mutés (Agiros®), qui ont un effet antitumoral drastique et induisent la différenciation des cellules de LAM. L'inhibition de la glutaminolyse pourrait être couplée à ses inhibiteurs et peut-être renforcer leurs effets.

Il serait également très intéressant d'étudier les effets de l'inhibition du métabolisme de la glutamine sur les modifications épigénétiques. Une seule étude a rapporté des modifications épigénétiques conduisant à l'apoptose lors de l'utilisation du composé 968 dans un modèle de cancer du sein (Simpson et al., 2012). L' α KG est un cofacteur des enzymes à activité déméthylase comme TET2 ou les JmJc-domain histone déméthylases : sa modulation en aval de la glutaminolyse pourrait participer aux mécanismes anti-leucémiques. Dans cette optique, nous allons étudier la méthylation globale des lignées en présence de nos différents outils, et tester également leurs effets en association avec des agents déméthylants comme la 5-azacytidine.

L'étude in vivo du ciblage de la glutaminolyse n'a pas été encore très approfondie dans mon travail de thèse. En effet, bien que le modèle de xénotransplantation de la lignée MOLM-14 infectée par le shARN GLS1 montre un effet majeur sur la pousse tumorale, il s'agit d'un modèle peu applicable à la clinique. Cependant, l'utilisation du CB-839 dans un protocole de phase I-II dans les LAM est en cours, et ces résultats permettront de connaître les effets in vivo de la meilleure façon. Nous allons cependant poursuivre l'étude in vivo et ex vivo de la glutaminolyse dans différents modèles de LAM. Nous allons étudier les effets du CB-839 sur la leucémogénèse dans des souris infectées par les oncogènes MLL-AF9 et FLT3-ITD/NMP1 mutés, et également dans le modèle de LAM de patients injectées à des souris NSG. Nous envisageons par ailleurs d'utiliser des cellules de moelle de souris hétérozygotes et/ou homozygotes pour la GAC. Nous collaborons pour cela avec le Dr Justine Masson, qui a généré ces souris à la Pitié Salpêtrière. Il a récemment été montré que la glycolyse avait un rôle majeur dans la transformation en LAM, puisque les KO de PKM2 et de LDHA diminuent l'initiation et la maintenance des leucémies induites par les oncogènes MLL-AF9 ou BCR-ABL (Wang et al., 2014c). Nous allons donc étudier le rôle de la glutaminolyse par une approche similaire. De façon globale, ce travail souligne l'importance du ciblage du métabolisme de la glutamine à différents niveaux dans les approches thérapeutiques nouvelles des LAM.

BIBLIOGRAPHIE

- Abou-Khalil, W.H., Yunis, A.A., and Abou-Khalil, S. (1983). Prominent glutamine oxidation activity in mitochondria of hematopoietic tumors. *Cancer Res.* *43*, 1990–1993.
- Agostini, M., Almeida, L.Y., Bastos, D.C., Ortega, R.M., Moreira, F.S., Seguin, F., Zecchin, K.G., Raposo, H.F., Oliveira, H.C.F., Amoêdo, N.D., et al. (2014). The fatty acid synthase inhibitor orlistat reduces the growth and metastasis of orthotopic tongue oral squamous cell carcinomas. *Mol. Cancer Ther.* *13*, 585–595.
- Aledo, J.C., Gómez-Fabre, P.M., Olalla, L., and Márquez, J. (2000). Identification of two human glutaminase loci and tissue-specific expression of the two related genes. *Mamm. Genome Off. J. Int. Mamm. Genome Soc.* *11*, 1107–1110.
- Amelio, I., Cutruzzolá, F., Antonov, A., Agostini, M., and Melino, G. (2014). Serine and glycine metabolism in cancer. *Trends Biochem. Sci.* *39*, 191–198.
- Anastasiou, D., Yu, Y., Israelsen, W.J., Jiang, J.-K., Boxer, M.B., Hong, B.S., Tempel, W., Dimov, S., Shen, M., Jha, A., et al. (2012). Pyruvate kinase M2 activators promote tetramer formation and suppress tumorigenesis. *Nat. Chem. Biol.* *8*, 839–847.
- Andratsch, M., Feifel, E., Taylor, L., O’Hayre, M., Schramek, H., Curthoys, N.P., and Gstraunthaler, G. (2007). TGF-beta signaling and its effect on glutaminase expression in LLC-PK1-FBPase+ cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* *293*, F846–F853.
- Appel, I.M., den Boer, M.L., Meijerink, J.P.P., Veerman, A.J.P., Reniers, N.C.M., and Pieters, R. (2006). Up-regulation of asparagine synthetase expression is not linked to the clinical response L-asparaginase in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* *107*, 4244–4249.
- Avissar, N.E., Sax, H.C., and Toia, L. (2008). In human enterocytes, GLN transport and ASCT2 surface expression induced by short-term EGF are MAPK, PI3K, and Rho-dependent. *Dig. Dis. Sci.* *53*, 2113–2125.
- Bardella, C., Pollard, P.J., and Tomlinson, I. (2011). SDH mutations in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* *1807*, 1432–1443.
- Bauer, D.E., Hatzivassiliou, G., Zhao, F., Andreadis, C., and Thompson, C.B. (2005). ATP citrate lyase is an important component of cell growth and transformation. *Oncogene* *24*, 6314–6322.
- Bensaad, K., Tsuruta, A., Selak, M.A., Vidal, M.N.C., Nakano, K., Bartrons, R., Gottlieb, E., and Vousden, K.H. (2006). TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* *126*, 107–120.
- Blommaart, E.F.C., Luiken, J.J.F.P., Blommaart, P.J.E., Woerkom, G.M. van, and Meijer, A.J. (1995). Phosphorylation of Ribosomal Protein S6 Is Inhibitory for Autophagy in Isolated Rat Hepatocytes. *J. Biol. Chem.* *270*, 2320–2326.
- Boidot, R., Végran, F., Meulle, A., Le Breton, A., Dessy, C., Sonveaux, P., Lizard-Nacol, S., and Feron, O. (2012). Regulation of monocarboxylate transporter MCT1 expression by p53 mediates inward and outward lactate fluxes in tumors. *Cancer Res.* *72*, 939–948.

- Bonfils, G., Jaquenoud, M., Bontron, S., Ostrowicz, C., Ungermann, C., and De Virgilio, C. (2012). Leucyl-tRNA synthetase controls TORC1 via the EGO complex. *Mol. Cell* 46, 105–110.
- 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.
- Bonnet, S., Archer, S.L., Allalunis-Turner, J., Haromy, A., Beaulieu, C., Thompson, R., Lee, C.T., Lopaschuk, G.D., Puttagunta, L., Bonnet, S., et al. (2007). A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell* 11, 37–51.
- Broome, J.D. (1963). Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. I. Properties of the L-asparaginase of guinea pig serum in relation to those of the antilymphoma substance. *J. Exp. Med.* 118, 99–120.
- Bungard, C.I., and McGivan, J.D. (2005). Identification of the promoter elements involved in the stimulation of ASCT2 expression by glutamine availability in HepG2 cells and the probable involvement of FXR/RXR dimers. *Arch. Biochem. Biophys.* 443, 53–59.
- Burnett, A., Wetzler, M., and Löwenberg, B. (2011). Therapeutic advances in acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 29, 487–494.
- Busque, L., Patel, J.P., Figueroa, M.E., Vasanthakumar, A., Provost, S., Hamilou, Z., Mollica, L., Li, J., Viale, A., Heguy, A., et al. (2012). Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. *Nat. Genet.* 44, 1179–1181.
- Cairns, R.A., Harris, I.S., and Mak, T.W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer* 11, 85–95.
- Cairns, R.A., Iqbal, J., Lemonnier, F., Kucuk, C., de Leval, L., Jais, J.-P., Parrens, M., Martin, A., Xerri, L., Brousset, P., et al. (2012). IDH2 mutations are frequent in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood* 119, 1901–1903.
- Cancer Genome Atlas Research Network (2013). Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 368, 2059–2074.
- Capizzi, R.L., and White, C. (1988). The pharmacologic basis for the efficacy of high-dose Ara-C and sequential asparaginase in adult acute myelogenous leukemia. *Yale J. Biol. Med.* 61, 11–22.
- Capizzi, R.L., Davis, R., Powell, B., Cuttner, J., Ellison, R.R., Cooper, M.R., Dillman, R., Major, W.B., Dupre, E., and McIntyre, O.R. (1988). Synergy between high-dose cytarabine and asparaginase in the treatment of adults with refractory and relapsed acute myelogenous leukemia--a Cancer and Leukemia Group B Study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 6, 499–508.
- Cardaci, S., Rizza, S., Filomeni, G., Bernardini, R., Bertocchi, F., Mattei, M., Paci, M., Rotilio, G., and Ciriolo, M.R. (2012). Glutamine deprivation enhances antitumor activity of 3-bromopyruvate through the stabilization of monocarboxylate transporter-1. *Cancer Res.* 72, 4526–4536.
- Cardona, C., Sánchez-Mejías, E., Dávila, J.C., Martín-Rufián, M., Campos-Sandoval, J.A., Vitorica, J., Alonso, F.J., Matés, J.M., Segura, J.A., Norenberg, M.D., et al. (2014). Expression of Gls and Gls2 glutaminase isoforms in astrocytes. *Glia*.
- Cassago, A., Ferreira, A.P.S., Ferreira, I.M., Fornezari, C., Gomes, E.R.M., Greene, K.S., Pereira, H.M., Garratt, R.C., Dias, S.M.G., and Ambrosio, A.L.B. (2012). Mitochondrial localization and

structure-based phosphate activation mechanism of Glutaminase C with implications for cancer metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 1092–1097.

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.

Challen, G.A., Sun, D., Jeong, M., Luo, M., Jelinek, J., Berg, J.S., Bock, C., Vasanthakumar, A., Gu, H., Xi, Y., et al. (2012). Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. *Nat. Genet.* *44*, 23–31.

Chan, D.A., Sutphin, P.D., Nguyen, P., Turcotte, S., Lai, E.W., Banh, A., Reynolds, G.E., Chi, J.-T., Wu, J., Solow-Cordero, D.E., et al. (2011). Targeting GLUT1 and the Warburg effect in renal cell carcinoma by chemical synthetic lethality. *Sci. Transl. Med.* *3*, 94ra70.

Chan, W.K., Lorenzi, P.L., Anishkin, A., Purwaha, P., Rogers, D.M., Sukharev, S., Rempe, S.B., and Weinstein, J.N. (2014). The glutaminase activity of L-asparaginase is not required for anticancer activity against ASNS-negative cells. *Blood*.

Chapuis, N., Tamburini, J., Green, A.S., Vignon, C., Bardet, V., Neyret, A., Pannetier, M., Willems, L., Park, S., Maccone, A., et al. (2010). Dual inhibition of PI3K and mTORC1/2 signaling by NVP-BEZ235 as a new therapeutic strategy for acute myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *16*, 5424–5435.

Chaturvedi, A., Araujo Cruz, M.M., Jyotsana, N., Sharma, A., Yun, H., Görlich, K., Wichmann, M., Schwarzer, A., Preller, M., Thol, F., et al. (2013). Mutant IDH1 promotes leukemogenesis in vivo and can be specifically targeted in human AML. *Blood* *122*, 2877–2887.

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.

Cheng, T., Sudderth, J., Yang, C., Mullen, A.R., Jin, E.S., Matés, J.M., and DeBerardinis, R.J. (2011). Pyruvate carboxylase is required for glutamine-independent growth of tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 8674–8679.

Cheung, A.M.S., Wan, T.S.K., Leung, J.C.K., Chan, L.Y.Y., Huang, H., Kwong, Y.L., Liang, R., and Leung, A.Y.H. (2007). Aldehyde dehydrogenase activity in leukemic blasts defines a subgroup of acute myeloid leukemia with adverse prognosis and superior NOD/SCID engrafting potential. *Leukemia* *21*, 1423–1430.

Choi, C., Ganji, S.K., DeBerardinis, R.J., Hatanpaa, K.J., Rakheja, D., Kovacs, Z., Yang, X.-L., Mashimo, T., Raisanen, J.M., Marin-Valencia, I., et al. (2012). 2-hydroxyglutarate detection by magnetic resonance spectroscopy in IDH-mutated patients with gliomas. *Nat. Med.* *18*, 624–629.

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.

Christensen, H.N., Handlogten, M.E., Lam, I., Tager, H.S., and Zand, R. (1969). A bicyclic amino acid to improve discriminations among transport systems. *J. Biol. Chem.* *244*, 1510–1520.

Christofk, H.R., Vander Heiden, M.G., Wu, N., Asara, J.M., and Cantley, L.C. (2008). Pyruvate kinase M2 is a phosphotyrosine-binding protein. *Nature* *452*, 181–186.

