

Université de Montréal

**Activation de la voie oncogénique mTOR par les formes
mutées de l'isocitrate déshydrogénase 1/2 retrouvées chez
les gliomes**

par

Mélissa Carbonneau

Département de biochimie et médecine moléculaire

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences (M.Sc.)
en biochimie
option génétique moléculaire

Juin, 2015

© Mélissa Carbonneau, 2015

Résumé

Une des caractéristiques principales des cellules cancéreuses est la reprogrammation de leur métabolisme énergétique. Des mutations d'enzymes impliquées dans différentes voies métaboliques sont récurrentes chez plusieurs tumeurs, contribuant ainsi à la dérégulation de ces cellules et à l'oncogénèse. C'est le cas de l'isocitrate déshydrogénase 1 (IDH1) et 2 (IDH2), responsables de la conversion de l'isocitrate en α -kétoglutarate dans le cycle de l'acide citrique. Ces enzymes sont fréquemment mutées chez les gliomes, acquérant ainsi la capacité de convertir l' α -kétoglutarate en 2-hydroxyglutarate (2HG), un oncométabolite inhibant les oxygénases α -kétoglutarate dépendantes parmi lesquelles figure notamment KDM4A, une déméthylase de lysines. À la recherche de nouvelles voies oncogéniques potentiellement régulées par les formes mutées de IDH1/2, nous avons initialement observé que les mutations de ces deux enzymes et de PTEN, un régulateur négatif de la voie mTOR, étaient mutuellement exclusives chez les gliomes. Ceci suggère que les mutations de IDH1/2 reproduiraient certains effets engendrés par les mutations de PTEN, créant ainsi un environnement oncogénique similaire. Nous avons observé que les formes mutées de IDH1/2 stimulent l'activation de mTOR grâce à la production et l'accumulation de 2HG. Cette activation repose en partie sur l'inhibition de KDM4A par cet oncométabolite. KDM4A est impliqué dans la stabilisation de DEPTOR, un inhibiteur de mTOR. Ainsi, l'inhibition de KDM4A par le 2HG entraîne la déstabilisation de DEPTOR et, par conséquent, l'activation de mTOR. Nos travaux ont donc permis l'identification d'un nouveau mécanisme oncogénique régulé par les formes mutées de IDH1/2 retrouvées chez les gliomes, soit l'activation de mTOR.

Mots-clés : Isocitrate déshydrogénase, 2-hydroxyglutarate, KDM4A, mTOR, DEPTOR, gliomes, glioblastomes, cancer, oncogène, métabolisme

Abstract

One hallmark of cancer cells is the reprogramming of their energy metabolism. Tumors often have mutations in the enzymes regulating the different metabolic pathways, which contribute to dysregulation of the cells and oncogenesis. Among these enzymes is the isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) and 2 (IDH2), converting isocitrate to α -ketoglutarate in the citric acid cycle. They are frequently mutated in gliomas, which alters their function. In fact, once mutated, IDH1/2 acquire the capacity to convert α -ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate (2HG), an oncometabolite inhibiting α -ketoglutarate dependant enzyme such as KDM4A, a lysine demethylase. Looking towards new oncogenic pathways potentially regulated by mutations of IDH1/2, we first observed that these mutations and mutations in PTEN, which is a negative regulator of the mTOR signaling pathway, are mutually exclusive in gliomas. This suggests that mutations of these enzymes could mimic some effects of PTEN mutations and thus create a similar oncogenic environment. We found that IDH1/2 mutations could activate the mTOR pathway through 2HG production and accumulation. This activation relies in part on KDM4A inhibition by the oncometabolite. KDM4A is involved in stabilizing DEPTOR, an mTOR inhibitor. Thus, KDM4A inhibition by 2HG leads to DEPTOR destabilisation, resulting in mTOR activation. Overall, this work defines mTOR activation as a new mechanism regulated by IDH1/2 mutations in gliomas.

Keywords : Isocitrate dehydrogenase, 2-hydroxyglutarate, KDM4A, mTOR, DEPTOR, gliomas, glioblastomas, cancer, oncogene, metabolism

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures.....	vii
Liste des abréviations.....	ix
Remerciements.....	xvi
Chapitre 1: Introduction	1
1. Altération du métabolisme chez les gliomes.....	1
1.1. Mutations d'enzymes du cycle de l'acide citrique chez les cellules cancéreuses.....	3
1.2. Mutations de l'isocitrate déshydrogénase.....	5
1.2.1. Altération des ratios de NADP+/NADPH.....	7
1.2.2. Production de 2-hydroxyglutarate.....	8
1.2.2.1. Régulation de HIF-1 α	10
1.2.2.2. Inhibition de la famille TET méthylcytosine déoxygénase.....	10
1.3. Déméthylases de la famille JUMONJI.....	11
1.3.1. Famille KDM4.....	14
1.3.1.1. KDM4A.....	15
1.3.1.1.1. <i>KDM4A et cancer</i>	17
1.4. Formes mutées de IDH1/2 comme cibles thérapeutiques.....	20
1.4.1. Inhibiteurs des formes mutées de IDH1/2.....	20
1.4.2. Vaccination contre les formes mutées de IDH1/2.....	20
2. Activation oncogénique de la voie mTOR chez les cellules tumorales.....	20
2.1. Kinase mTOR.....	21
2.2. Différents complexes formés par mTOR.....	22
2.2.1. DEPTOR.....	24

