

gement d'acide aminé) de PRAF2 ont été répertoriées dans les bases de données, notamment dans les régions d'interaction avec GB1 (domaines amino- et carboxy-terminaux de PRAF2), mais leurs conséquences fonctionnelles ou leurs relations avec une maladie n'ont pas encore été étudiées. PRAF2 est une protéine ubiquitaire. Elle régule vraisemblablement, par le même mécanisme de rétention, d'autres récepteurs couplés aux protéines G. Il est donc possible que cette protéine soit impliquée dans des maladies humaines associées à un mauvais adressage de récepteurs à la surface cellulaire. Elle représente, de ce fait, une nouvelle cible thérapeutique. ♦

**PRAF2, an endoplasmic reticulum gatekeeper, controls the cell-surface export of the GABA<sub>B</sub> receptor in neurons**

#### LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

## RÉFÉRENCES

- Achour L, Labbe-Jullic C, Scott MG, Marullo S. An escort for GPCRs: implications for regulation of receptor density at the cell surface. *Trends Pharmacol Sci* 2008 ; 29 : 528-35.
- Achour L, Scott MG, Shirvani H, et al. CD4-CCR5 interaction in intracellular compartments contributes to receptor expression at the cell surface. *Blood* 2009 ; 113 : 1938-47.
- Shirvani H, Achour L, Scott MG, et al. Evidence for internal stores of CCR5 in blood cells. *Blood* 2011 ; 118 : 1175-6.
- Conn PM, Ulloa-Aguirre A, Ito J, Janovick JA. G protein-coupled receptor trafficking in health and disease: lessons learned to prepare for therapeutic mutant rescue in vivo. *Pharmacol Rev* 2007 ; 59 : 225-50.
- Metherell LA, Chapple JP, Cooray S, et al. Mutations in MRAP, encoding a new interacting partner of the ACTH receptor, cause familial glucocorticoid deficiency type 2. *Nat Genet* 2005 ; 37 : 166-70.
- Bernier V, Bichet DG, Bouvier M. Pharmacological chaperone action on G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Pharmacol* 2004 ; 4 : 528-33.
- Mendre C, Mouillac B. Chaperons pharmacologiques. Un espoir thérapeutique pour les pathologies conformationnelles. *Med Sci (Paris)* 2010 ; 26 : 627-35.
- Marshall FH, Jones KA, Kaupmann K, Bettler B. GABA<sub>B</sub> receptors – the first 7TM heterodimers. *Trends Pharmacol Sci* 1999 ; 20 : 396-9.
- Couve A, Filippov AK, Connolly CN, et al. Intracellular retention of recombinant GABA<sub>B</sub> receptors. *J Biol Chem* 1998 ; 273 : 26361-7.
- Doly S, Shirvani H, Gáta G, et al. GABA<sub>B</sub> receptor cell-surface export is controlled by an endoplasmic reticulum gatekeeper. *Mol Psychiatry* 2015, June 2. doi: 10.1038/mp.2015.1072.
- Sivars U, Aivazian D, Pfeffer SR. Yip3 catalyses the dissociation of endosomal Rab-GDI complexes. *Nature* 2003 ; 425 : 856-9.
- Fenster SD, Chung WJ, Zhai R, et al. Piccolo, a presynaptic zinc finger protein structurally related to bassoon. *Neuron* 2000 ; 25 : 203-14.
- Lin CI, Orlov I, Ruggiero AM, et al. Modulation of the neuronal glutamate transporter EAAC1 by the interacting protein GTRAP3-18. *Nature* 2001 ; 410 : 84-8.
- Enoch MA, Baghal B, Yuan Q, Goldman D. A factor analysis of global GABAergic gene expression in human brain identifies specificity in response to chronic alcohol and cocaine exposure. *PLoS One* 2013 ; 8 : e64014.
- Schuler V, Luscher C, Blanchet C, et al. Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory, and loss of pre- and postsynaptic GABA(B) responses in mice lacking GABA(B[1]). *Neuron* 2001 ; 31 : 47-58.
- Mombereau C, Kaupmann K, Froestl W, et al. Genetic and pharmacological evidence of a role for GABA(B) receptors in the modulation of anxiety- and antidepressant-like behavior. *Neuropsychopharmacology* 2004 ; 29 : 1050-62.
- Galzi JL, Ilien B. Les récepteurs couplés aux protéines G. Des régulateurs allostériques du métabolisme cellulaire. *Med Sci (Paris)* 2012 ; 28 : 852-7.
- Guyon A. Le baclofène est un modulateur allostérique du récepteur CXCR4. *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 9-12.