- Chu, S.H., Heiser, D., Li, L., Kaplan, I., Collector, M., Huso, D., Sharkis, S.J., Civin, C., and Small, D. (2012). FLT3-ITD knockin impairs hematopoietic stem cell quiescence/homeostasis, leading to myeloproliferative neoplasm. *Cell Stem Cell* *11*, 346–358.
- Clancy, K.P., Berger, R., Cox, M., Bleskan, J., Walton, K.A., Hart, I., and Patterson, D. (1996). Localization of the L-glutamine synthetase gene to chromosome 1q23. *Genomics* *38*, 418–420.
- Clarkson, B., Krakoff, I., Burchenal, J., Karnofsky, D., Golbey, R., Dowling, M., Oettgen, H., and Lipton, A. (1970). Clinical results of treatment with *E. coli* L-asparaginase in adults with leukemia, lymphoma, and solid tumors. *Cancer* *25*, 279–305.
- Clem, B.F., and Chesney, J. (2012). Molecular pathways: regulation of metabolism by RB. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *18*, 6096–6100.
- Clem, B.F., O’Neal, J., Tapolsky, G., Clem, A.L., Imbert-Fernandez, Y., Kerr, D.A., Klarer, A.C., Redman, R., Miller, D.M., Trent, J.O., et al. (2013). Targeting 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) as a therapeutic strategy against cancer. *Mol. Cancer Ther.* *12*, 1461–1470.
- Clendening, J.W., Pandyra, A., Boutros, P.C., El Ghamrasni, S., Khosravi, F., Trentin, G.A., Martirosyan, A., Hakem, A., Hakem, R., Jurisica, I., et al. (2010). Dysregulation of the mevalonate pathway promotes transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 15051–15056.
- Cocco, P., Todde, P., Fornera, S., Manca, M.B., Manca, P., and Sias, A.R. (1998). Mortality in a cohort of men expressing the glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Blood* *91*, 706–709.
- Colombo, S.L., Palacios-Callender, M., Frakich, N., De Leon, J., Schmitt, C.A., Boorn, L., Davis, N., and Moncada, S. (2010). Anaphase-promoting complex/cyclosome-Cdh1 coordinates glycolysis and glutaminolysis with transition to S phase in human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 18868–18873.
- Colombo, S.L., Palacios-Callender, M., Frakich, N., Carcamo, S., Kovacs, I., Tudzarova, S., and Moncada, S. (2011). Molecular basis for the differential use of glucose and glutamine in cell proliferation as revealed by synchronized HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 21069–21074.
- Corces-Zimmerman, M.R., and Majeti, R. (2014). Pre-leukemic evolution of hematopoietic stem cells: the importance of early mutations in leukemogenesis. *Leukemia*.
- Corces-Zimmerman, M.R., Hong, W.-J., Weissman, I.L., Medeiros, B.C., and Majeti, R. (2014). Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 2548–2553.
- Cosentino, C., Grieco, D., and Costanzo, V. (2011). ATM activates the pentose phosphate pathway promoting anti-oxidant defence and DNA repair. *EMBO J.* *30*, 546–555.
- Costello, R.T., Mallet, F., Gaugler, B., Sainty, D., Arnoulet, C., Gastaut, J.A., and Olive, D. (2000). Human acute myeloid leukemia CD34+/CD38- progenitor cells have decreased sensitivity to chemotherapy and Fas-induced apoptosis, reduced immunogenicity, and impaired dendritic cell transformation capacities. *Cancer Res.* *60*, 4403–4411.
- Csibi, A., Fendt, S.-M., Li, C., Poulgiannis, G., Choo, A.Y., Chapski, D.J., Jeong, S.M., Dempsey, J.M., Parkhitko, A., Morrison, T., et al. (2013). The mTORC1 pathway stimulates glutamine metabolism and cell proliferation by repressing SIRT4. *Cell* *153*, 840–854.

- Csibi, A., Lee, G., Yoon, S.-O., Tong, H., Ilter, D., Elia, I., Fendt, S.-M., Roberts, T.M., and Blenis, J. (2014). The mTORC1/S6K1 Pathway Regulates Glutamine Metabolism through the eIF4B-Dependent Control of c-Myc Translation. *Curr. Biol. CB* 24, 2274–2280.
- Curi, R., Newsholme, P., and Newsholme, E.A. (1988). Metabolism of pyruvate by isolated rat mesenteric lymphocytes, lymphocyte mitochondria and isolated mouse macrophages. *Biochem. J.* 250, 383–388.
- Curthoys, N.P., and Watford, M. (1995). Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 15, 133–159.
- Dang, L., White, D.W., Gross, S., Bennett, B.D., Bittinger, M.A., Driggers, E.M., Fantin, V.R., Jang, H.G., Jin, S., Keenan, M.C., et al. (2009). Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 462, 739–744.
- David, C.J., Chen, M., Assanah, M., Canoll, P., and Manley, J.L. (2010). HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. *Nature* 463, 364–368.
- Davis, M.I., Gross, S., Shen, M., Straley, K.S., Pragani, R., Lea, W.A., Popovici-Muller, J., DeLaBarre, B., Artin, E., Thorne, N., et al. (2014). Biochemical, Cellular, and Biophysical Characterization of a Potent Inhibitor of Mutant Isocitrate Dehydrogenase IDH1. *J. Biol. Chem.* 289, 13717–13725.
- Daye, D., and Wellen, K.E. (2012). Metabolic reprogramming in cancer: unraveling the role of glutamine in tumorigenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 23, 362–369.
- DeBerardinis, R.J., Mancuso, A., Daikhin, E., Nissim, I., Yudkoff, M., Wehrli, S., and Thompson, C.B. (2007). Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 19345–19350.
- DeBerardinis, R.J., Lum, J.J., Hatzivassiliou, G., and Thompson, C.B. (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.* 7, 11–20.
- DeLaBarre, B., Gross, S., Fang, C., Gao, Y., Jha, A., Jiang, F., Song J, J., Wei, W., and Hurov, J.B. (2011). Full-length human glutaminase in complex with an allosteric inhibitor. *Biochemistry (Mosc.)* 50, 10764–10770.
- 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.
- Distasio, J.A., Salazar, A.M., Nadji, M., and Durden, D.L. (1982). Glutaminase-free asparaginase from vibrio succinogenes: an antilymphoma enzyme lacking hepatotoxicity. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 30, 343–347.
- Döhner, H., Estey, E.H., Amadori, S., Appelbaum, F.R., Büchner, T., Burnett, A.K., Dombret, H., Fenau, P., Grimwade, D., Larson, R.A., et al. (2010a). 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., Estey, E.H., Amadori, S., Appelbaum, F.R., Büchner, T., Burnett, A.K., Dombret, H., Fenau, P., Grimwade, D., Larson, R.A., et al. (2010b). 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.

- Dübbers, A., Würthwein, G., Müller, H.J., Schulze-Westhoff, P., Winkelhorst, M., Kurzknabe, E., Lanvers, C., Pieters, R., Kaspers, G.J., Creutzig, U., et al. (2000). Asparagine synthetase activity in paediatric acute leukaemias: AML-M5 subtype shows lowest activity. *Br. J. Haematol.* *109*, 427–429.
- Durán, R.V., Oppliger, W., Robitaille, A.M., Heiserich, L., Skendaj, R., Gottlieb, E., and Hall, M.N. (2012). Glutaminolysis activates Rag-mTORC1 signaling. *Mol. Cell* *47*, 349–358.
- 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.
- Ehsanipour, E.A., Sheng, X., Behan, J.W., Wang, X., Butturini, A., Avramis, V.I., and Mittelman, S.D. (2013). Adipocytes cause leukemia cell resistance to L-asparaginase via release of glutamine. *Cancer Res.* *73*, 2998–3006.
- Elgadi, K.M., Meguid, R.A., Qian, M., Souba, W.W., and Abcouwer, S.F. (1999). Cloning and analysis of unique human glutaminase isoforms generated by tissue-specific alternative splicing. *Physiol. Genomics* *1*, 51–62.
- Elhammali, A., Ippolito, J.E., Collins, L., Crowley, J., Marasa, J., and Piwnicka-Worms, D. (2014). A high-throughput fluorimetric assay for 2-hydroxyglutarate identifies Zaprinast as a glutaminase inhibitor. *Cancer Discov.* *4*, 828–839.
- Elstrom, R.L., Bauer, D.E., Buzzai, M., Karnauskas, R., Harris, M.H., Plas, D.R., Zhuang, H., Cinalli, R.M., Alavi, A., Rudin, C.M., et al. (2004). Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res.* *64*, 3892–3899.
- Emadi, A., Jun, S.A., Tsukamoto, T., Fathi, A.T., Minden, M.D., and Dang, C.V. (2013). Inhibition of Glutaminase Selectively Suppresses the Growth of Primary AML Cells with IDH Mutations. *Exp. Hematol.*
- Eppert, K., Takenaka, K., Lechman, E.R., Waldron, L., Nilsson, B., van Galen, P., Metzeler, K.H., Poepl, A., Ling, V., Beyene, J., et al. (2011). Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. *Nat. Med.* *17*, 1086–1093.
- Esslinger, C.S., Cybulski, K.A., and Rhoderick, J.F. (2005). Ngamma-aryl glutamine analogues as probes of the ASCT2 neutral amino acid transporter binding site. *Bioorg. Med. Chem.* *13*, 1111–1118.
- Estey, E.H. (2013). Acute myeloid leukemia: 2013 update on risk-stratification and management. *Am. J. Hematol.* *88*, 318–327.
- Fan, X., Ross, D.D., Arakawa, H., Ganapathy, V., Tamai, I., and Nakanishi, T. (2010). Impact of system L amino acid transporter 1 (LAT1) on proliferation of human ovarian cancer cells: a possible target for combination therapy with anti-proliferative aminopeptidase inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* *80*, 811–818.
- Felipe Rico, J., Hassane, D.C., and Guzman, M.L. (2013). Acute myelogenous leukemia stem cells: from Bench to Bedside. *Cancer Lett.* *338*, 4–9.
- Fendt, S.-M., Bell, E.L., Keibler, M.A., Davidson, S.M., Wirth, G.J., Fiske, B., Mayers, J.R., Schwab, M., Bellinger, G., Csibi, A., et al. (2013). Metformin decreases glucose oxidation and increases the dependency of prostate cancer cells on reductive glutamine metabolism. *Cancer Res.* *73*, 4429–4438.

- Ferraris, A.M., Broccia, G., Meloni, T., Forteleoni, G., and Gaetani, G.F. (1988). Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency and incidence of hematologic malignancy. *Am. J. Hum. Genet.* *42*, 516–520.
- Ferreira, A.P.S., Cassago, A., Gonçalves, K. de A., Dias, M.M., Adamoski, D., Ascensão, C.F.R., Honorato, R.V., de Oliveira, J.F., Ferreira, I.M., Fornezari, C., et al. (2013). Active glutaminase C self-assembles into a supratetrameric oligomer that can be disrupted by an allosteric inhibitor. *J. Biol. Chem.* *288*, 28009–28020.
- Figueroa, M.E., Abdel-Wahab, O., Lu, C., Ward, P.S., Patel, J., Shih, A., Li, Y., Bhagwat, N., Vasanthakumar, A., Fernandez, H.F., et al. (2010). Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell* *18*, 553–567.
- Firth, J.D., Ebert, B.L., and Ratcliffe, P.J. (1995). Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements. *J. Biol. Chem.* *270*, 21021–21027.
- Freed-Pastor, W.A., Mizuno, H., Zhao, X., Langerød, A., Moon, S.-H., Rodriguez-Barrueco, R., Barsotti, A., Chicas, A., Li, W., Polotskaia, A., et al. (2012). Mutant p53 disrupts mammary tissue architecture via the mevalonate pathway. *Cell* *148*, 244–258.
- Fuchs, B.C., and Bode, B.P. (2005). Amino acid transporters ASCT2 and LAT1 in cancer: partners in crime? *Semin. Cancer Biol.* *15*, 254–266.
- Fuchs, B.C., Finger, R.E., Onan, M.C., and Bode, B.P. (2007). ASCT2 silencing regulates mammalian target-of-rapamycin growth and survival signaling in human hepatoma cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *293*, C55–C63.
- Furuya, M., Horiguchi, J., Nakajima, H., Kanai, Y., and Oyama, T. (2012). Correlation of L-type amino acid transporter 1 and CD98 expression with triple negative breast cancer prognosis. *Cancer Sci.* *103*, 382–389.
- Gaglio, D., Soldati, C., Vanoni, M., Alberghina, L., and Chiaradonna, F. (2009). Glutamine deprivation induces abortive s-phase rescued by deoxyribonucleotides in k-ras transformed fibroblasts. *PLoS One* *4*, e4715.
- Gaglio, D., Metallo, C.M., Gameiro, P.A., Hiller, K., Danna, L.S., Balestrieri, C., Alberghina, L., Stephanopoulos, G., and Chiaradonna, F. (2011). Oncogenic K-Ras decouples glucose and glutamine metabolism to support cancer cell growth. *Mol. Syst. Biol.* *7*, 523.
- Gaisler-Salomon, I., Miller, G.M., Chuhma, N., Lee, S., Zhang, H., Ghoddoussi, F., Lewandowski, N., Fairhurst, S., Wang, Y., Conjard-Duplany, A., et al. (2009). Glutaminase-deficient mice display hippocampal hypoactivity, insensitivity to pro-psychotic drugs and potentiated latent inhibition: relevance to schizophrenia. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *34*, 2305–2322.
- Galluzzi, L., Kepp, O., Vander Heiden, M.G., and Kroemer, G. (2013). Metabolic targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* *12*, 829–846.
- 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.