2.3. Mécanismes de régulation de la voie mTOR.....	25
2.3.1. Régulation de mTORC1	25
2.3.1.1. Facteurs de croissance.....	25
2.3.1.1.1. Voie PI3K/AKT	25
2.3.1.1.2. Voie Ras/ERK.....	27
2.3.1.2. Acides aminés	29
2.3.1.2.1. Régulation de RagA/B	30
2.3.1.2.2. Régulation de RagC/D	31
2.3.1.3. Niveaux énergétiques.....	31
2.3.1.4. p53.....	32
2.3.1.5. Voie Wnt.....	33
2.3.1.6. α -kétoglutarate et ATP synthase	33
2.3.2. Régulation de mTORC2	34
2.4. Processus cellulaires régulés par la voie mTOR.....	35
2.4.1. Processus cellulaires contrôlés par mTORC1.....	35
2.4.1.1. Synthèse protéique et croissance cellulaire.....	35
2.4.1.1.1. Initiation de la traduction	36
2.4.1.1.2. Élongation de la traduction	39
2.4.1.1.3. Protéine ribosomale S6	39
2.4.1.2. Biogénèse ribosomale	39
2.4.1.3. Synthèse lipidique	40
2.4.1.4. Synthèse de nucléotides	40
2.4.1.5. Autophagie.....	41
2.4.1.6. Angiogénèse.....	43
2.4.2. Processus cellulaires contrôlés par mTORC2.....	43
2.4.2.1. Survie cellulaire	43
2.4.2.2. Organisation du cytosquelette d'actine	44
2.5. mTOR comme cible thérapeutique	46
2.5.1. Rapamycin et rapalogues	46
2.5.2. Inhibiteurs de mTORC1/mTORC2/PI3K	47
2.5.3. Inhibiteurs de mTOR en thérapie combinée	47

2.5.4. Sensibilité aux inhibiteurs de mTOR	48
3. Hypothèse et objectifs de recherche	48
Chapitre 2: The oncometabolite 2-hydroxyglutarate activates the mTOR signaling pathway	50
Chapitre 3: Discussion	81
1. Exclusion mutuelle et co-occurrence des mutations de IDH1/2 et de différents suppresseurs tumoraux	81
2. Régulation de mTOR par le 2-hydroxyglutarate	82
3. Survie cellulaire et mutations de IDH1/2	82
4. Régulation de la voie mTOR par les oxygénases α -kétoglutarate dépendantes	83
5. Régulation transcriptionnelle de gènes impliqués dans la régulation de la voie mTOR par KDM4A	84
6. Interaction entre les complexes mTOR et KDM4A	85
6.1. Potentielle interaction entre les complexes mTOR et d'autres protéines associées aux processus de méthylation et déméthylation	86
7. Localisation de KDM4A et des différentes protéines constituant les complexes mTOR	87
7.1. Localisation cytoplasmique de KDM4A	87
7.2. Localisation nucléaire des complexes mTOR	88
7.2.1. Localisation nucléaire de DEPTOR	88
7.2.1.1. Interaction entre DEPTOR et H3	90
8. Mode d'interaction entre KDM4A et DEPTOR	92
9. Stabilisation de DEPTOR par KDM4A	96
Chapitre 4 : Conclusion	99
Bibliographie	100

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau I. Classification des gliomes	1
Tableau II. Fréquence des mutations de IDH1 chez différents types de gliomes.....	5
Tableau III. Inhibiteurs de JUMONJIs	18

Chapitre 2

Supplementary Table I. List of all siRNA Smart pools used in Fig. 2.2a.	80
--	----

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1.1. Évolution des glioblastomes.....	2
Figure 1.2. Cycle de l'acide citrique.....	4
Figure 1.3. Structure de IDH1/2	6
Figure 1.4. Mutations IDH1/2.....	8
Figure 1.5. Structures de l' α -kétoglutarate et du 2-hydroxyglutarate.....	8
Figure 1.6. Réaction de déméthylation de l'ADN générée par les TETs.	11
Figure 1.7. Réaction de déméthylation catalysée par les JUMONJIs.....	13
Figure 1.8. Famille de déméthylases KDM4.	14
Figure 1.9. Structure du 2,4-PDCA lié à KDM4A	19
Figure 1.10. Domaines de la kinase mTOR.....	22
Figure 1.11. Complexes mTORC1 et mTORC2.....	23
Figure 1.12. Voie PI3K/AKT.....	27
Figure 1.13. Modulation de l'activité mTORC1 par la voie Ras/ERK	28
Figure 1.14. Régulation de mTORC1 par les acides aminés	30
Figure 1.15. Stimulation de la traduction par mTORC1 grâce aux EJC.....	37
Figure 1.16. Régulation de l'activation de l'ARNm par mTORC1	38
Figure 1.17. Régulation de l'autophagie en fonction des niveaux de nutriments et d'énergie.	42

Chapitre 2

Figure 2.1. Activation of mTOR signaling by 2HG-producing IDH1/2 gain-of-function mutations.....	66
Figure 2.2. Targeted-siRNA screen reveals KDM4A as an α -KG-dependent enzyme modulating mTOR activity.	68
Figure 2.3. KDM4A interacts with the mTORC1/2 complex.....	69
Figure 2.4. KDM4A stabilizes DEPTOR, and functional implication of IDH1/2 mutations in central neuron system-derived cells.....	70
Supplementary Figure 2.1. 2HG stimulates mTOR kinase in HeLa cells.	72
Supplementary Figure 2.2. 2HG inhibits the KDM4A lysine demethylase.	72