## NOUVELLE

### Coactivation d'AMPK et de mTORC1

#### Exemple d'application thérapeutique de la létalité synthétique dans les leucémies aiguës myéloïdes

Jérôme Tamburini<sup>1</sup>, Laury Poulain<sup>1</sup>, Didier Bouscary<sup>1</sup>, Pierre Sujobert<sup>1,2</sup>

> Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) ont pour origine la transformation de cellules souches ou de progéniteurs hématopoïétiques. Il en résulte un blocage de la différenciation et une prolifération de cellules immatures (blastés) qui provoquent un déficit de l'hématopoïèse (anémie, thrombopénie et/ou neutropénie) et/ou un syndrome tumoral. Peu de progrès ont été réalisés dans la prise en

charge thérapeutique de ces maladies. Chez les sujets les plus jeunes, plusieurs chimiothérapies intensives sont associées et, lorsqu'un donneur compatible est identifié, une greffe de cellules souches hématopoïétiques est pratiquée. Dans la majorité des cas, l'âge du patient ou la présence de comorbidités contre-indiquent les chimiothérapies intensives, le traitement est alors palliatif.

<sup>1</sup>Inserm U1016, institut Cochin, 22, rue Méchain, 75014 Paris, France ; CNRS UMR8104, 75014 Paris, université Paris Descartes, faculté de médecine Sorbonne Paris Cité, 75005 Paris, France ; équipe labellisée ligue nationale contre le cancer (LNCC), 75013 Paris, France.

<sup>2</sup>Laboratoire d'hématologie, Hospices civils de Lyon, Université Claude Bernard, LBMC CNRS UMR 5239, 165, chemin du Grand Revoyet, 69495 Pierre-Bénite, France. [jerome.tamburini@inserm.fr](mailto:jerome.tamburini@inserm.fr) [pierre.sujobert@chu-lyon.fr](mailto:pierre.sujobert@chu-lyon.fr)

Les LAM sont caractérisées par une grande hétérogénéité moléculaire, cytogénétique et phénotypique, ce qui complique le développement de thérapies ciblées. Cependant, elles ont en commun l'activation constitutive de voies de signalisation oncogénique, qui représentent donc une cible thérapeutique potentielle. Notre laboratoire s'intéresse plus particulièrement au complexe mTORC1 (*mammalian*



*target of rapamycin complex 1*)<sup>1</sup>, qui favorise les processus anaboliques tels que la traduction protéique ou la biosynthèse nucléotidique [1]. L'activation de mTORC1 est finement régulée par des voies de signalisation oncogéniques ainsi que par la disponibilité en nutriments (acides aminés, glucose). À la différence de ce que l'on observe dans les cellules souches hématopoïétiques normales, le complexe mTORC1 est activé de manière constitutive dans les cellules leucémiques, sans que le mécanisme de cette activation ne soit élucidé [2]. Ceci a motivé l'utilisation d'inhibiteurs de mTORC1, comme la rapamycine ou ses dérivés, dans des stratégies thérapeutiques. Cependant, leurs effets antileucémiques se sont révélés décevants dans les essais cliniques [3].

Dans une étude précédente, nous avons testé une stratégie alternative d'inhibition de mTORC1, qui reposait sur l'activation indirecte de l'AMPK (*AMP-activated kinase*). L'AMPK est une kinase qui est activée, en cas de stress énergétique, par la fixation d'ADP (adénosine diphosphate) ou d'AMP (adénosine monophosphate) sur sa sous-unité régulatrice  $\gamma$ , et la phosphorylation de sa sous-unité catalytique  $\alpha$  par LKB1 (*liver kinase B1*) ou par la CAMKK (*calmodulin kinase kinase*). Une fois activée, l'AMPK inhibe les processus anaboliques comme la biosynthèse d'acides gras – via l'inhibition de l'acétylCoA carboxylase (ACC) – ou la traduction protéique – via l'inhibition de mTORC1. L'AMPK favorise également les processus cataboliques tels que l'oxydation des acides gras ou l'autophagie, permettant la restauration de l'homéostasie énergétique cellulaire. En utilisant la metformine, un antidiabétique qui inhibe la chaîne respiratoire mitochondriale [9] (→), nous avons démontré que l'axe LKB1/AMPK était fonctionnel dans les leucémies