- Gao, P., Tchernyshyov, I., Chang, T.-C., Lee, Y.-S., Kita, K., Ochi, T., Zeller, K.I., De Marzo, A.M., Van Eyk, J.E., Mendell, J.T., et al. (2009). c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature* 458, 762–765.
- Gao, X., Zhang, Y., Arrazola, P., Hino, O., Kobayashi, T., Yeung, R.S., Ru, B., and Pan, D. (2002). Tsc tumour suppressor proteins antagonize amino-acid-TOR signalling. *Nat. Cell Biol.* 4, 699–704.
- Garon, E.B., Christofk, H.R., Hosmer, W., Britten, C.D., Bahng, A., Crabtree, M.J., Hong, C.S., Kamranpour, N., Pitts, S., Kabbinar, F., et al. (2014). Dichloroacetate should be considered with platinum-based chemotherapy in hypoxic tumors rather than as a single agent in advanced non-small cell lung cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 140, 443–452.
- Gentles, A.J., Plevritis, S.K., Majeti, R., and Alizadeh, A.A. (2010). Association of a leukemic stem cell gene expression signature with clinical outcomes in acute myeloid leukemia. *JAMA* 304, 2706–2715.
- Giacobbe, A., Bongiorno-Borbone, L., Bernassola, F., Terrinoni, A., Markert, E.K., Levine, A.J., Feng, Z., Agostini, M., Zolla, L., Agrò, A.F., et al. (2013). p63 regulates glutaminase 2 expression. *Cell Cycle Georget. Tex* 12, 1395–1405.
- Gill, S., Tasian, S.K., Ruella, M., Shestova, O., Li, Y., Porter, D.L., Carroll, M., Danet-Desnoyers, G., Scholler, J., Grupp, S.A., et al. (2014). Preclinical targeting of human acute myeloid leukemia and myeloablation using chimeric antigen receptor-modified T cells. *Blood* 123, 2343–2354.
- Gilliland, D.G., and Tallman, M.S. (2002). Focus on acute leukemias. *Cancer Cell* 1, 417–420.
- Gingras, A.C., Raught, B., Gygi, S.P., Niedzwiecka, A., Miron, M., Burley, S.K., Polakiewicz, R.D., Wyslouch-Cieszynska, A., Aebersold, R., and Sonenberg, N. (2001). Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes Dev.* 15, 2852–2864.
- Godfrey, S., Kuhlenschmidt, T., and Curthoys, P. (1977). Correlation between activation and dimer formation of rat renal phosphate-dependent glutaminase. *J. Biol. Chem.* 252, 1927–1931.
- Gómez-Fabre, P.M., Aledo, J.C., Del Castillo-Olivares, A., Alonso, F.J., Núñez De Castro, I., Campos, J.A., and Márquez, J. (2000). Molecular cloning, sequencing and expression studies of the human breast cancer cell glutaminase. *Biochem. J.* 345 Pt 2, 365–375.
- Gordan, J.D., Thompson, C.B., and Simon, M.C. (2007). HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. *Cancer Cell* 12, 108–113.
- Goto, M., Miwa, H., Shikami, M., Tsunekawa-Imai, N., Suganuma, K., Mizuno, S., Takahashi, M., Mizutani, M., Hanamura, I., and Nitta, M. (2014). Importance of glutamine metabolism in leukemia cells by energy production through TCA cycle and by redox homeostasis. *Cancer Invest.* 32, 241–247.
- Gross, M.I., Demo, S.D., Dennison, J.B., Chen, L., Chernov-Rogan, T., Goyal, B., Janes, J.R., Laidig, G.J., Lewis, E.R., Li, J., et al. (2014). Antitumor activity of the glutaminase inhibitor CB-839 in triple-negative breast cancer. *Mol. Cancer Ther.* 13, 890–901.
- Gross, S., Cairns, R.A., Minden, M.D., Driggers, E.M., Bittinger, M.A., Jang, H.G., Sasaki, M., Jin, S., Schenkein, D.P., Su, S.M., et al. (2010). Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations. *J. Exp. Med.* 207, 339–344.

- Guan, Y., Gerhard, B., and Hogge, D.E. (2003). Detection, isolation, and stimulation of quiescent primitive leukemic progenitor cells from patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* *101*, 3142–3149.
- Guzman, M.L., Rossi, R.M., Karnischky, L., Li, X., Peterson, D.R., Howard, D.S., and Jordan, C.T. (2005). The sesquiterpene lactone parthenolide induces apoptosis of human acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells. *Blood* *105*, 4163–4169.
- 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.
- Häberle, J., Görg, B., Rutsch, F., Schmidt, E., Toutain, A., Benoist, J.-F., Gelot, A., Suc, A.-L., Höhne, W., Schliess, F., et al. (2005). Congenital glutamine deficiency with glutamine synthetase mutations. *N. Engl. J. Med.* *353*, 1926–1933.
- Han, J.M., Jeong, S.J., Park, M.C., Kim, G., Kwon, N.H., Kim, H.K., Ha, S.H., Ryu, S.H., and Kim, S. (2012). Leucyl-tRNA synthetase is an intracellular leucine sensor for the mTORC1-signaling pathway. *Cell* *149*, 410–424.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Hanover, J.A., Krause, M.W., and Love, D.C. (2012). Bittersweet memories: linking metabolism to epigenetics through O-GlcNAcylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 312–321.
- Hara, K., Yonezawa, K., Weng, Q.P., Kozlowski, M.T., Belham, C., and Avruch, J. (1998). Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *J. Biol. Chem.* *273*, 14484–14494.
- Hara, K., Maruki, Y., Long, X., Yoshino, K., Oshiro, N., Hidayat, S., Tokunaga, C., Avruch, J., and Yonezawa, K. (2002). Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* *110*, 177–189.
- Hassane, D.C., Sen, S., Minhajuddin, M., Rossi, R.M., Corbett, C.A., Balys, M., Wei, L., Crooks, P.A., Guzman, M.L., and Jordan, C.T. (2010). Chemical genomic screening reveals synergism between parthenolide and inhibitors of the PI-3 kinase and mTOR pathways. *Blood* *116*, 5983–5990.
- Hassanein, M., Hoeksema, M.D., Shiota, M., Qian, J., Harris, B.K., Chen, H., Clark, J.E., Alborn, W.E., Eisenberg, R., and Massion, P.P. (2013). SLC1A5 mediates glutamine transport required for lung cancer cell growth and survival. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *19*, 560–570.
- Hatzivassiliou, G., Zhao, F., Bauer, D.E., Andreadis, C., Shaw, A.N., Dhanak, D., Hingorani, S.R., Tuveson, D.A., and Thompson, C.B. (2005). ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell* *8*, 311–321.
- Heublein, S., Kazi, S., Ogmundsdóttir, M.H., Attwood, E.V., Kala, S., Boyd, C. a. R., Wilson, C., and Goberdhan, D.C.I. (2010). Proton-assisted amino-acid transporters are conserved regulators of proliferation and amino-acid-dependent mTORC1 activation. *Oncogene* *29*, 4068–4079.
- Van den Heuvel, A.P.J., Jing, J., Wooster, R.F., and Bachman, K.E. (2012). Analysis of glutamine dependency in non-small cell lung cancer: GLS1 splice variant GAC is essential for cancer cell growth. *Cancer Biol. Ther.* *13*, 1185–1194.

- Hope, K.J., Jin, L., and Dick, J.E. (2004). Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nat. Immunol.* *5*, 738–743.
- Hoshii, T., Tadokoro, Y., Naka, K., Ooshio, T., Muraguchi, T., Sugiyama, N., Soga, T., Araki, K., Yamamura, K.-I., and Hirao, A. (2012). mTORC1 is essential for leukemia propagation but not stem cell self-renewal. *J. Clin. Invest.* *122*, 2114–2129.
- Howlader (2013). Cancer Statistics Review, 1975-2011 - SEER Statistics.
- Hu, W., Zhang, C., Wu, R., Sun, Y., Levine, A., and Feng, Z. (2010). Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 7455–7460.
- Icard, P., Poulain, L., and Lincet, H. (2012). Understanding the central role of citrate in the metabolism of cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* *1825*, 111–116.
- Icard, P., Kafara, P., Steyaert, J.-M., Schwartz, L., and Lincet, H. (2014). The metabolic cooperation between cells in solid cancer tumors. *Biochim. Biophys. Acta* *1846*, 216–225.
- Im, A.P., Sehgal, A.R., Carroll, M.P., Smith, B.D., Tefferi, A., Johnson, D.E., and Boyiadzis, M. (2014). DNMT3A and IDH mutations in acute myeloid leukemia and other myeloid malignancies: associations with prognosis and potential treatment strategies. *Leukemia* *28*, 1774–1783.
- Inoki, K., Zhu, T., and Guan, K.-L. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* *115*, 577–590.
- Isoda, A., Kaira, K., Iwashina, M., Oriuchi, N., Tominaga, H., Nagamori, S., Kanai, Y., Oyama, T., Asao, T., Matsumoto, M., et al. (2014). Expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) as a prognostic and therapeutic indicator in multiple myeloma. *Cancer Sci.*
- Israelsen, W.J., Dayton, T.L., Davidson, S.M., Fiske, B.P., Hosios, A.M., Bellinger, G., Li, J., Yu, Y., Sasaki, M., Horner, J.W., et al. (2013). PKM2 isoform-specific deletion reveals a differential requirement for pyruvate kinase in tumor cells. *Cell* *155*, 397–409.
- Itkonen, H.M., Minner, S., Guldvik, I.J., Sandmann, M.J., Tsourlakis, M.C., Berge, V., Svindland, A., Schlomm, T., and Mills, I.G. (2013). O-GlcNAc transferase integrates metabolic pathways to regulate the stability of c-MYC in human prostate cancer cells. *Cancer Res.* *73*, 5277–5287.
- Ito, K., Carracedo, A., Weiss, D., Arai, F., Ala, U., Avigan, D.E., Schafer, Z.T., Evans, R.M., Suda, T., Lee, C.-H., et al. (2012). A PML–PPAR- δ pathway for fatty acid oxidation regulates hematopoietic stem cell maintenance. *Nat. Med.* *18*, 1350–1358.
- Jan, M., Snyder, T.M., Corces-Zimmerman, M.R., Vyas, P., Weissman, I.L., Quake, S.R., and Majeti, R. (2012). Clonal evolution of preleukemic hematopoietic stem cells precedes human acute myeloid leukemia. *Sci. Transl. Med.* *4*, 149ra118.
- Jiang, P., Du, W., Wang, X., Mancuso, A., Gao, X., Wu, M., and Yang, X. (2011). p53 regulates biosynthesis through direct inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Nat. Cell Biol.* *13*, 310–316.
- Jordan, C.T., Upchurch, D., Szilvassy, S.J., Guzman, M.L., Howard, D.S., Pettigrew, A.L., Meyerrose, T., Rossi, R., Grimes, B., Rizzieri, D.A., et al. (2000). The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia* *14*, 1777–1784.

- Juliusson, G., Lazarevic, V., Hörstedt, A.-S., Hagberg, O., Höglund, M., and Swedish Acute Leukemia Registry Group (2012). Acute myeloid leukemia in the real world: why population-based registries are needed. *Blood* *119*, 3890–3899.
- Kaira, K., Oriuchi, N., Takahashi, T., Nakagawa, K., Ohde, Y., Okumura, T., Murakami, H., Shukuya, T., Kenmotsu, H., Naito, T., et al. (2011). L-type amino acid transporter 1 (LAT1) expression in malignant pleural mesothelioma. *Anticancer Res.* *31*, 4075–4082.
- Kaira, K., Sunose, Y., Arakawa, K., Ogawa, T., Sunaga, N., Shimizu, K., Tominaga, H., Oriuchi, N., Itoh, H., Nagamori, S., et al. (2012). Prognostic significance of L-type amino-acid transporter 1 expression in surgically resected pancreatic cancer. *Br. J. Cancer* *107*, 632–638.
- 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.
- Kant, S., Kumar, A., and Singh, S.M. (2014). Tumor growth retardation and chemosensitizing action of fatty acid synthase inhibitor orlistat on T cell lymphoma: implication of reconstituted tumor microenvironment and multidrug resistance phenotype. *Biochim. Biophys. Acta* *1840*, 294–302.
- Kato, Y., Ozawa, S., Miyamoto, C., Maehata, Y., Suzuki, A., Maeda, T., and Baba, Y. (2013). Acidic extracellular microenvironment and cancer. *Cancer Cell Int.* *13*, 89.
- Kats, L.M., Reschke, M., Tauli, R., Pozdnyakova, O., Burgess, K., Bhargava, P., Straley, K., Karnik, R., Meissner, A., Small, D., et al. (2014). Proto-oncogenic role of mutant IDH2 in leukemia initiation and maintenance. *Cell Stem Cell* *14*, 329–341.
- Katt, W.P., and Cerione, R.A. (2014). Glutaminase regulation in cancer cells: a druggable chain of events. *Drug Discov. Today* *19*, 450–457.
- Katt, W.P., Ramachandran, S., Erickson, J.W., and Cerione, R.A. (2012). Dibenzophenanthridines as inhibitors of glutaminase C and cancer cell proliferation. *Mol. Cancer Ther.* *11*, 1269–1278.
- Kawauchi, K., Araki, K., Tobiume, K., and Tanaka, N. (2008). p53 regulates glucose metabolism through an IKK-NF-kappaB pathway and inhibits cell transformation. *Nat. Cell Biol.* *10*, 611–618.
- Kekuda, R., Prasad, P.D., Fei, Y.J., Torres-Zamorano, V., Sinha, S., Yang-Feng, T.L., Leibach, F.H., and Ganapathy, V. (1996). Cloning of the sodium-dependent, broad-scope, neutral amino acid transporter Bo from a human placental choriocarcinoma cell line. *J. Biol. Chem.* *271*, 18657–18661.
- Kim, C.S., Cho, S.-H., Chun, H.S., Lee, S.-Y., Endou, H., Kanai, Y., and Kim, D.K. (2008a). BCH, an inhibitor of system L amino acid transporters, induces apoptosis in cancer cells. *Biol. Pharm. Bull.* *31*, 1096–1100.
- Kim, E., Goraksha-Hicks, P., Li, L., Neufeld, T.P., and Guan, K.-L. (2008b). Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat. Cell Biol.* *10*, 935–945.
- Kim, J., Tchernyshyov, I., Semenza, G.L., and Dang, C.V. (2006). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* *3*, 177–185.
- Kim, J., Gao, P., Liu, Y.-C., Semenza, G.L., and Dang, C.V. (2007). Hypoxia-inducible factor 1 and dysregulated c-Myc cooperatively induce vascular endothelial growth factor and metabolic switches hexokinase 2 and pyruvate dehydrogenase kinase 1. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 7381–7393.