Supplementary Figure 2.3. Protein levels of numerous regulators of mTOR signalling are not modulated by KDM4A.	73
Supplementary Figure 2.4. Co-Immunoprecipitation of KDM4A with mTORC1/2 complexes.	74
Supplementary Figure 2.5. Interaction between DEPTOR and KDM4A does not require mTOR or mSin1.....	75
Supplementary Figure 2.6. KDM4A localized to both cytoplasm and nucleus.....	77
Supplementary Figure 2.7. Frequent genomic loss and decreased mRNA levels of KDM4A in various types of cancer.....	79

Chapitre 3

Figure 3.1. Reconnaissance de DEPTOR par différents anticorps	89
Figure 3.2. Interaction entre DEPTOR et H3	91
Figure 3.3. Lysines de DEPTOR	92
Figure 3.4. Alignement de séquences entre les lysines de DEPTOR et les substrats connus de KDM4A	95
Figure 3.5. Alignement des lysines déméthylées et liées par KDM4A	96
Figure 3.6. Interaction entre KDM4A et β -TrCP.....	97

Liste des abréviations

2,4-PDCA : Pyridine 2-4-dicarboxylic acid

2HG : 2-hydroxyglutarate

4E-BP : eIF4E-Binding Protein

5caC : 5-carboxylcytosine

5fC : 5-formylcytosine

5hmC : 5-hydroxymethylcytosine

5mC : 5-methylcytosine

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AGC : Protein kinases A, G and C

ALYREF (REF) : Aly/REF export factor

AMP : Adenosine Monophosphate

AMPK : AMP-activated Protein Kinase

Apaf-1 : Apoptotic peptidase activating factor 1

APC : Adenomatous Polyposis Coli

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ARF : Alternative Reading Frame

ATG : Autophagy Related

ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated

ATP : Adénosine Triphosphate

ATR : Ataxia Telangiectasia- and RAD3-Related

Bax : BCL2-associated X protein

BBC3 : BCL2 binding component 3

BCL2L11 (Bim) : BCL2-Like 11

Bid : BH3 interacting domain death agonist

C : Cystéine

CAD : Gln-dependent carbamoyl-phosphate synthase, Asp carbamoyltransferase,

Dihydroorotase

CBS : Crystathionine- β -Synthase
Cdc42 : Cell division cycle 42
CDKN1A (p21) : Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
CDKN2A (INK4A) : Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 2A
CDKN2C (p18) : Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 2C
CDYL1: Chromodomain Y-Like protein 1
CHD5 : Chromodomain Helicase DNA-binding Domain 5
CK1 : Casein Kinase 1
CSB : Cockayne Syndrome group B protein
D-2-HGA : D-2-Hydroxyglutaric Aciduria
D2HGDH : D-2-hydroxyglutarate déshydrogénase
DEPDC5 : DEP domain-containing 5
DEPTOR : DEP-domain-containing mTOR-interacting protein
DMOG : Dimethyl N-oxalylglycine
DNA-PKcs : DNA-dependant Protein Kinase catalytic subunit
Dnmt : DNA (Cytosine-5) Methyltransferase
E : Acide Glutamique
eEF2 : eukaryotic Elongation Factor 2
eEF2K : eukaryotic Elongation Factor 2 Kinase
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
eIF : eukaryotic translation Initiation Factor
EJC : Exon Junction Complex
ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase
ETO : Étoposide
F : Phénylalanine
FasL : Fas Ligand
FAT : FRAP, ATM, TRAP
FDA : Food and Drug Administration
FIP200 : FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa
FKBP12 : FK504-Binding Protein of 12 kDa
FLCN : Folliculin

FNIP1 : Folliculin Interacting Protein 1
FOXO : Forkhead Box O
FRB : FKBP12-Rapamycin Binding domain
Gap : GTPase-activating protein
Gator : GAP Activity Toward Rag
GDP : Guanosine Diphosphate
GHB : γ -Hydroxybutyrate
GHS : Glutathione
GSK3 : Glycogen Synthase Kinase 3
GSSG : Glutathione disulfide
GTP : Guanosine Triphosphate
H : Histidine
HBXIP : Hepatitis B virus X-Interacting Protein
HEAT : Huntingtin, Elongation factor 3, a subunit of protein phosphatase 2A, TOR1
HIF : Hypoxia Inductible Factor
HOT : Hydroxyacid-Oxoacid Transhydrogenase
IDH : Isocitrate déshydrogénase
IGF-1 : Insulin-like Growth Factor 1
K : Lysine
KDM4 : Lysine K-specific demethylase 4
 α KG : α -Kétoglutarate
L-2-HGA : L-2-Hydroxyglutaric Aciduria
L2HGDH : L-2-hydroxyglutarate déshydrogénase
Lamp1 : Lysosomal-associated membrane protein 1
LAMTOR : Late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and mTOR activator
LCN2 (24p3) : Lipocalin 2
LKB1 : Liver Kinase B1
LSD : Lysine Specific Demethylase
LSR : Leucyl-tRNA Synthetase
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MAPKK : MAPK Kinase
MAPKKK : MAPK Kinase Kinase
MDM2 : Transformed 3T3 cell double minute 2
MEF : Mouse Embryonic Fibroblast
MEK : MAPK/ERK Kinase
Mios : Missing oocyte, meiosis regulator
mLST8 : mammalian Lethal with Sec13 protein 8
MP1 : MEK-binding Partner 1
mSin1 : mammalian SAPK Interacting protein 1
mTOR : mammalian/mechanistic Target of Rapamycin
mTORC : mTOR Complex
N : Asparagine
Nprl : Nitrogen permease regulator-like
p70S6K : 70 kDa ribosomal S6 Kinase
PABP : Poly(A)-Binding Protein
Parp : Poly-(ADP-ribose) polymerase
PDCD4 : Programmed Cell Death 4
PDH : Prolyl Hydroxylase
PDK1 : Phosphoinositide-Dependent protein Kinase 1
PH : Pleckstrin Homology
PHD : Plant Homeodomain
PI3K : Phosphatidylinositol 3 Kinase
PIKK : PI3K-related protein Kinase
PIP2 : Phosphatidylinositol-(4-5)-biPhosphate
PIP3 : Phosphatidylinositol-(3-4-5)-triPhosphate
PKB (AKT) : Protein Kinase B
PKC : Protein Kinase C
PMAIP1 (Noxa) : Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1
PML : Promyelocytic leukemia
PP2A : Protein Phosphatase 2A
PPP : Pentose Phosphate Pathway