(→) Voir la Synthèse de M. Foretz et B. Viollet, m/s n° 1, janvier 2014, page 82

aiguës myéloïdes et nous avons suggéré un potentiel effet anti-leucémique pour la metformine *in vivo* [4]. Cependant, si la metformine présente bien un effet cytotoxique sur les cellules tumorales, cette activité semble indépendante de l'activation de l'AMPK [5]. La question du potentiel thérapeutique de l'activation de l'AMPK dans les leucémies aiguës myéloïdes restait donc entière après cette étude.

### L'activation d'AMPK entraîne la mort des cellules leucémiques par autophagie

Dans une nouvelle étude, nous avons utilisé le GSK621, une nouvelle molécule de la classe des thiényridones (comme le composé A-769662) capable d'activer directement l'AMPK [6]. Ce composé active effectivement l'AMPK dans les cellules leucémiques. En effet, le GSK621 induit la phosphorylation de plusieurs substrats directs de l'AMPK, en particulier l'acétylCoA carboxylase (ACC). Nous avons également montré la spécificité du GSK621 pour sa cible (AMPK), ses effets cytotoxiques étant abolis lorsque le gène codant l'AMPK est invalidé (résultats obtenus dans des lignées de cellules leucémiques de LAM invalidées pour ce gène par le système CRISPR/Cas9 ainsi que par interférence ARN). Nous avons testé ce composé sur 20 lignées cellulaires ainsi que sur 16 échantillons primaires de LAM et nous avons constaté qu'il induisait l'apoptose des cellules (avec une concentration inhibitrice moyenne de 20  $\mu$ M de GSK621)<sup>2</sup>. Le traitement par GSK621 diminue également les capacités clonogéniques de cellules médullaires murines transformées par des oncogènes myéloïdes (MLL-ENL ou FLT3-ITD), suggérant une action du composé sur les progéniteurs les plus immatures de la maladie.

<sup>2</sup> L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, correspond à la mort des cellules en réponse à des signaux extérieurs (voie extrinsèque) ou à des signaux intracellulaires mitochondriaux (voie intrinsèque), qui convergent vers l'activation de cystéine protéases de la famille des caspases.

De manière intéressante, et si l'on envisage une utilisation clinique, nous n'avons pas observé de cytotoxicité induite par le GSK621 sur les progéniteurs hématopoïétiques CD34<sup>+</sup> normaux isolés de donneurs sains. Cette fenêtre thérapeutique a été confirmée *in vivo* chez la souris, puisque le traitement par GSK621 induit un effet anti-leucémique (dans un modèle de xénotransplantation d'une lignée de leucémie aiguë myéloïde) sans toxicité apparente, y compris sur l'hématopoïèse des animaux. En étudiant les mécanismes conduisant à la mort cellulaire induite par le GSK621, nous avons mis en évidence l'induction d'une autophagie<sup>3</sup> (→) qui contribue à la mort cellulaire. En effet,