- Kim, S.G., Buel, G.R., and Blenis, J. (2013a). Nutrient regulation of the mTOR complex 1 signaling pathway. *Mol. Cells* 35, 463–473.
- Kim, S.G., Hoffman, G.R., Poulogiannis, G., Buel, G.R., Jang, Y.J., Lee, K.W., Kim, B.-Y., Erikson, R.L., Cantley, L.C., Choo, A.Y., et al. (2013b). Metabolic stress controls mTORC1 lysosomal localization and dimerization by regulating the TTT-RUVBL1/2 complex. *Mol. Cell* 49, 172–185.
- Kita, K., Suzuki, T., and Ochi, T. (2012). Diphenylarsinic acid promotes degradation of glutaminase C by mitochondrial Lon protease. *J. Biol. Chem.* 287, 18163–18172.
- Koivunen, P., Lee, S., Duncan, C.G., Lopez, G., Lu, G., Ramkissoon, S., Losman, J.A., Joensuu, P., Bergmann, U., Gross, S., et al. (2012). Transformation by the (R)-enantiomer of 2-hydroxyglutarate linked to EGLN activation. *Nature* 483, 484–488.
- Kondoh, N., Imazeki, N., Arai, M., Hada, A., Hatsuse, K., Matsuo, H., Matsubara, O., Ohkura, S., and Yamamoto, M. (2007). Activation of a system A amino acid transporter, ATA1/SLC38A1, in human hepatocellular carcinoma and preneoplastic liver tissues. *Int. J. Oncol.* 31, 81–87.
- Konopleva, M., Watt, J., Contractor, R., Tsao, T., Harris, D., Estrov, Z., Bornmann, W., Kantarjian, H., Viallet, J., Samudio, I., et al. (2008). Mechanisms of antileukemic activity of the novel Bcl-2 homology domain-3 mimetic GX15-070 (obatoclax). *Cancer Res.* 68, 3413–3420.
- Krebs, H.A. (1935). Metabolism of amino-acids: The synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissues. *Biochem. J.* 29, 1951–1969.
- Krejci, O., Starkova, J., Otova, B., Madzo, J., Kalinova, M., Hrusak, O., and Trka, J. (2004). Upregulation of asparagine synthetase fails to avert cell cycle arrest induced by L-asparaginase in TEL/AML1-positive leukaemic cells. *Leukemia* 18, 434–441.
- Kung, H.-N., Marks, J.R., and Chi, J.-T. (2011). Glutamine synthetase is a genetic determinant of cell type-specific glutamine independence in breast epithelia. *PLoS Genet.* 7, e1002229.
- 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.
- 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.
- Laterza, O.F., and Curthoys, N.P. (2000). Effect of acidosis on the properties of the glutaminase mRNA pH-response element binding protein. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 11, 1583–1588.
- Le, A., Lane, A.N., Hamaker, M., Bose, S., Gouw, A., Barbi, J., Tsukamoto, T., Rojas, C.J., Slusher, B.S., Zhang, H., et al. (2012). Glucose-independent glutamine metabolism via TCA cycling for proliferation and survival in B cells. *Cell Metab.* 15, 110–121.
- Lee, B.H., Tothova, Z., Levine, R.L., Anderson, K., Buza-Vidas, N., Cullen, D.E., McDowell, E.P., Adelsperger, J., Fröhling, S., Huntly, B.J.P., et al. (2007). FLT3 mutations confer enhanced proliferation and survival properties to multipotent progenitors in a murine model of chronic myelomonocytic leukemia. *Cancer Cell* 12, 367–380.

- Lee, Y.-Z., Yang, C.-W., Chang, H.-Y., Hsu, H.-Y., Chen, I.-S., Chang, H.-S., Lee, C.-H., Lee, J., Kumar, C.R., Qiu, Y.-Q., et al. (2014). Discovery of selective inhibitors of Glutaminase-2, which inhibit mTORC1, activate autophagy and inhibit proliferation in cancer cells. *Oncotarget* 5, 6087–6101.
- Li, J., Qiang, J., Chen, S.-F., Wang, X., Fu, J., and Chen, Y. (2013a). The impact of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) in human hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 34, 2977–2981.
- Li, Z., Herold, T., He, C., Valk, P.J.M., Chen, P., Jurinovic, V., Mansmann, U., Radmacher, M.D., Maharry, K.S., Sun, M., et al. (2013b). Identification of a 24-gene prognostic signature that improves the European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: an international collaborative study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 31, 1172–1181.
- Lin, R., Tao, R., Gao, X., Li, T., Zhou, X., Guan, K.-L., Xiong, Y., and Lei, Q.-Y. (2013). Acetylation stabilizes ATP-citrate lyase to promote lipid biosynthesis and tumor growth. *Mol. Cell* 51, 506–518.
- Liu, J., Zhang, C., Lin, M., Zhu, W., Liang, Y., Hong, X., Zhao, Y., Young, K.H., Hu, W., and Feng, Z. (2014). Glutaminase 2 negatively regulates the PI3K/AKT signaling and shows tumor suppression activity in human hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 5, 2635–2647.
- Liu, W., Le, A., Hancock, C., Lane, A.N., Dang, C.V., Fan, T.W.-M., and Phang, J.M. (2012a). Reprogramming of proline and glutamine metabolism contributes to the proliferative and metabolic responses regulated by oncogenic transcription factor c-MYC. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 8983–8988.
- Liu, Y., Cao, Y., Zhang, W., Bergmeier, S., Qian, Y., Akbar, H., Colvin, R., Ding, J., Tong, L., Wu, S., et al. (2012b). A small-molecule inhibitor of glucose transporter 1 downregulates glycolysis, induces cell-cycle arrest, and inhibits cancer cell growth in vitro and in vivo. *Mol. Cancer Ther.* 11, 1672–1682.
- Locasale, J.W. (2013). Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. *Nat. Rev. Cancer* 13, 572–583.
- Locasale, J.W., Grassian, A.R., Melman, T., Lyssiotis, C.A., Mattaini, K.R., Bass, A.J., Heffron, G., Metallo, C.M., Muranen, T., Sharfi, H., et al. (2011). Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. *Nat. Genet.* 43, 869–874.
- Losman, J.-A., and Kaelin, W.G. (2013). What a difference a hydroxyl makes: mutant IDH, (R)-2-hydroxyglutarate, and cancer. *Genes Dev.* 27, 836–852.
- Losman, J.-A., Looper, R.E., Koivunen, P., Lee, S., Schneider, R.K., McMahon, C., Cowley, G.S., Root, D.E., Ebert, B.L., and Kaelin, W.G. (2013). (R)-2-hydroxyglutarate is sufficient to promote leukemogenesis and its effects are reversible. *Science* 339, 1621–1625.
- Lu, C., Ward, P.S., Kapoor, G.S., Rohle, D., Turcan, S., Abdel-Wahab, O., Edwards, C.R., Khanin, R., Figueroa, M.E., Melnick, A., et al. (2012). IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature* 483, 474–478.
- Macheda, M.L., Rogers, S., and Best, J.D. (2005). Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J. Cell. Physiol.* 202, 654–662.
- Majewski, N., Nogueira, V., Bhaskar, P., Coy, P.E., Skeen, J.E., Gottlob, K., Chandel, N.S., Thompson, C.B., Robey, R.B., and Hay, N. (2004). Hexokinase-mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak. *Mol. Cell* 16, 819–830.

- Mardiros, A., Brown, C.E., Budde, L.E., Wang, X., and Forman, S.J. (2013). Acute myeloid leukemia therapeutics: CARs in the driver's seat. *Oncoimmunology* 2, e27214.
- Mardis, E.R., Ding, L., Dooling, D.J., Larson, D.E., McLellan, M.D., Chen, K., Koboldt, D.C., Fulton, R.S., Delehaanty, 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.
- Martín-Rufián, M., Tosina, M., Campos-Sandoval, J.A., Manzanares, E., Lobo, C., Segura, J.A., Alonso, F.J., Matés, J.M., and Márquez, J. (2012). Mammalian glutaminase Gls2 gene encodes two functional alternative transcripts by a surrogate promoter usage mechanism. *PLoS One* 7, e38380.
- Martín-Rufián, M., Nascimento-Gomes, R., Higuero, A., Crisma, A.R., Campos-Sandoval, J.A., Gómez-García, M.C., Cardona, C., Cheng, T., Lobo, C., Segura, J.A., et al. (2014). Both GLS silencing and GLS2 overexpression synergize with oxidative stress against proliferation of glioma cells. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 92, 277–290.
- Masson, J., Darmon, M., Conjard, A., Chuhma, N., Ropert, N., Thoby-Brisson, M., Foutz, A.S., Parrot, S., Miller, G.M., Jorsch, R., et al. (2006). Mice lacking brain/kidney phosphate-activated glutaminase have impaired glutamatergic synaptic transmission, altered breathing, disorganized goal-directed behavior and die shortly after birth. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 4660–4671.
- Mathupala, S.P., Heese, C., and Pedersen, P.L. (1997). Glucose catabolism in cancer cells. The type II hexokinase promoter contains functionally active response elements for the tumor suppressor p53. *J. Biol. Chem.* 272, 22776–22780.
- Matre, Protopopova M, Feng N, Gay J, Greer J, Velez J, Mu H, Lodi A, Tadi S, Sweeney S, et al. (2014). Novel Nanomolar Potency Mitochondrial Complex I Inhibitor Iacs-1131 Selectively Kills Oxphos-Dependent AML Cells.
- McCauley, R., Kong, S.E., Heel, K., and Hall, J.C. (1999). The role of glutaminase in the small intestine. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31, 405–413.
- Metallo, C.M., Gameiro, P.A., Bell, E.L., Mattaini, K.R., Yang, J., Hiller, K., Jewell, C.M., Johnson, Z.R., Irvine, D.J., Guarente, L., et al. (2012). Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature* 481, 380–384.
- Meyer, S.C., and Levine, R.L. (2014). Translational implications of somatic genomics in acute myeloid leukaemia. *Lancet Oncol.* 15, e382–e394.
- Migita, T., Narita, T., Nomura, K., Miyagi, E., Inazuka, F., Matsuura, M., Ushijima, M., Mashima, T., Seimiya, H., Satoh, Y., et al. (2008). ATP citrate lyase: activation and therapeutic implications in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 68, 8547–8554.
- Miyamoto, T., Nagafuji, K., Akashi, K., Harada, M., Kyo, T., Akashi, T., Takenaka, K., Mizuno, S., Gondo, H., Okamura, T., et al. (1996). Persistence of multipotent progenitors expressing AML1/ETO transcripts in long-term remission patients with t(8;21) acute myelogenous leukemia. *Blood* 87, 4789–4796.
- Mock, B., Kozak, C., Seldin, M.F., Ruff, N., D'Hoostelaere, L., Szpirer, C., Levan, G., Seuanez, H., O'Brien, S., and Banner, C. (1989). A glutaminase (gis) gene maps to mouse chromosome 1, rat chromosome 9, and human chromosome 2. *Genomics* 5, 291–297.
- Moncada, S., Higgs, E.A., and Colombo, S.L. (2012). Fulfilling the metabolic requirements for cell proliferation. *Biochem. J.* 446, 1–7.