PPRP : 5'-phosphoribosyl-1'-pyrophosphate
PRAS40 : Proline-Rich AKT Substrate 40 kDa
Protor : Protein observed with Rictor
PTEN : Phosphatase and TENsin homolog
Q : Glutamine
R : Arginine
Rac : Ras-related C3 botulinum toxin substrate
Raf : Rapidly accelerated fibrosarcoma
Rag : Ras-related GTP binding protein
Raptor : Regulatory-Associated Protein of mTOR
Ras : Rat Sarcoma
Rb : Retinoblastoma
RBM8A (Y14) : RNA binding motif protein 8A
REDD1 : Regulated in Development and DNA damage response 1
Rheb : Ras homolog enriched in brain
Rho : Ras homolog family member
Rictor : Rapamycin-insensitive companion of mTOR
RNF : Ring Finger Protein
RNPS1 : RNA binding Protein S1
ROS : Reactive Oxygen Species
RRP : Ribosomal RNA Processing
RSK : p90 Ribosomal S6-Kinase
S : Sérine
S6 : 40S ribosomal protein S6
Sec13 : GTPase-activating protein SEC13
Seh1L : SEH1-like
SERPINE1 (PAI-1) : Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1
SGK1 : Serum/Glucocorticoid Regulated Kinase 1
shRNA : small hairpin RNA
siRNA : small interfering RNA

SKAR : S6K1 Aly/REF-like substrate
SLC38A9 : Solute Carrier family 38 member 9
SMG1 : Suppressor with Morphological effect on Genitalia family member
SREBP : Sterol Regulatory Element Binding Protein
SRRM1 (Srm160) : Serine/Arginine Repetitive Matrix 1
SSA : Succinic Semialdehyde
SUV39h : Suppressor of Variegation 3-9 homolog
T : Thréonine
TBC1D7 : Tre2-Bub2-Cdc16 (TBC) 1 domain family member 7
TET : Ten-Eleven Translocation
TFEB : Transcription Factor EB
TOP : Terminal Oligopyrimidine Tract
TOR : Target of Rapamycin
TP53 (p53) : Tumor protein p53
TP53BP1 (53BP1) : Tumor protein p53 binding protein 1
 β TrCP : β -Transducin repeat-Containing Protein
TRRAP : Transformation/transcription domain-associated protein
TSC : Tuberous Sclerosis
ULK : Unc-51 Like autophagy activating Kinase
UTR : UnTranslated Region
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VHL : Von Hippel-Lindau
W : Tryptophane
WDR : WD Repeat domain
WHO : World Health Organisation
WIZ : Widely Interspaced Zinc finger motifs protein
Wnt : Wntless-type MMTV integration site family
WT : Wild Type
Y : Tyrosine

À Roger et Hélène

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le docteur Frédérick A. Mallette de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire pour la durée de ma maîtrise. Ton enthousiasme face au projet était contagieux et évoluer à tes côtés fut extrêmement enrichissant. Merci de m'avoir encadrée en me laissant néanmoins certaines libertés. Nos très nombreuses discussions resteront gravées dans ma mémoire!

Je tiens également à remercier Marie-Anne Germain, qui m'a formée et aidée tout au long de ce projet. Je remercie aussi tous les autres membres du laboratoire que j'ai eu l'occasion de côtoyer : Alena Motorina, Marie-Eve Lalonde, Mathieu Neault, Florence Couteau. Vous m'avez tous aidée d'une manière ou d'une autre et je vous en suis extrêmement reconnaissante. Un merci tout particulier à Alena et Marie-Anne, grâce à qui je pars avec de nombreux bons moments en souvenir. Merci énormément pour votre support et votre amitié!

Je remercie les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer ce mémoire.

Je tiens également à remercier mes parents, Roger Carbonneau et Hélène Jacques, pour leur soutien constant tout au long de mes études. Sans vous, rien de tout cela n'aurait été possible! Merci également à ma sœur, Caporal Carbonneau, toujours présente pour me remonter le moral lorsque le besoin s'en faisait ressentir. Cette dernière année n'aura pas été facile, mais nous en serons venues à bout malgré tout!

Finalement, un merci tout spécial à Sébastien Wall-Lacelle. De nombreuses épreuves sont survenues durant ma maîtrise, mais tu as toujours été à mes côtés pour les surmonter. Merci infiniment pour ton soutien et ton optimisme constant!