(→) Voir la Nouvelle de L. Lamy, m/s n° 8-9, août-septembre 2013, page 685

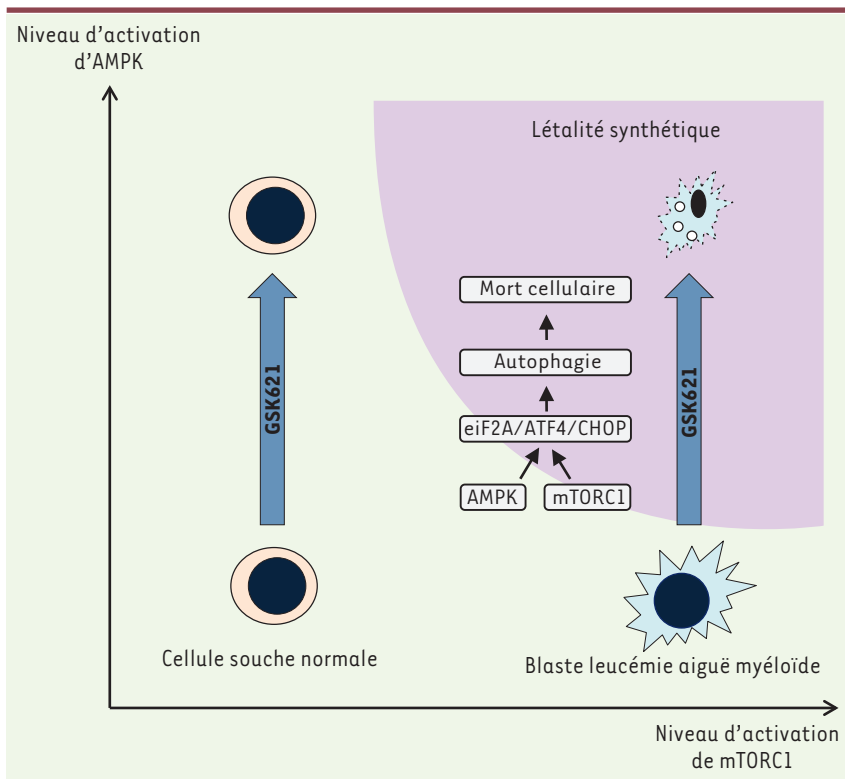
l'inhibition pharmacologique (par de la chloroquine) ou génétique (par interférence ARN ciblant ATG5 ou ATG7) du processus protège les cellules leucémiques de la cytotoxicité induite par le GSK621. Nous avons donc démontré que l'activation directe de l'AMPK par le GSK621 induit la mort cellulaire par autophagie des cellules leucémiques sans conséquence pour les cellules hématopoïétiques non transformées.

### La cytotoxicité du composé GSK621 implique une relation de létalité synthétique entre l'activation d'AMPK et de mTORC1

Notre première hypothèse pour expliquer les effets du composé GSK621 sur les cellules leucémiques, était que l'activation d'AMPK pouvait inhiber mTORC1, comme cela avait été décrit dans des modèles de cellules non transformées (lignée HEK293 par

<sup>3</sup> L'autophagie est un processus catabolique, qui correspond à la formation d'une vésicule à double membrane contenant des éléments du cytoplasme (autophagosome), et à l'adressage de ces vésicules aux lysosomes où leur contenu est dégradé. Les gènes impliqués dans ce processus (ATG pour *autophagy related genes*) sont très conservés parmi les eucaryotes, et l'invalidation de certains de ces gènes peut empêcher la formation des autophagosomes. La chloroquine bloque les étapes terminales de l'autophagie en inhibant l'acidification des lysosomes.

<sup>1</sup> mTORC1 est un complexe formé des protéines mTOR (une sérine/thréonine kinase), raptor, GβL et deptor.



**Figure 1. La spécificité du composé GSK621 sur les cellules leucémiques est gouvernée par une relation de létalité synthétique entre la coactivation d'AMPK et de mTORC1.** Le niveau d'activation de mTORC1 est représenté en abscisse, et le niveau d'activation d'AMPK en ordonnée. L'activation concomitante des deux voies converge vers l'activation de la voie eIF2 $\alpha$ /ATF4/CHOP, qui entraîne la mort cellulaire par autophagie : c'est le phénomène de létalité synthétique qui est à l'œuvre dans la zone mauve du graphique. Les cellules souches hématopoïétiques normales, n'ayant pas d'activation constitutive de mTORC1, ne peuvent entrer dans cette zone de létalité synthétique, et sont donc insensibles aux effets cytotoxiques du composé GSK621. Au contraire, les cellules de LAM, ayant une activation constitutive de mTORC1, entrent dans la zone de létalité synthétique après activation d'AMPK, ce qui explique l'effet thérapeutique du GSK621.

exemple). Une addiction oncogénique à mTORC1 conduirait ainsi à l'apoptose des cellules leucémiques après l'activation d'AMPK. Cette hypothèse n'a cependant pas été confirmée par l'expérimentation : à la différence de ce que nous avons pu observer dans des cellules non transformées, y compris dans les cellules hématopoïétiques normales CD34<sup>+</sup>, le complexe mTORC1 conserve son niveau d'activation après exposition au composé GSK621 dans les cellules de LAM.