- Moran-Crusio, K., Reavie, L., Shih, A., Abdel-Wahab, O., Ndiaye-Lobry, D., Lobry, C., Figueroa, M.E., Vasanthakumar, A., Patel, J., Zhao, X., et al. (2011). Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. *Cancer Cell* 20, 11–24.
- Moreno-Sánchez, R., Rodríguez-Enríquez, S., Marín-Hernández, A., and Saavedra, E. (2007). Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J.* 274, 1393–1418.
- Mullen, A.R., Wheaton, W.W., Jin, E.S., Chen, P.-H., Sullivan, L.B., Cheng, T., Yang, Y., Linehan, W.M., Chandel, N.S., and DeBerardinis, R.J. (2012). Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria. *Nature* 481, 385–388.
- Mupo, A., Celani, L., Dovey, O., Cooper, J.L., Grove, C., Rad, R., Sportoletti, P., Falini, B., Bradley, A., and Vassiliou, G.S. (2013). A powerful molecular synergy between mutant Nucleophosmin and Flt3-ITD drives acute myeloid leukemia in mice. *Leukemia* 27, 1917–1920.
- Murata, S., Yanagisawa, K., Fukunaga, K., Oda, T., Kobayashi, A., Sasaki, R., and Ohkohchi, N. (2010). Fatty acid synthase inhibitor cerulenin suppresses liver metastasis of colon cancer in mice. *Cancer Sci.* 101, 1861–1865.
- Murphy, T.A., Dang, C.V., and Young, J.D. (2013). Isotopically nonstationary ¹³C flux analysis of Myc-induced metabolic reprogramming in B-cells. *Metab. Eng.* 15, 206–217.
- Nagase, T., Ishikawa, K., Suyama, M., Kikuno, R., Hirose, M., Miyajima, N., Tanaka, A., Kotani, H., Nomura, N., and Ohara, O. (1998). Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res. Int. J. Rapid Publ. Rep. Genes Genomes* 5, 355–364.
- Nicklin, P., Bergman, P., Zhang, B., Triantafellow, E., Wang, H., Nyfeler, B., Yang, H., Hild, M., Kung, C., Wilson, C., et al. (2009). Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* 136, 521–534.
- Obach, M., Navarro-Sabaté, A., Caro, J., Kong, X., Duran, J., Gómez, M., Perales, J.C., Ventura, F., Rosa, J.L., and Bartrons, R. (2004). 6-Phosphofructo-2-kinase (pfkfb3) gene promoter contains hypoxia-inducible factor-1 binding sites necessary for transactivation in response to hypoxia. *J. Biol. Chem.* 279, 53562–53570.
- Oburoglu, L., Tardito, S., Fritz, V., de Barros, S.C., Merida, P., Craveiro, M., Mamede, J., Cretenet, G., Mongellaz, C., An, X., et al. (2014). Glucose and glutamine metabolism regulate human hematopoietic stem cell lineage specification. *Cell Stem Cell* 15, 169–184.
- Oda, K., Hosoda, N., Endo, H., Saito, K., Tsujihara, K., Yamamura, M., Sakata, T., Anzai, N., Wempe, M.F., Kanai, Y., et al. (2010). L-type amino acid transporter 1 inhibitors inhibit tumor cell growth. *Cancer Sci.* 101, 173–179.
- Offman, M.N., Krol, M., Patel, N., Krishnan, S., Liu, J., Saha, V., and Bates, P.A. (2011). Rational engineering of L-asparaginase reveals importance of dual activity for cancer cell toxicity. *Blood* 117, 1614–1621.
- Okada, S., Hongo, T., Yamada, S., Watanabe, C., Fujii, Y., Ohzeki, T., Horikoshi, Y., Ito, T., Yazaki, M., Komada, Y., et al. (2003). In vitro efficacy of l-asparaginase in childhood acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* 123, 802–809.
- Olalla, L., Gutiérrez, A., Campos, J.A., Khan, Z.U., Alonso, F.J., Segura, J.A., Márquez, J., and Aledo, J.C. (2002). Nuclear localization of L-type glutaminase in mammalian brain. *J. Biol. Chem.* 277, 38939–38944.

- Osthus, R.C., Shim, H., Kim, S., Li, Q., Reddy, R., Mukherjee, M., Xu, Y., Wonsey, D., Lee, L.A., and Dang, C.V. (2000). Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J. Biol. Chem.* *275*, 21797–21800.
- Palmada, M., Speil, A., Jeyaraj, S., Böhmer, C., and Lang, F. (2005). The serine/threonine kinases SGK1, 3 and PKB stimulate the amino acid transporter ASCT2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *331*, 272–277.
- Papandreou, I., Cairns, R.A., Fontana, L., Lim, A.L., and Denko, N.C. (2006). HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab.* *3*, 187–197.
- 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.
- Parsons, D.W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J.C.-H., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I.-M., Gallia, G.L., et al. (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* *321*, 1807–1812.
- Pastore, F., Dufour, A., Benthaus, T., Metzeler, K.H., Maharry, K.S., Schneider, S., Ksienzyk, B., Mellert, G., Zellmeier, E., Kakadia, P.M., et al. (2014). Combined molecular and clinical prognostic index for relapse and survival in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *32*, 1586–1594.
- 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. (2012). Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* *366*, 1079–1089.
- Patel, M., Dalvi, P., Gokulgandhi, M., Kesh, S., Kohli, T., Pal, D., and Mitra, A.K. (2013). Functional characterization and molecular expression of large neutral amino acid transporter (LAT1) in human prostate cancer cells. *Int. J. Pharm.* *443*, 245–253.
- Pawlik, T.M., Souba, W.W., Sweeney, T.J., and Bode, B.P. (2000). Amino acid uptake and regulation in multicellular hepatoma spheroids. *J. Surg. Res.* *91*, 15–25.
- Pearce, D.J., Taussig, D., Zibara, K., Smith, L.-L., Ridler, C.M., Preudhomme, C., Young, B.D., Rohatiner, A.Z., Lister, T.A., and Bonnet, D. (2006). AML engraftment in the NOD/SCID assay reflects the outcome of AML: implications for our understanding of the heterogeneity of AML. *Blood* *107*, 1166–1173.
- 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.
- 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.
- Picaud, S., Kavanagh, K.L., Yue, W.W., Lee, W.H., Muller-Knapp, S., Gileadi, O., Sacchettini, J., and Oppermann, U. (2011). Structural basis of fumarate hydratase deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* *34*, 671–676.

- Pinheiro, C., Reis, R.M., Ricardo, S., Longatto-Filho, A., Schmitt, F., and Baltazar, F. (2010). Expression of monocarboxylate transporters 1, 2, and 4 in human tumours and their association with CD147 and CD44. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 427694.
- Pinilla, J., Aledo, J.C., Cwiklinski, E., Hyde, R., Taylor, P.M., and Hundal, H.S. (2011). SNAT2 transceptor signalling via mTOR: a role in cell growth and proliferation? *Front. Biosci. Elite Ed.* 3, 1289–1299.
- Pochini, L., Scalise, M., Galluccio, M., and Indiveri, C. (2014). Membrane transporters for the special amino acid glutamine: structure/function relationships and relevance to human health. *Front. Chem.* 2, 61.
- Porstmann, T., Griffiths, B., Chung, Y.-L., Delpuech, O., Griffiths, J.R., Downward, J., and Schulze, A. (2005). PKB/Akt induces transcription of enzymes involved in cholesterol and fatty acid biosynthesis via activation of SREBP. *Oncogene* 24, 6465–6481.
- Possemato, R., Marks, K.M., Shaul, Y.D., Pacold, M.E., Kim, D., Birsoy, K., Sethumadhavan, S., Woo, H.-K., Jang, H.G., Jha, A.K., et al. (2011). Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. *Nature* 476, 346–350.
- Qing, G., Li, B., Vu, A., Skuli, N., Walton, Z.E., Liu, X., Mayes, P.A., Wise, D.R., Thompson, C.B., Maris, J.M., et al. (2012). ATF4 regulates MYC-mediated neuroblastoma cell death upon glutamine deprivation. *Cancer Cell* 22, 631–644.
- De Queiroz, R.M., Carvalho, E., and Dias, W.B. (2014). O-GlcNAcylation: The Sweet Side of the Cancer. *Front. Oncol.* 4, 132.
- Quivoron, C., Couronné, L., Della Valle, V., Lopez, C.K., Plo, I., Wagner-Ballon, O., Do Cruzeiro, M., Delhommeau, F., Arnulf, B., Stern, M.-H., et al. (2011). TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis. *Cancer Cell* 20, 25–38.
- Raez, L.E., Papadopoulos, K., Ricart, A.D., Chiorean, E.G., Dipaola, R.S., Stein, M.N., Rocha Lima, C.M., Schlesselman, J.J., Tolba, K., Langmuir, V.K., et al. (2013). A phase I dose-escalation trial of 2-deoxy-D-glucose alone or combined with docetaxel in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 71, 523–530.
- Rathore, M.G., Saumet, A., Rossi, J.-F., de Bettignies, C., Tempé, D., Lecellier, C.-H., and Villalba, M. (2012). The NF- κ B member p65 controls glutamine metabolism through miR-23a. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 1448–1456.
- Récher, C., Dos Santos, C., Demur, C., and Payrastre, B. (2005a). mTOR, a new therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Cell Cycle Georget. Tex* 4, 1540–1549.
- 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. (2005b). Antileukemic activity of rapamycin in acute myeloid leukemia. *Blood* 105, 2527–2534.
- Reinert, R.B., Oberle, L.M., Wek, S.A., Bunpo, P., Wang, X.P., Mileva, I., Goodwin, L.O., Aldrich, C.J., Durden, D.L., McNurlan, M.A., et al. (2006). Role of glutamine depletion in directing tissue-specific nutrient stress responses to L-asparaginase. *J. Biol. Chem.* 281, 31222–31233.
- Reitman, Z.J., Jin, G., Karoly, E.D., Spasojevic, I., Yang, J., Kinzler, K.W., He, Y., Bigner, D.D., Vogelstein, B., and Yan, H. (2011). Profiling the effects of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations on the cellular metabolome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 3270–3275.

- Reynolds, M.R., Lane, A.N., Robertson, B., Kemp, S., Liu, Y., Hill, B.G., Dean, D.C., and Clem, B.F. (2014). Control of glutamine metabolism by the tumor suppressor Rb. *Oncogene* *33*, 556–566.
- Van Rhenen, A., Feller, N., Kelder, A., Westra, A.H., Rombouts, E., Zweegman, S., van der Pol, M.A., Waisfisz, Q., Ossenkoppele, G.J., and Schuurhuis, G.J. (2005). High stem cell frequency in acute myeloid leukemia at diagnosis predicts high minimal residual disease and poor survival. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *11*, 6520–6527.
- Van Rhenen, A., van Dongen, G.A.M.S., Kelder, A., Rombouts, E.J., Feller, N., Moshaver, B., Stigter-van Walsum, M., Zweegman, S., Ossenkoppele, G.J., and Jan Schuurhuis, G. (2007). The novel AML stem cell associated antigen CLL-1 aids in discrimination between normal and leukemic stem cells. *Blood* *110*, 2659–2666.
- Robey, R.B., and Hay, N. (2009). Is Akt the “Warburg kinase”?-Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis. *Semin. Cancer Biol.* *19*, 25–31.
- Robinson, M.M., McBryant, S.J., Tsukamoto, T., Rojas, C., Ferraris, D.V., Hamilton, S.K., Hansen, J.C., and Curthoys, N.P. (2007). Novel mechanism of inhibition of rat kidney-type glutaminase by bis-(5-phenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide (BPTES). *Biochem. J.* *406*, 407–414.
- 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.
- Ronan, B., Flamand, O., Vescovi, L., Dureuil, C., Durand, L., Fassy, F., Bachelot, M.-F., Lamberton, A., Mathieu, M., Bertrand, T., et al. (2014). A highly potent and selective Vps34 inhibitor alters vesicle trafficking and autophagy. *Nat. Chem. Biol.* *10*, 1013–1019.
- De la Rosa, V., Campos-Sandoval, J.A., Martín-Rufián, M., Cardona, C., Matés, J.M., Segura, J.A., Alonso, F.J., and Márquez, J. (2009). A novel glutaminase isoform in mammalian tissues. *Neurochem. Int.* *55*, 76–84.
- Rosati, A., Poliani, P.L., Todeschini, A., Cominelli, M., Medicina, D., Cenzato, M., Simoncini, E.L., Magrini, S.M., Buglione, M., Grisanti, S., et al. (2013). Glutamine synthetase expression as a valuable marker of epilepsy and longer survival in newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Neuro-Oncol.* *15*, 618–625.
- Ross, D.W., and Capizzi, R.L. (1984). Differentiation versus cyto-reduction during remission induction in acute nonlymphoblastic leukemia treated with sequential high-dose ara-C and asparaginase. *Cancer* *53*, 1651–1654.
- Rotoli, B.M., Uggeri, J., Dall’Asta, V., Visigalli, R., Barilli, A., Gatti, R., Orlandini, G., Gazzola, G.C., and Bussolati, O. (2005). Inhibition of glutamine synthetase triggers apoptosis in asparaginase-resistant cells. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* *15*, 281–292.
- 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.
- Samudio, I., Fiegl, M., McQueen, T., Clise-Dwyer, K., and Andreeff, M. (2008). The warburg effect in leukemia-stroma cocultures is mediated by mitochondrial uncoupling associated with uncoupling protein 2 activation. *Cancer Res.* *68*, 5198–5205.