Chapitre 1: Introduction

1. Altération du métabolisme chez les gliomes

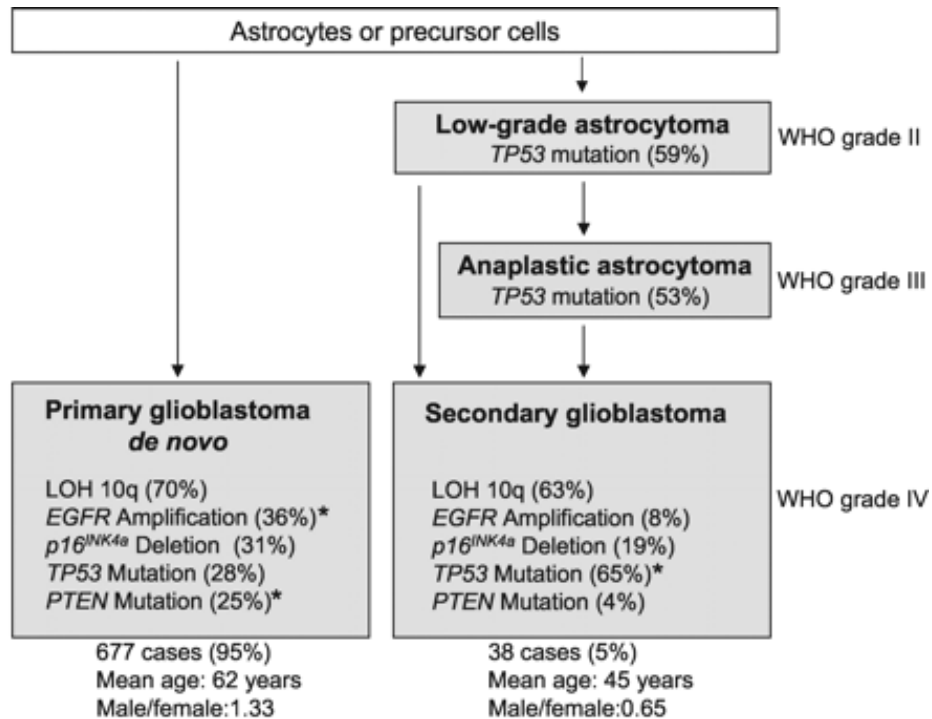
Les gliomes constituent environ 70% des tumeurs du cerveau (Ohgaki, 2009). Ce sont des tumeurs dérivées d'astrocytes et/ou d'oligodendrocytes qui sont classifiées en quatre grades selon la classification établie par l'Organisation Mondiale de la Santé (WHO) (Tableau I). Les gliomes de grade I sont généralement bénins alors que les gliomes de grade II et III ont pour leur part tendance à évoluer vers des gliomes de grade IV, qui sont quant à eux les gliomes les plus malins et qui présentent un très mauvais pronostic. Parmi les gliomes de grade IV, on retrouve notamment les glioblastomes primaires et secondaires. Bien qu'aucune différence ne soit histologiquement observable entre ces deux types de glioblastomes, différentes mutations sont favorisées lors du processus de carcinogénèse (Figure 1.1) (Ohgaki et al., 2004).

Tableau I. Classification des gliomes

Brain Cancer Type	WHO grade			
	I	II	III	IV
Astrocytic Tumors				
Pilocytic Astrocytoma	X			
Subependymal Giant Cell Astrocytoma	X			
Pleomorphic Xanthoastrocytoma		X		
Diffuse Astrocytoma		X		
Anaplastic Astrocytoma			X	
Glioblastoma (Primary or Secondary)				X
Giant Cell Glioblastoma				X
Gliosarcoma				X
Oligodendroglial Tumors				
Oligodendroglioma	X			
Anaplastic Oligodendroglioma		X		
Oligoastrocytic Tumors				
Oligoastrocytoma		X		
Anaplastic Oligoastrocytoma			X	

Tiré de Dang L. *et al*, Trends in Molecular Medicine, 2010, 16(9) :387-97

Les glioblastomes primaires ne sont précédés d'aucun signe de gliomes de grade inférieur alors que les glioblastomes secondaires proviennent généralement de gliomes de grade II ou III ayant évolué (Dang et al., 2010).



Tiré de Ohgaki H. et al, Cancer Research, 2004, 64(19) :6892-9

Figure 1.1. Évolution des glioblastomes

Les amplifications de EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) de même que les mutations de PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) sont plus fréquemment observées chez les glioblastomes primaires que secondaires alors que les mutations de TP53 sont pour leur part plus fréquentes chez les glioblastomes secondaires (Ohgaki et al., 2004). En ce qui concerne les mutations de l'isocitrate déshydrogénase 1 (IDH1) et 2 (IDH2), elles sont pour leur part retrouvées chez 5% des glioblastomes primaires et 83% des glioblastomes secondaires (Schaap et al., 2013).

Les mutations permettant la carcinogénèse varient d'une tumeur à une autre. Ces mutations ont pour effet de favoriser la croissance débridée des cellules tumorales tout en les protégeant de l'apoptose indépendamment des signaux contrôlant normalement ces processus (Hanahan and Weinberg, 2000). Les mutations acquises par les cellules cancéreuses leur

permettent également de promouvoir l'angiogénèse et d'induire les phénomènes d'invasion et de métastase (Hanahan and Weinberg, 2000). Une autre caractéristique principale des cellules tumorales est la reprogrammation de leur métabolisme énergétique (Hanahan and Weinberg, 2011). Malgré le fait que cette dernière caractéristique fut mise en évidence par Otto Warburg il y a environ six décennies (Warburg, 1956), ce n'est que récemment que de nombreuses études ont commencé à caractériser ce phénomène. Otto Warburg avait initialement observé que, bien que la présence d'oxygène favorise normalement l'utilisation du cycle de l'acide citrique chez les cellules saines, les cellules cancéreuses favorisaient pour leur part la glycolyse aérobie à la phosphorylation oxydative (Warburg, 1956). Ce phénomène, connu sous le nom de «effet Warburg», était initialement considéré comme une conséquence résultant de la carcinogénèse. Or, l'identification de mutations au niveau d'enzymes impliquées dans le cycle de l'acide citrique a permis de remettre en perspective la contribution de l'altération du métabolisme au mécanisme de carcinogénèse.