Nous avons alors proposé une hypothèse alternative impliquant un phénomène de létalité synthé-

tique (Figure 1)<sup>4</sup> : le GSK621 serait toxique pour les cellules de LAM en raison d'une suractivation de mTORC1 dans ces cellules, en comparaison de ce qui est observé dans des cellules hématopoïétiques normales [2]. En accord avec cette hypothèse, nous avons constaté que l'inhibition

<sup>4</sup> Le concept de létalité synthétique provient de la génétique des levures. Deux gènes sont synthétiques létaux si l'inactivation de chaque gène est sans effet, alors que l'inhibition concomitante des deux gènes entraîne la mort cellulaire. Appliqué au cancer, ce concept propose qu'une thérapie ciblant le produit d'un gène donné sera active uniquement sur les cellules cancéreuses ayant une mutation d'un autre gène, comme c'est le cas notamment avec les inhibiteurs de PARP dans les cancers du sein ayant une mutation de BRCA1.

préalable de mTORC1 (pharmacologique par la rapamycine, ou génétique par interférence ARN visant les constituants du complexe mTORC1, raptor ou la kinase mTOR) protégeait les cellules de LAM des effets du composé GSK621, ainsi que de deux autres activateurs d'AMPK, les composés A-769662 et 991 [7]. Nous avons également observé que la suractivation de mTORC1, obtenue dans les cellules de LAM après l'inactivation par la méthode CRISPR/Cas9, du répresseur physiologique de mTORC1 (TSC [*tuberous sclerosis protein*] 2), et dans les cellules hématopoïétiques normales CD34<sup>+</sup> par l'expression d'une forme activée constitutivement de la kinase AKT, augmentait les effets cytotoxiques du composé GSK621. Dans ces deux situations, la rapamycine, qui inhibe mTORC1, protégeait les cellules des effets cytotoxiques du composé GSK621.

Pour comprendre le mécanisme moléculaire de cette interaction synthétique létale, nous avons réalisé une étude du profil d'expression génique d'une lignée de LAM, exposée soit au composé GSK621 seul, soit à l'association GSK621 et rapamycine. Cette analyse a suggéré que la voie du stress du réticulum endoplasmique pourrait constituer le support moléculaire de la létalité synthétique existant entre l'AMPK et mTORC1. Nous avons confirmé cette hypothèse en mettant en évidence dans les cellules de LAM une activation de la voie eIF2 $\alpha$  en réponse à l'activation d'AMPK. Dans notre modèle, le niveau d'activation de la voie eIF2 $\alpha$  par AMPK était dépendant du niveau d'activation de mTORC1. En aval d'eIF2 $\alpha$ , l'exposition au GSK621 induit l'expression des protéines pro-apoptotiques et pro-autophagiques, ATF4 (*activating transcription factor 4*) et CHOP (*CCAAT/enhancer-binding protein*), qui dépend directement du niveau d'activation de mTORC1. Finalement, nous avons démontré, par des méthodes pharmacologiques et génétiques ciblant des constituants de la voie eIF2 $\alpha$ /ATF4/CHOP, le rôle de cette voie dans la létalité synthétique entre AMPK et mTORC1.



## Addiction oncogénique et létalité synthétique : deux concepts complémentaires dans le traitement du cancer

Le développement des thérapies ciblées repose largement sur le concept d'addiction oncogénique qui prédit que les cellules cancéreuses seront particulièrement sensibles à un agent pharmacologique inhibant des voies oncogéniques indispensables à leur survie. Plusieurs exemples d'application clinique valident cette hypothèse, au premier rang desquels le traitement par l'imatinib des hémopathies (notamment la leucémie myéloïde chronique) ayant un gène de fusion *BCR-ABL* [11] (→) Voir la Synthèse (→). Néanmoins, l'efficacité clinique de ces thérapies ciblées est fréquemment limitée par l'émergence de clones résistants ayant restauré, par divers mécanismes, l'activation de la voie oncogénique ciblée. Ce problème pourrait être contourné grâce à l'identification de cibles synthétiques létales associées à l'activation d'un oncogène, puisque les clones résistants pourraient, théorique-

ment, conserver une sensibilité aux molécules agissant par ce mécanisme. Dans ce travail, nous avons identifié que l'activation de la voie oncogénique mTORC1 expliquait la sensibilité spécifique des cellules leucémiques à un activateur pharmacologique de l'AMPK, une protéine kinase impliquée dans la réponse au stress. Différentes voies cellulaires d'adaptation au stress pourraient ainsi représenter des cibles intéressantes pour des approches thérapeutiques reposant sur le concept de létalité synthétique [8]. ♦

### Co-activation of AMPK and mTORC1: a therapeutic application of synthetic lethality in acute myeloid leukemia

#### REMERCIEMENTS

Pierre Sujobert a été financé par un poste d'accueil Inserm, et par l'association pour la recherche sur le cancer (ARC).

#### LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

#### RÉFÉRENCES

1. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 2012; 149 : 274-93.

2. Tamburini J, Green AS, Bardet V, et al. Protein synthesis is resistant to rapamycin and constitutes a promising therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Blood* 2009; 114 : 1618-27.
3. Perl AE, Kasner MT, Tsai DE, et al. A phase I study of the mammalian target of rapamycin inhibitor sirolimus and MEC chemotherapy in relapsed and refractory acute myelogenous leukemia. *Clin. Cancer Res* 2009; 15 : 6732-9.
4. Green AS, Chapuis N, Maciel TT, et al. The LKB1/AMPK signaling pathway has tumor suppressor activity in acute myeloid leukemia through the repression of mTOR-dependent oncogenic mRNA translation. *Blood* 2010; 116 : 4262-73.
5. Shackelford DB, Abt E, Gerken L, et al. LKB1 inactivation dictates therapeutic response of non-small cell lung cancer to the metabolism drug phenformin. *Cancer Cell* 2013; 23 : 143-58.
6. Sujobert P, Poulain L, Paubelle E, et al. Co-activation of AMPK and mTORC1 induce cytotoxicity in acute myeloid leukemia. *Cell Rep* 2015; 11 : 1446-57.
7. Xiao B, Sanders MJ, Carmena D, et al. Structural basis of AMPK regulation by small molecule activators. *Nat Commun* 2013; 4 : 3017.
8. Solimini NL, Luo J, Elledge SJ. Non-oncogene addiction and the stress phenotype of cancer cells. *Cell* 2007; 130 : 986-8.
9. Foretz M, Viollet B. Les nouvelles promesses de la metformine : vers une meilleure compréhension de ses mécanismes d'action. *Med Sci (Paris)* 2014; 30 : 82-92.
10. Lamy L. Plasmocytes tumoraux et autophagie : une relation ambiguë. *Med Sci (Paris)* 2013; 29 : 685-7.
11. Chomel JC, Aggoune D, Sorel N, Turhan AG. Leucémie myéloïde chronique : un modèle de dialogue entre la cellule souche leucémique et la niche hématopoïétique. *Med Sci (Paris)* 2014; 30 : 452-62.

## Bon de commande

À retourner à EDK, 109, avenue Aristide Briand, 92541 Montrouge Cedex  
Tél. : 01 41 17 74 05 - Fax : 01 49 85 03 45 - E-mail : edk@edk.fr

NOM : ..... Prénom : .....

Adresse : .....

Code postal : ..... Ville : .....

Pays : .....

Fonction : .....

Je souhaite recevoir l'ouvrage **Hépatite B** : 54 € + 3 € de port = **57 € TTC** offre exceptionnelle réservée aux abonnés à m/s jusqu'au 31 décembre 2010

en ..... exemplaire, soit un total de ..... €

Par chèque, à l'ordre de **EDK**

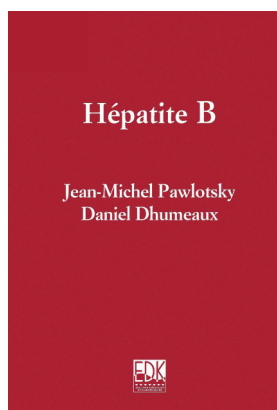
Par carte bancaire :  Visa  Eurocard/Mastercard

Carte n° | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Signature :

Date d'expiration : | | | | | | | |

N° de contrôle au dos de la carte : | | | | | | | |



ISBN : 978-2-8425-4131-6 576 pages



Tarifs d'abonnement m/s - 2015

**Abonnez-vous**  
à **médecine/sciences**

> Grâce à m/s, vivez en direct les progrès  
des sciences biologiques et médicales

Bulletin d'abonnement  
page 933 dans ce numéro de m/s