- Samudio, I., Harmancey, R., Fiegl, M., Kantarjian, H., Konopleva, M., Korchin, B., Kaluarachchi, K., Bornmann, W., Duvvuri, S., Taegtmeier, H., et al. (2010). Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction. *J. Clin. Invest.* *120*, 142–156.
- 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). Regulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* *141*, 290–303.
- Dos Santos, C., Demur, C., Bardet, V., Prade-Houdellier, N., Payrastre, B., and Récher, C. (2008). A critical role for Lyn in acute myeloid leukemia. *Blood* *111*, 2269–2279.
- Sasaki, M., Knobbe, C.B., Munger, J.C., Lind, E.F., Brenner, D., Brüstle, A., Harris, I.S., Holmes, R., Wakeham, A., Haight, J., et al. (2012). IDH1(R132H) mutation increases murine haematopoietic progenitors and alters epigenetics. *Nature* *488*, 656–659.
- Schwartzenberg-Bar-Yoseph, F., Armoni, M., and Karnieli, E. (2004). The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression. *Cancer Res.* *64*, 2627–2633.
- 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.
- Sebastián, C., Zwaans, B.M.M., Silberman, D.M., Gymrek, M., Goren, A., Zhong, L., Ram, O., Truelove, J., Guimaraes, A.R., Toiber, D., et al. (2012). The histone deacetylase SIRT6 is a tumor suppressor that controls cancer metabolism. *Cell* *151*, 1185–1199.
- Segawa, A., Nagamori, S., Kanai, Y., Masawa, N., and Oyama, T. (2013). L-type amino acid transporter 1 expression is highly correlated with Gleason score in prostate cancer. *Mol. Clin. Oncol.* *1*, 274–280.
- Seltzer, M.J., Bennett, B.D., Joshi, A.D., Gao, P., Thomas, A.G., Ferraris, D.V., Tsukamoto, T., Rojas, C.J., Slusher, B.S., Rabinowitz, J.D., et al. (2010). Inhibition of glutaminase preferentially slows growth of glioma cells with mutant IDH1. *Cancer Res.* *70*, 8981–8987.
- Shapiro, R.A., Clark, V.M., and Curthoys, N.P. (1978). Covalent interaction of L-2-amino-4-oxo-5-chloropentanoic acid with rat renal phosphate-dependent glutaminase. Evidence for a specific glutamate binding site and of subunit heterogeneity. *J. Biol. Chem.* *253*, 7086–7090.
- Shapiro, R.A., Clark, V.M., and Curthoys, N.P. (1979). Inactivation of rat renal phosphate-dependent glutaminase with 6-diazo-5-oxo-L-norleucine. Evidence for interaction at the glutamine binding site. *J. Biol. Chem.* *254*, 2835–2838.
- Shennan, D.B., and Thomson, J. (2008). Inhibition of system L (LAT1/CD98hc) reduces the growth of cultured human breast cancer cells. *Oncol. Rep.* *20*, 885–889.
- Shim, H., Dolde, C., Lewis, B.C., Wu, C.S., Dang, G., Jungmann, R.A., Dalla-Favera, R., and Dang, C.V. (1997). c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 6658–6663.

- Shimizu, K., Kaira, K., Tomizawa, Y., Sunaga, N., Kawashima, O., Oriuchi, N., Tominaga, H., Nagamori, S., Kanai, Y., Yamada, M., et al. (2014). ASC amino-acid transporter 2 (ASCT2) as a novel prognostic marker in non-small cell lung cancer. *Br. J. Cancer*.
- 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.
- Shukla, K., Ferraris, D.V., Thomas, A.G., Stathis, M., Duvall, B., Delahanty, G., Alt, J., Rais, R., Rojas, C., Gao, P., et al. (2012). Design, synthesis, and pharmacological evaluation of bis-2-(5-phenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide 3 (BPTES) analogs as glutaminase inhibitors. *J. Med. Chem.* *55*, 10551–10563.
- Sidoryk, M., Matyja, E., Dybel, A., Zielinska, M., Bogucki, J., Jaskólski, D.J., Liberski, P.P., Kowalczyk, P., and Albrecht, J. (2004). Increased expression of a glutamine transporter SNAT3 is a marker of malignant gliomas. *Neuroreport* *15*, 575–578.
- Simpson, N.E., Tryndyak, V.P., Pogribna, M., Beland, F.A., and Pogribny, I.P. (2012). Modifying metabolically sensitive histone marks by inhibiting glutamine metabolism affects gene expression and alters cancer cell phenotype. *Epigenetics Off. J. DNA Methylation Soc.* *7*, 1413–1420.
- Simsek, T., Kocabas, F., Zheng, J., Deberardinis, R.J., Mahmoud, A.I., Olson, E.N., Schneider, J.W., Zhang, C.C., and Sadek, H.A. (2010). The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell* *7*, 380–390.
- Singh, D., Banerji, A.K., Dwarakanath, B.S., Tripathi, R.P., Gupta, J.P., Mathew, T.L., Ravindranath, T., and Jain, V. (2005). Optimizing cancer radiotherapy with 2-deoxy-d-glucose dose escalation studies in patients with glioblastoma multiforme. *Strahlenther. Onkol. Organ Dtsch. Röntgenes. Al* *181*, 507–514.
- Skrtić, M., Sriskanthadevan, S., Jhas, B., Gebbia, M., Wang, X., Wang, Z., Hurren, R., Jitkova, Y., Gronda, M., Maclean, N., et al. (2011). Inhibition of mitochondrial translation as a therapeutic strategy for human acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* *20*, 674–688.
- Smith, E.M., Finn, S.G., Tee, A.R., Browne, G.J., and Proud, C.G. (2005). The tuberous sclerosis protein TSC2 is not required for the regulation of the mammalian target of rapamycin by amino acids and certain cellular stresses. *J. Biol. Chem.* *280*, 18717–18727.
- Son, J., Lyssiotis, C.A., Ying, H., Wang, X., Hua, S., Ligorio, M., Perera, R.M., Ferrone, C.R., Mullarky, E., Shyh-Chang, N., et al. (2013). Glutamine supports pancreatic cancer growth through a KRAS-regulated metabolic pathway. *Nature* *496*, 101–105.
- Sonveaux, P., Végran, F., Schroeder, T., Wergin, M.C., Verrax, J., Rabbani, Z.N., De Saedeleer, C.J., Kennedy, K.M., Diepart, C., Jordan, B.F., et al. (2008). Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J. Clin. Invest.* *118*, 3930–3942.
- Stein, M., Lin, H., Jeyamohan, C., Dvorzhinski, D., Gounder, M., Bray, K., Eddy, S., Goodin, S., White, E., and Dipaola, R.S. (2010). Targeting tumor metabolism with 2-deoxyglucose in patients with castrate-resistant prostate cancer and advanced malignancies. *The Prostate* *70*, 1388–1394.
- Suganuma, K., Miwa, H., Imai, N., Shikami, M., Gotou, M., Goto, M., Mizuno, S., Takahashi, M., Yamamoto, H., Hiramatsu, A., et al. (2010). Energy metabolism of leukemia cells: glycolysis versus oxidative phosphorylation. *Leuk. Lymphoma* *51*, 2112–2119.

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.

Suzuki, S., Tanaka, T., Poyurovsky, M.V., Nagano, H., Mayama, T., Ohkubo, S., Lokshin, M., Hosokawa, H., Nakayama, T., Suzuki, Y., et al. (2010). Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a p53-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 7461–7466.

Szeliga, M., Sidoryk, M., Matyja, E., Kowalczyk, P., and Albrecht, J. (2005). Lack of expression of the liver-type glutaminase (LGA) mRNA in human malignant gliomas. *Neurosci. Lett.* *374*, 171–173.

Szeliga, M., Bogacińska-Karaś, M., Różycka, A., Hilgier, W., Marquez, J., and Albrecht, J. (2014). Silencing of GLS and overexpression of GLS2 genes cooperate in decreasing the proliferation and viability of glioblastoma cells. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* *35*, 1855–1862.

Takubo, K., Nagamatsu, G., Kobayashi, C.I., Nakamura-Ishizu, A., Kobayashi, H., Ikeda, E., Goda, N., Rahimi, Y., Johnson, R.S., Soga, T., et al. (2013). Regulation of glycolysis by Pdk functions as a metabolic checkpoint for cell cycle quiescence in hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* *12*, 49–61.

Tamburini, J., Chapuis, N., Bardet, V., Park, S., Sujobert, P., Willems, L., Ifrah, N., Dreyfus, F., Mayeux, P., Lacombe, C., et al. (2008a). 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., Chapuis, N., Bardet, V., Park, S., Sujobert, P., Willems, L., Ifrah, N., Dreyfus, F., Mayeux, P., Lacombe, C., et al. (2008b). 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.

Tefferi, A., Lasho, T.L., Abdel-Wahab, O., Guglielmelli, P., Patel, J., Caramazza, D., Pieri, L., Finke, C.M., Kilpivaara, O., Wadleigh, M., et al. (2010). IDH1 and IDH2 mutation studies in 1473 patients with chronic-, fibrotic- or blast-phase essential thrombocythemia, polycythemia vera or myelofibrosis. *Leukemia* *24*, 1302–1309.

Terunuma, A., Putluri, N., Mishra, P., Mathé, E.A., Dorsey, T.H., Yi, M., Wallace, T.A., Issaq, H.J., Zhou, M., Killian, J.K., et al. (2014). MYC-driven accumulation of 2-hydroxyglutarate is associated with breast cancer prognosis. *J. Clin. Invest.* *124*, 398–412.

Thangavelu, K., Pan, C.Q., Karlberg, T., Balaji, G., Uttamchandani, M., Suresh, V., Schüler, H., Low, B.C., and Sivaraman, J. (2012). Structural basis for the allosteric inhibitory mechanism of human kidney-type glutaminase (KGA) and its regulation by Raf-Mek-Erk signaling in cancer cell metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 7705–7710.

Thangavelu, K., Chong, Q.Y., Low, B.C., and Sivaraman, J. (2014). Structural basis for the active site inhibition mechanism of human kidney-type glutaminase (KGA). *Sci. Rep.* *4*, 3827.

Thomas, A.G., Rojas, C., Tanega, C., Shen, M., Simeonov, A., Boxer, M.B., Auld, D.S., Ferraris, D.V., Tsukamoto, T., and Slusher, B.S. (2013). Kinetic characterization of ebselen, chelerythrine and apomorphine as glutaminase inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *438*, 243–248.

- Timmerman, L.A., Holton, T., Yuneva, M., Louie, R.J., Padró, M., Daemen, A., Hu, M., Chan, D.A., Ethier, S.P., van 't Veer, L.J., et al. (2013). Glutamine sensitivity analysis identifies the xCT antiporter as a common triple-negative breast tumor therapeutic target. *Cancer Cell* 24, 450–465.
- Toyoda, M., Kaira, K., Ohshima, Y., Ishioka, N.S., Shino, M., Sakakura, K., Takayasu, Y., Takahashi, K., Tominaga, H., Oriuchi, N., et al. (2014). Prognostic significance of amino-acid transporter expression (LAT1, ASCT2, and xCT) in surgically resected tongue cancer. *Br. J. Cancer* 110, 2506–2513.
- Tsun, Z.-Y., Bar-Peled, L., Chantranupong, L., Zoncu, R., Wang, T., Kim, C., Spooner, E., and Sabatini, D.M. (2013). The folliculin tumor suppressor is a GAP for the RagC/D GTPases that signal amino acid levels to mTORC1. *Mol. Cell* 52, 495–505.
- Tsunekawa-Imai, N., Miwa, H., Shikami, M., Sukanuma, K., Goto, M., Mizuno, S., Takahashi, M., Mizutani, M., Horio, T., Komatsubara, H., et al. (2013). Growth of xenotransplanted leukemia cells is influenced by diet nutrients and is attenuated with 2-deoxyglucose. *Leuk. Res.* 37, 1132–1136.
- Turcan, S., Rohle, D., Goenka, A., Walsh, L.A., Fang, F., Yilmaz, E., Campos, C., Fabius, A.W.M., Lu, C., Ward, P.S., et al. (2012). IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature* 483, 479–483.
- Ullah, M.S., Davies, A.J., and Halestrap, A.P. (2006). The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1alpha-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 281, 9030–9037.
- Vander Heiden, M.G., Christofk, H.R., Schuman, E., Subtelny, A.O., Sharfi, H., Harlow, E.E., Xian, J., and Cantley, L.C. (2010). Identification of small molecule inhibitors of pyruvate kinase M2. *Biochem. Pharmacol.* 79, 1118–1124.
- Vélez, J., Hail, N., Konopleva, M., Zeng, Z., Kojima, K., Samudio, I., and Andreeff, M. (2013). Mitochondrial uncoupling and the reprogramming of intermediary metabolism in leukemia cells. *Front. Oncol.* 3, 67.
- Velletri, T., Romeo, F., Tucci, P., Peschiaroli, A., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Niklison-Chirou, M.V., Amelio, I., Knight, R.A., Mak, T.W., Melino, G., et al. (2013). GLS2 is transcriptionally regulated by p73 and contributes to neuronal differentiation. *Cell Cycle Georget. Tex* 12, 3564–3573.
- Wallace, D.C. (2012). Mitochondria and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 12, 685–698.
- Walsh, M.J., Brimacombe, K.R., Anastasiou, D., Yu, Y., Israelsen, W.J., Hong, B.-S., Tempel, W., Dimov, S., Veith, H., Yang, H., et al. (2010). ML265: A potent PKM2 activator induces tetramerization and reduces tumor formation and size in a mouse xenograft model. In *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program*, (Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US)),.
- Wang, F., Travins, J., DeLaBarre, B., Penard-Lacronique, V., Schalm, S., Hansen, E., Straley, K., Kernytsky, A., Liu, W., Gliser, C., et al. (2013a). Targeted inhibition of mutant IDH2 in leukemia cells induces cellular differentiation. *Science* 340, 622–626.
- Wang, J.-B., Erickson, J.W., Fuji, R., Ramachandran, S., Gao, P., Dinavahi, R., Wilson, K.F., Ambrosio, A.L.B., Dias, S.M.G., Dang, C.V., et al. (2010). Targeting mitochondrial glutaminase activity inhibits oncogenic transformation. *Cancer Cell* 18, 207–219.