1.1. Mutations d'enzymes du cycle de l'acide citrique chez les cellules cancéreuses

Parmi les enzymes du cycle de l'acide citrique fréquemment mutées chez les cellules cancéreuses on retrouve notamment la succinate déshydrogénase, la fumarase et l'isocitrate déshydrogénase (Figure 1.2) (Tomlinson et al., 2002, Gimm et al., 2000, Baysal et al., 2002, Parsons et al., 2008). Les mutations de la fumarase prédisposent notamment aux léiomyomes utérins et cutanés de même qu'au cancer rénal (Tomlinson et al., 2002). Les mutations de la succinate déshydrogénase ont pour leur part été observées chez les paragangliomes retrouvés au niveau de la tête et du cou de même que chez les phéochromocytomes (Baysal et al., 2002, Gimm et al., 2000).

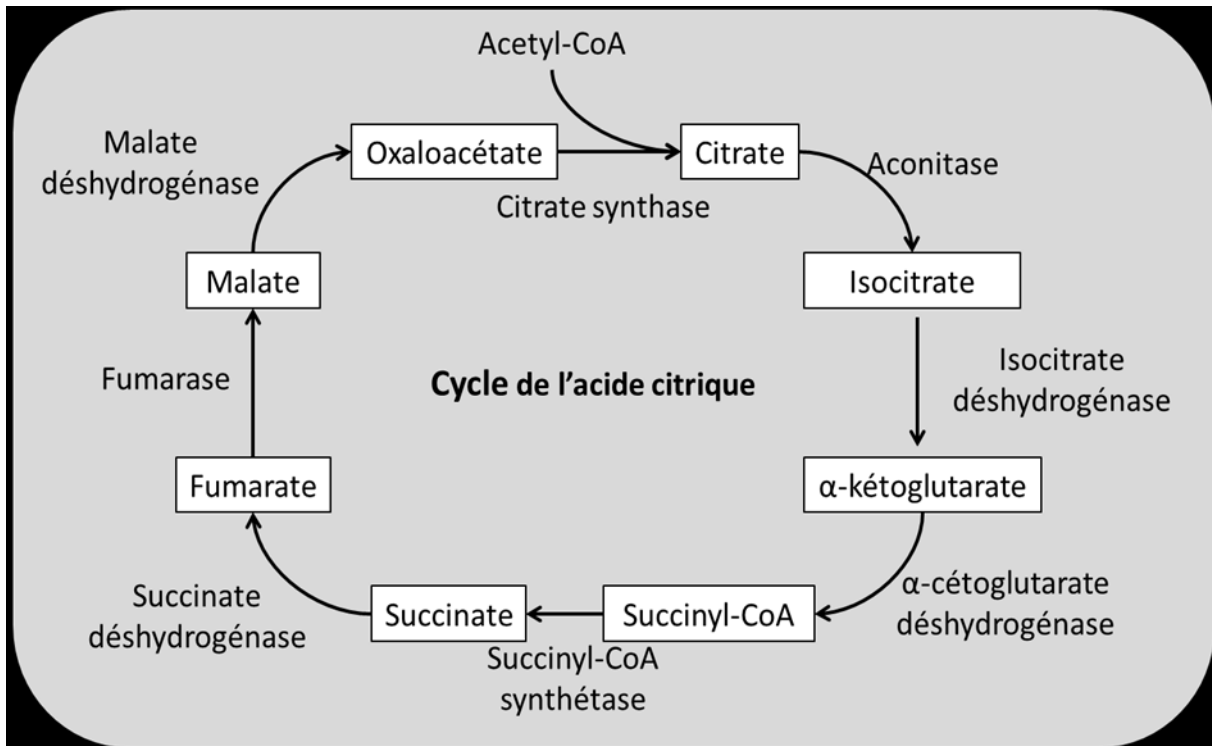
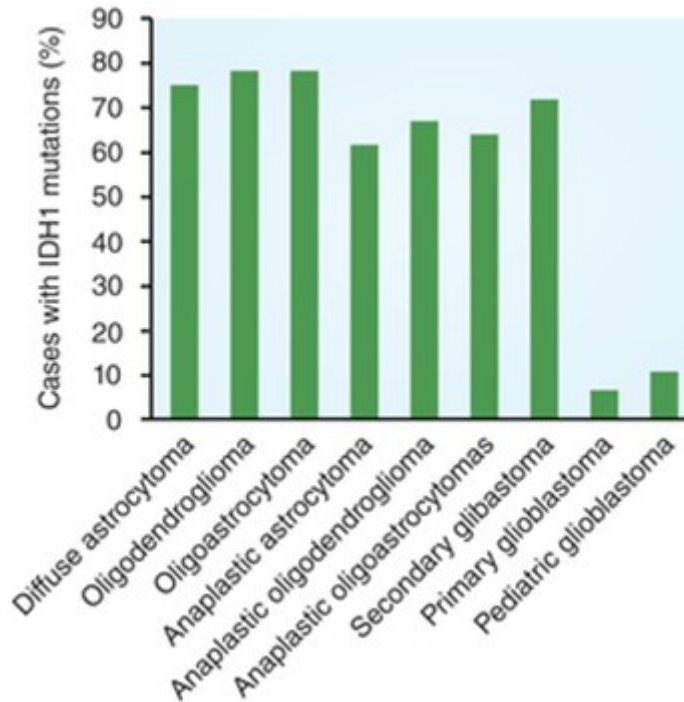