- Wang, K., Cao, F., Fang, W., Hu, Y., Chen, Y., Ding, H., and Yu, G. (2013b). Activation of SNAT1/SLC38A1 in human breast cancer: correlation with p-Akt overexpression. *BMC Cancer* *13*, 343.
- Wang, Q., Bailey, C.G., Ng, C., Tiffen, J., Thoeng, A., Minhas, V., Lehman, M.L., Hendy, S.C., Buchanan, G., Nelson, C.C., et al. (2011). Androgen receptor and nutrient signaling pathways coordinate the demand for increased amino acid transport during prostate cancer progression. *Cancer Res.* *71*, 7525–7536.
- Wang, Q., Beaumont, K.A., Otte, N.J., Font, J., Bailey, C.G., van Geldermalsen, M., Sharp, D.M., Tiffen, J.C., Ryan, R.M., Jormakka, M., et al. (2014a). Targeting glutamine transport to suppress melanoma cell growth. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *135*, 1060–1071.
- Wang, Q., Beaumont, K.A., Otte, N.J., Font, J., Bailey, C.G., van Geldermalsen, M., Sharp, D.M., Tiffen, J.C., Ryan, R.M., Jormakka, M., et al. (2014b). Targeting glutamine transport to suppress melanoma cell growth. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *135*, 1060–1071.
- Wang, X., Campbell, L.E., Miller, C.M., and Proud, C.G. (1998). Amino acid availability regulates p70 S6 kinase and multiple translation factors. *Biochem. J.* *334 (Pt 1)*, 261–267.
- Wang, Y.-H., Israelsen, W.J., Lee, D., Yu, V.W.C., Jeanson, N.T., Clish, C.B., Cantley, L.C., Vander Heiden, M.G., and Scadden, D.T. (2014c). Cell-state-specific metabolic dependency in hematopoiesis and leukemogenesis. *Cell* *158*, 1309–1323.
- Warburg, O. (1956a). On the origin of cancer cells. *Science* *123*, 309–314.
- Warburg, O. (1956b). On respiratory impairment in cancer cells. *Science* *124*, 269–270.
- Ward, P.S., Patel, J., Wise, D.R., Abdel-Wahab, O., Bennett, B.D., Collier, H.A., Cross, J.R., Fantin, V.R., Hedvat, C.V., Perl, A.E., et al. (2010). The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell* *17*, 225–234.
- Warr, M.R., and Passegué, E. (2013). Metabolic makeover for HSCs. *Cell Stem Cell* *12*, 1–3.
- Welch, J.S. (2014). Mutation position within evolutionary subclonal architecture in AML. *Semin. Hematol.* *51*, 273–281.
- Wellen, K.E., Hatzivassiliou, G., Sachdeva, U.M., Bui, T.V., Cross, J.R., and Thompson, C.B. (2009). ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science* *324*, 1076–1080.
- 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.
- Wise, D.R., DeBerardinis, R.J., Mancuso, A., Sayed, N., Zhang, X.-Y., Pfeiffer, H.K., Nissim, I., Daikhin, E., Yudkoff, M., McMahon, S.B., et al. (2008). Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 18782–18787.

- Wise, D.R., Ward, P.S., Shay, J.E.S., Cross, J.R., Gruber, J.J., Sachdeva, U.M., Platt, J.M., DeMatteo, R.G., Simon, M.C., and Thompson, C.B. (2011). Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of α -ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 19611–19616.
- Witte, D., Ali, N., Carlson, N., and Younes, M. (2002). Overexpression of the neutral amino acid transporter ASCT2 in human colorectal adenocarcinoma. *Anticancer Res.* *22*, 2555–2557.
- Xie, H., Hanai, J.-I., Ren, J.-G., Kats, L., Burgess, K., Bhargava, P., Signoretti, S., Billiard, J., Duffy, K.J., Grant, A., et al. (2014a). Targeting lactate dehydrogenase--a inhibits tumorigenesis and tumor progression in mouse models of lung cancer and impacts tumor-initiating cells. *Cell Metab.* *19*, 795–809.
- Xie, J., Li, P., Gao, H.-F., Qian, J.-X., Yuan, L.-Y., and Wang, J.-J. (2014b). Overexpression of SLC38A1 is associated with poorer prognosis in Chinese patients with gastric cancer. *BMC Gastroenterol.* *14*, 70.
- 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, W., Yang, H., Liu, Y., Yang, Y., Wang, P., Kim, S.-H., Ito, S., Yang, C., Wang, P., Xiao, M.-T., et al. (2011). Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell* *19*, 17–30.
- Xu, Z., Wang, M., Wang, L., Wang, Y., Zhao, X., Rao, Q., and Wang, J. (2009). Aberrant expression of TSC2 gene in the newly diagnosed acute leukemia. *Leuk. Res.* *33*, 891–897.
- Yamauchi, K., Sakurai, H., Kimura, T., Wiriyaerkmul, P., Nagamori, S., Kanai, Y., and Kohno, N. (2009). System L amino acid transporter inhibitor enhances anti-tumor activity of cisplatin in a head and neck squamous cell carcinoma cell line. *Cancer Lett.* *276*, 95–101.
- Yanagisawa, N., Hana, K., Nakada, N., Ichinoe, M., Koizumi, W., Endou, H., Okayasu, I., and Murakumo, Y. (2014). High expression of L-type amino acid transporter 1 as a prognostic marker in bile duct adenocarcinomas. *Cancer Med.* *3*, 1246–1255.
- Yu, W.-M., Liu, X., Shen, J., Jovanovic, O., Pohl, E.E., Gerson, S.L., Finkel, T., Broxmeyer, H.E., and Qu, C.-K. (2013). Metabolic regulation by the mitochondrial phosphatase PTPMT1 is required for hematopoietic stem cell differentiation. *Cell Stem Cell* *12*, 62–74.
- Yuan, Y., Zhou, L., Miyamoto, T., Iwasaki, H., Harakawa, N., Hetherington, C.J., Burel, S.A., Lagasse, E., Weissman, I.L., Akashi, K., et al. (2001). AML1-ETO expression is directly involved in the development of acute myeloid leukemia in the presence of additional mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 10398–10403.
- Yun, D.-W., Lee, S.A., Park, M.-G., Kim, J.-S., Yu, S.-K., Park, M.-R., Kim, S.-G., Oh, J.-S., Kim, C.S., Kim, H.-J., et al. (2014). JPH203, an L-type amino acid transporter 1-selective compound, induces apoptosis of YD-38 human oral cancer cells. *J. Pharmacol. Sci.* *124*, 208–217.
- Yuneva, M., Zamboni, N., Oefner, P., Sachidanandam, R., and Lazebnik, Y. (2007). Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. *J. Cell Biol.* *178*, 93–105.
- Yuneva, M.O., Fan, T.W.M., Allen, T.D., Higashi, R.M., Ferraris, D.V., Tsukamoto, T., Matés, J.M., Alonso, F.J., Wang, C., Seo, Y., et al. (2012). The metabolic profile of tumors depends on both the responsible genetic lesion and tissue type. *Cell Metab.* *15*, 157–170.

- Zaidi, N., Swinnen, J.V., and Smans, K. (2012). ATP-citrate lyase: a key player in cancer metabolism. *Cancer Res.* 72, 3709–3714.
- Zhang, D., Li, J., Wang, F., Hu, J., Wang, S., and Sun, Y. (2014). 2-Deoxy-d-glucose targeting of glucose metabolism in cancer cells as a potential therapy. *Cancer Lett.*
- Zhang, J., Wang, C., Chen, M., Cao, J., Zhong, Y., Chen, L., Shen, H.-M., and Xia, D. (2013). Epigenetic silencing of glutaminase 2 in human liver and colon cancers. *BMC Cancer* 13, 601.
- Zhao, L., Huang, Y., and Zheng, J. (2013). STAT1 regulates human glutaminase 1 promoter activity through multiple binding sites in HIV-1 infected macrophages. *PloS One* 8, e76581.
- 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.
- Zwaan, C.M., Kaspers, G.J., Pieters, R., Ramakers-Van Woerden, N.L., den Boer, M.L., Wünsche, R., Rottier, M.M., Hähnel, K., van Wering, E.R., Janka-Schaub, G.E., et al. (2000). Cellular drug resistance profiles in childhood acute myeloid leukemia: differences between FAB types and comparison with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 96, 2879–2886.

Annexe 4. Targeting glutaminolysis has anti-leukemic activity in AML and synergizes with BCL-2 inhibition: Figures supplémentaires

Supplemental table 1. Patients' characteristics

Patient	Age	AML type	BM vs PB	WBC (G/L)	blast (%)	Cytogenetics	Molecular status	% of annexin V positive cells without and with CB-839
1	19	AML2, de novo	BM	15	89	46, XY	CEBPa mut	
2	71	AML5, de novo	BM	90	81	46, XX	NPM1 mut	
3	72	AML1, de novo	BM	20	73	46, XY	FLT3 mut	
4	64	AML2, de novo	BM	7,4	60	45, -Y, t(8;21)	AML1-ETO	
5	74	AML1, de novo	PB	120	100	46, XY	NPM1 mut, IDH1 R132	
6	60	AML5, de novo	PB	32	70	46, XY	none	
7	69	AML with MDS related-changes	PB	50	93	46, XY	none	
8	75	AML1, de novo	BM	89	92	46, XY	NA	
9	24	AML1, de novo	BM	5	70	46, XX	none	
10	74	Therapy related AML	PB	115	75	46, XX, 5q-	none	
11	68	AML6, de novo	PB	20	96	46, XY	none	
12	69	AML5, de novo	PB	23	79	46, XX, t(11;22)	EV11 overexpression	16 to 28
13	88	AML with MDS related-changes	PB	14	100	47, XY, +8	none	
14	65	AML5, de novo	BM	97	100	46, XY	FLT3-ITD, NPM1 mut, DNMT3A mut	
15	75	AML1, de novo	PB	25	82	46 XX	none	
16	28	AML2, de novo	BM	8,8	70	46, XY, t(8;21)	AML1-ETO	
17	60	AML1, de novo	PB	35	70	46, XY	FLT3-ITD	
18	81	AML1, de novo	BM	161	70	46, XX	FLT3-ITD, NPM1 mut, DNMT3A mut	
19	48	AML4, de novo	PB	30	70	46, XY, del9	none	12 to 17
20	89	AML5, de novo	PB	271	63	46, XX	NPM1 mut	32 to 39
21	83	AML with MDS related-changes	PB	61	60	43,XX,-5,-7,-17	none	8 to 15
22	40	AML1, de novo	BM	71	90	47,XY +8	FLT3 ITD, NPM1, DNMT3A	
23	57	acutised CML	PB	180	90	46 XX,t(9,22)	none	19 to 30
24	38	AML5, de novo	BM	71	76	46, XY, t(11q23;17q25)	MLL rearrangement	
25	81	AML5, de novo	PB	17	69	46, XX, t(8;16)	none	
26	61	AML5, de novo	PB	80	100	46, XY	SRSF2 P95H	
27	76	AML1, de novo	BM	2,7	70	46,XX	IDH2 R172K	20 to 30
28	65	AML5, de novo	PB	169	80	46, XY	FLT3 ITD, DNMT3A	12 to 16
29	66	AML4, de novo	BM	1,35	80	47, XX, tri8	IDH2 R172K, DNMT3A	32 to 36
30	69	AML4, de novo	BM	69	55	46, XY	IDH2 R140Q, SRSF2 P95H, ASXL1	20 to 25
31	77	AML with MDS related-changes	PB	51	66	45, XX, -7	nd	17 to 22

AML: acute myeloid leukemia ; BM : bone marrow ; PB : peripheral blood ; WBC : white blood cell

Supplemental table 2. Main characteristics of the AML cell lines used in the current study.