Figure 1.2. Cycle de l'acide citrique

L'acétyl-CoA utilisé pour le cycle de l'acide citrique, qui permet la production d'ATP, provient de la décarboxylation du pyruvate par la pyruvate déshydrogénase (Patel and Korotchkina, 2006). Cependant, les cellules tumorales n'utilisent pratiquement pas ce mécanisme de production d'ATP, favorisant plutôt la glycolyse comme principale source d'énergie (Warburg, 1956).

Les mutations de IDH1 sont quant à elles retrouvées chez environ 80% des gliomes de grade 2 et 3 et des glioblastomes multiformes secondaires (Tableau II) (Balss et al., 2008, Bleeker et al., 2009, Hartmann et al., 2009, Kang et al., 2009, Sanson et al., 2009, Watanabe et al., 2009, Yan et al., 2009). Des mutations au niveau de IDH2 surviennent également chez les gliomes, mais moins fréquemment que celles de IDH1 (Hartmann et al., 2009, Yan et al., 2009, Sonoda et al., 2009).

Tableau II. Fréquence des mutations de IDH1 chez différents types de gliomes.



Tiré de Williams S.C., Nature Medecine, 2013, 19(5) :514

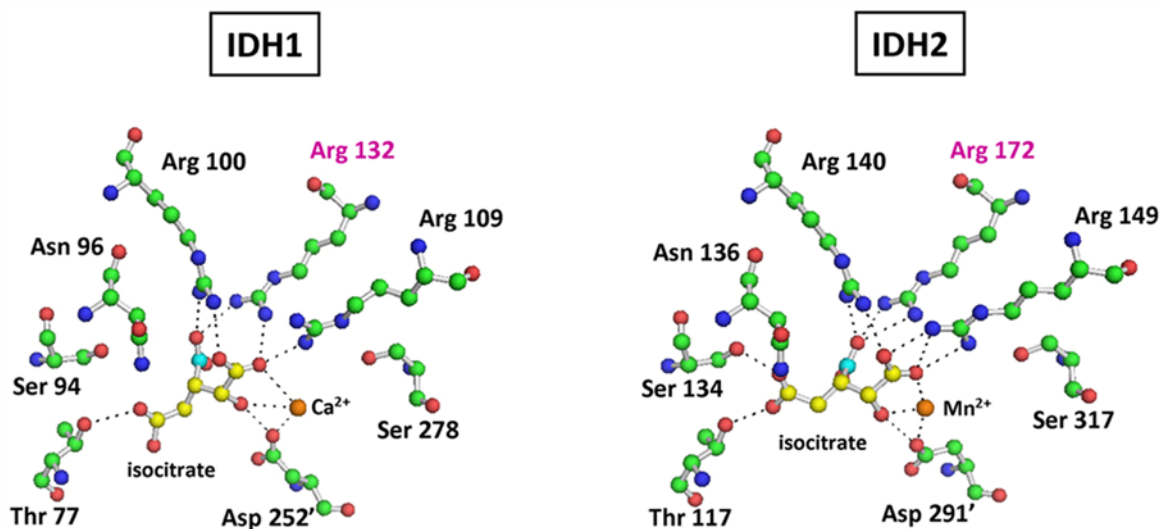
Les mutations de IDH1 sont rares chez les glioblastomes primaires de même que chez les glioblastomes pédiatriques (Williams, 2013).

Les mutations de IDH1/2 sont également présentes chez d'autres types de néoplasies. En effet, ces mutations sont retrouvées chez 15-30% des leucémies myéloïdes aiguës (Mardis et al., 2009, Marcucci et al., 2010, Paschka et al., 2010, Wagner et al., 2010, Ward et al., 2010), 56% des chondrosarcomes (Amary et al., 2011), 87% des enchondromes, 70% des hémangiomes (Pansuriya et al., 2011) et 22-28% des cholangiocarcinomes d'origine intrahépatique (Borger et al., 2012, Kipp et al., 2012). Les mutations de IDH1/2 sont également retrouvées moins fréquemment chez les cancers colorectaux (Sjoblom et al., 2006), les carcinomes de la prostate de même que les leucémies aiguës lymphoblastiques B (Kang et al., 2009).