Name	FAB	Cytogenetics	Molecular	References
MOLM 13	AML4 post MDS	MLL-AF9	FLT3-ITD ¹	Matsuo Y (leukemia 1997); Quentmeier (leukemia 2003)
MOLM 14	AML4 post MDS	MLL-AF9	FLT3-ITD ¹	Matsuo Y (leukemia 1997)
THP1	AML5 de novo	MLL-AF9	N-ras, p53 ³	Odero MD (genes chromosomes and cancer 2000)
MV4-11	biphenotypic	complex	FLT3-ITD (homozygous) ¹	Lange (Blood 1987)
HEL	AML6, de novo	complex	JAK2 V617F ²	Martin P (Science 1982); Quentmeier (leukemia 2006)
HL-60	AML2	MYC amplification	N-ras, CCND2 C238T ⁴ , p53 homozygous deletion ³	Ikediohi ON (mol cancer ther 2006) Collins (Nature 1977)
U937	AML5	t(10;11)(p14;q23)	p53 ³	Sunstrom C (int j cancer 1976)
KG1A	AML6	del(7)(q22q35)	p53 ³	Furley (blood 1986); Koefler (Blood 1980)
OCI-AML2	AML4	N/A	DNMT3A	Tiacci A (leukemia 2012)
OCI-AML3	AML4	N/A	DNMT3A, NPM1	Wang (Leukemia 1989)
K562	blast crisis CML	N/A	p53 ³ , Bcr-Abl b3-a2	Lozzio (J Natl Cancer Inst 1973)

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; ¹Quentmeier leukemia 2003; ²Quentmeier leukemia 2006; ³Sugimoto blood 1992 and Kojima blood 2005; ⁴Ikediohi mol cancer ther 2006.

Figure S1

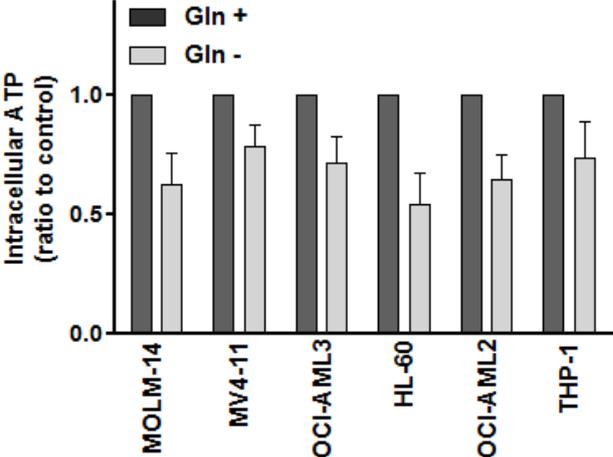


Figure S2

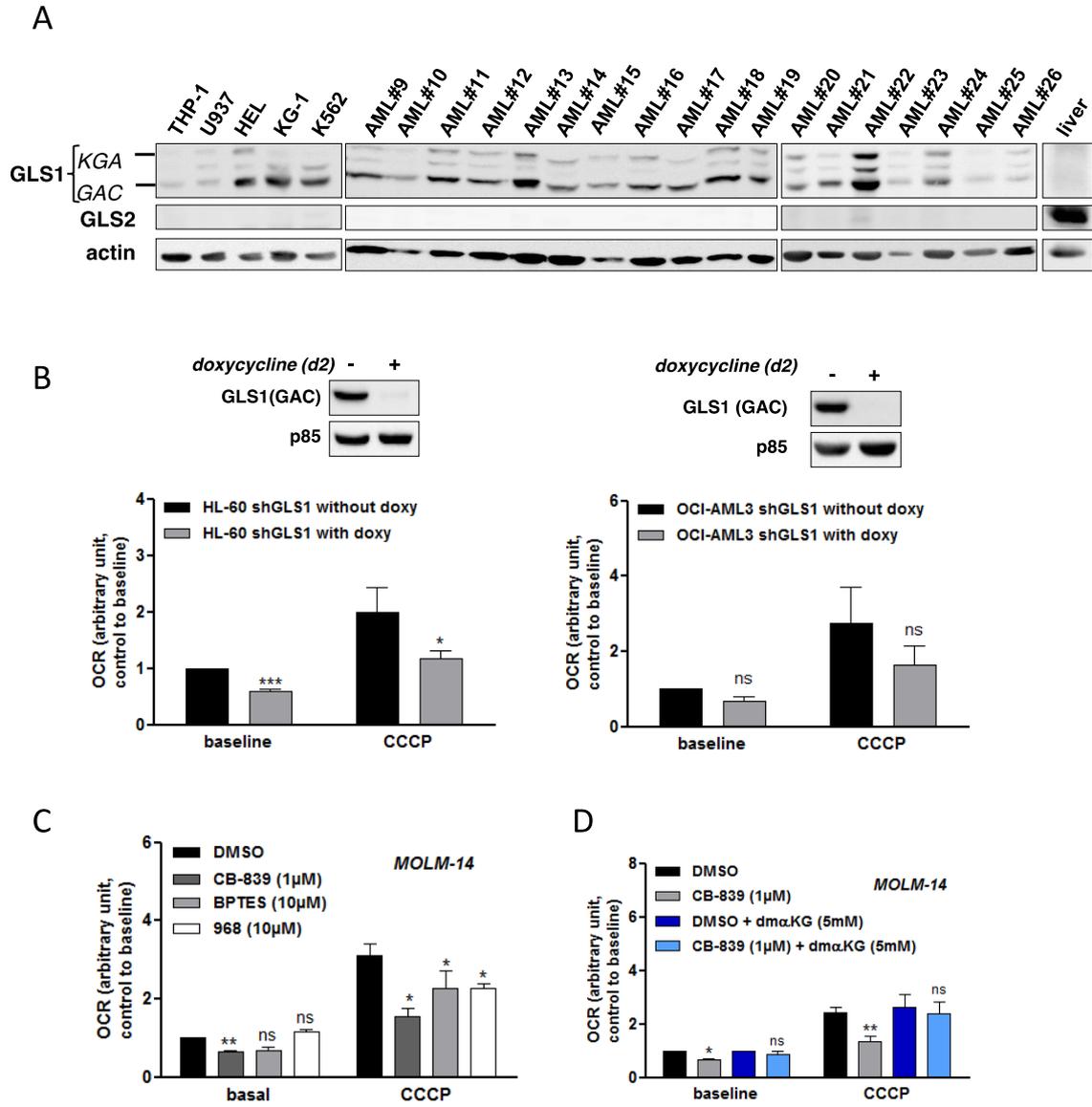
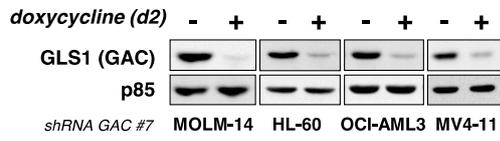
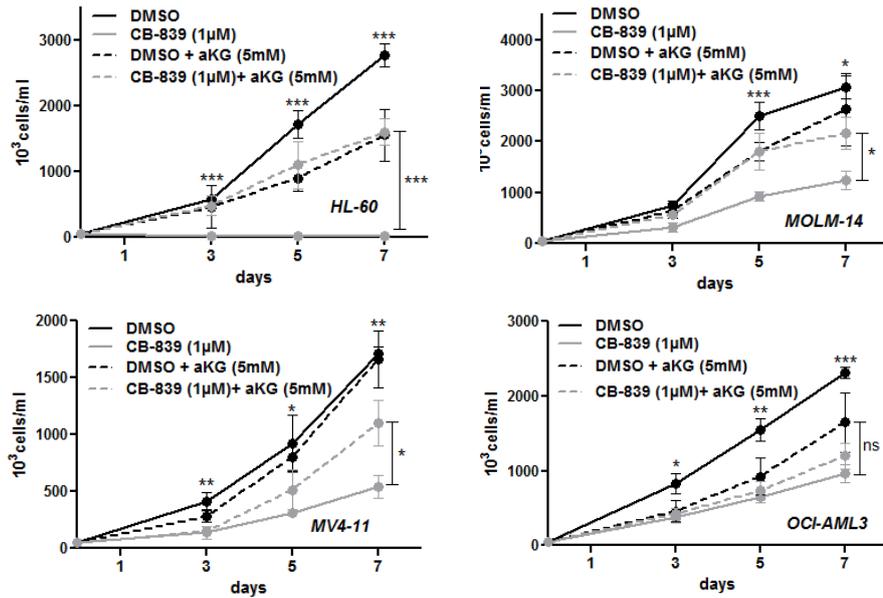


Figure S3

A



B



C

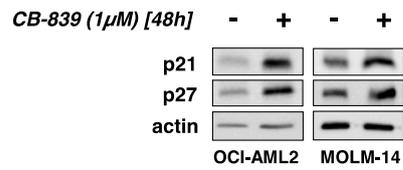


Figure S4

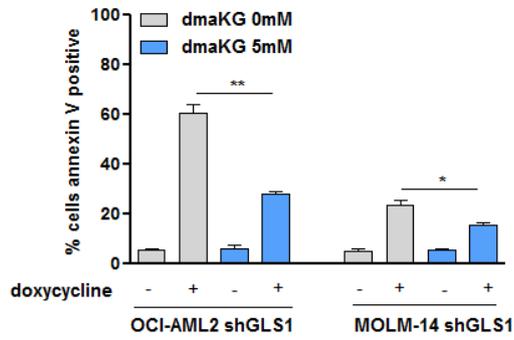
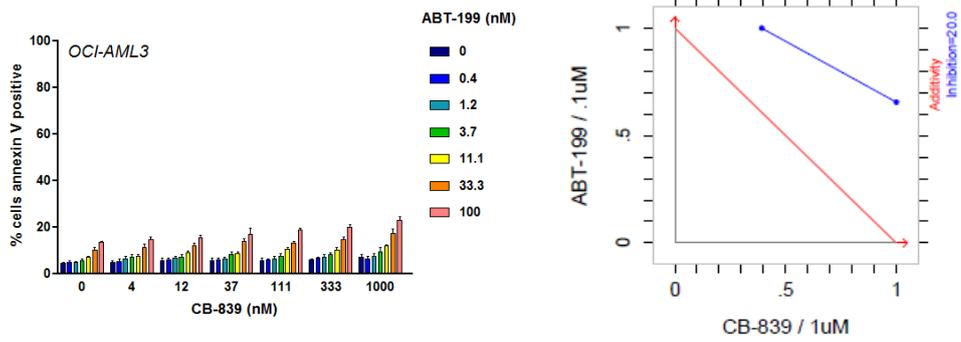


Figure S5



Supplemental Figure Legends

Figure S1

MOLM-14, MV4-11, OCI-AML3, HL-60, OCI-AML2 and THP-1 cell lines were cultured for 6 hours with or without Gln (4 mM). The intracellular ATP levels were then measured using the CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay.

Figure S2

A. Human leukemic cell lines, AML cells from 18 patients and human healthy liver cells were analyzed by WB using anti-GLS1, anti-GLS2 and anti-actin antibodies. **B.** HL-60 (left panel) and OCI-AML3 (right panel) cells were infected with a lentiviral vector expressing a doxycycline inducible GLS1 shRNA (#5). Stably infected cell lines were established under puromycin selection. After 2 days of doxycycline exposure, the O₂ consumption rate (OCR) was measured using the Seahorse XF96 extracellular flux analyzer, both under basal conditions and after the addition of CCCP, as indicated. The inhibition of GAC expression was controlled in WB using anti-GAC antibody. Histograms show the representation of 3 independent experiments. **C.** MOLM-14 cells were cultured with or without CB-839 (1µM), BPTES (10µM) or 968 (10µM) for 6 hours and the O₂ consumption rate (OCR) was measured using the Seahorse XF96 extracellular flux analyzer. Histograms show the representation of 3 independent experiments. **D.** MOLM-14 cells were cultured with or without CB-839 (1µM) and/or dmaKG (5mM) for 6 hours and the O₂ consumption rate (OCR) was measured using the Seahorse XF96 extracellular flux analyzer. Histograms show the representation of 3 independent experiments.

Figure S3

A. MOLM-14, HL-60, OCI-AML3 and MV4-11 cells infected with a lentiviral vector expressing a doxycycline inducible shGLS1#7 and stably infected cells were established under puromycin selection. After 2 days of doxycycline, protein extracts were immunoblotted with anti-GAC and p85 antibodies. **B.** HL-60, MV4-11, MOLM-14, and OCI-AML3 cells were seeded at 5×10^5 cells/ml with and without CB-839 (1µM) and dmaKG (5mM) and viable cells were counted following trypan blue staining at days 3, 5 and 7. **C.** OCI-AML2 and MOLM-14 cells were cultured 2 days with or without CB-839 (1µM) and protein extracts were immunoblotted with anti-p21, anti-p27 and anti-actin antibodies.

Figure S4

ShGLS1#5 was induced during 4 days in OCI-AML2 and MOLM-14 cells with or without dmaKG (5mM) and apoptosis was evaluated using annexin-V staining.

Figure S5

OCI-AML3 cells were cultured 1 day with or without the indicated doses of CB-839 and ABT-199 and apoptosis was evaluated using annexin-V staining. Synergy was evaluated using Chalice software.