1.2. Mutations de l'isocitrate déshydrogénase

Dans le cycle de l'acide citrique, l'isocitrate déshydrogénase est responsable de la décarboxylation de l'isocitrate en α -kétoglutarate (Henderson, 1968, Jennings et al., 1994). On

retrouve trois isoformes d'isocitrate déshydrogénase, soit IDH1, IDH2 et IDH3. Alors que IDH2 et IDH3 sont retrouvées au niveau des mitochondries, IDH1 est pour sa part localisé dans le cytosol (Yamamoto, 1969). IDH1 et IDH2 fonctionnent sous forme d'homodimères et requièrent du NADP⁺ afin de catalyser la conversion d'isocitrate en α -kétooglutarate alors que IDH3 fonctionne plutôt sous forme d'hétérotétramère et requiert du NAD⁺ (Yamamoto, 1969). Les mutations de ces enzymes chez les cellules cancéreuses surviennent toujours au niveau des mêmes acides aminés, soit l'arginine 132 pour IDH1 et les arginines 140 ou 172 pour IDH2 (Figure 1.3) (Parsons et al., 2008, Yan et al., 2009, Ward et al., 2010). L'arginine 132 de IDH1 et l'arginine 172 de IDH2 sont en fait les deux seuls acides aminés permettant la formation de trois liens hydrogène avec l'isocitrate, contrairement aux autres acides aminés responsables de la liaison de l'isocitrate qui ne forment que 2 liens hydrogène ou moins (Zhao et al., 2009). En ce qui concerne les arginines 100 de IDH1 et 140 de IDH2, elles permettent de stabiliser le groupement β -carboxyl de l'isocitrate (Ward et al., 2012). Ces mutations entraînent une modification fonctionnelle de IDH1/2, puisque ces enzymes sont alors incapables de lier l'isocitrate, ne pouvant ainsi plus convertir l'isocitrate en α -kétooglutarate (Zhao et al., 2009). Cependant, on retrouve toujours une copie de IDH1/2 de type sauvage chez les cellules cancéreuses, car les mutations de IDH1/2 sont généralement hétérozygotes (Ward et al., 2010).



Tiré de Ward S.P. *et al*, Cancer Cell, 2010, 17(3) :225-34

Figure 1.3. Structure de IDH1/2

Au niveau structural, l'arginine 132 de IDH1 est équivalente à l'arginine 172 de IDH2 alors que l'arginine 100 de IDH1 est équivalente à l'arginine 140 de IDH2 (Ward et al., 2010).

1.2.1. Altération des ratios de NADP⁺/NADPH

L'augmentation des niveaux de ROS (Reactive Oxygen Species) peut endommager l'ADN et ainsi promouvoir l'acquisition de mutations (Wiseman and Halliwell, 1996). C'est pourquoi on retrouve de nombreux antioxydants chez les cellules, dont le plus abondant est le glutathione (GSH) (Meister, 1983). La réduction du glutathione disulfide (GSSG) en GSH par la glutathione réductase requiert du NADPH (Rall and Lehninger, 1952). En plus d'être nécessaire à la réduction du GSSG (Koehler and Van Noorden, 2003), le NADPH est requis pour la réduction des thiorédoxines (Holmgren and Lu, 2010) et est impliqué dans la formation de tétramères catalases actifs (Salvemini et al., 1999) de même que dans l'activité du cytochrome P450 (Koehler and Van Noorden, 2003, Van Noorden and Butcher, 1986). Or, chez les cellules cancéreuses présentant une mutation de IDH1/2, les niveaux intracellulaires de NADPH sont diminués (Oizel et al., 2015). En effet, chez ces cellules, une réaction inverse est catalysée, convertissant le NADPH en NADP⁺ (Figure 1.4) (Dang et al., 2009). Ainsi, non seulement les formes mutées de IDH1/2 cessent la production de NADPH, mais elles consomment le NADPH pouvant encore être généré par les formes sauvages de IDH1/2. Les niveaux intracellulaires de NADPH se trouvent donc considérablement diminués chez ces cellules, entraînant notamment une résistance à l'apoptose normalement induite par l'étoposide (ETO) (Oizel et al., 2015).

L'ETO est un inhibiteur de la topoisomérase-II utilisé pour le traitement de divers types de tumeurs (Hande, 1998). Le métabolisme de l'ETO implique l'enzyme cytochrome P450 réductase, qui utilise du NADPH comme cofacteur et qui requiert une mitochondrie fonctionnelle (Kulawiec et al., 2009). Ainsi, la diminution des ratios de NADPH de même que l'altération du métabolisme confèrent aux cellules possédant une mutation de IDH1/2 une résistance à l'apoptose normalement induite par l'ETO (Oizel et al., 2015, Grassian et al., 2014). La présence d'une mutation de IDH1/2 permet donc de prédire la réponse d'un patient à certains traitements et, par conséquent, d'orienter sa thérapie.

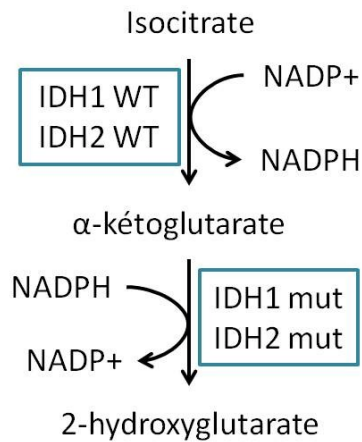


Figure 1.4. Mutations IDH1/2

Les mutations de IDH1/2 étant généralement hétérozygotes, les réactions catalysées par les formes sauvages et mutées de IDH1/2 ont lieu au sein des mêmes cellules (Ward et al., 2010).

1.2.2. Production de 2-hydroxyglutarate

Les mutations de IDH1 et IDH2 entraînent un gain de fonction. En effet, bien qu'incapables de convertir l'isocitrate en α-kétoglutarate, ces enzymes acquièrent la capacité de catalyser la formation de 2-hydroxyglutarate (2HG) à partir d'α-kétoglutarate (Figure 4) (Dang et al., 2009). Ainsi, chez les gliomes possédant une mutation de IDH1/2, on observe une accumulation de 2HG (Dang et al., 2009). Un allèle encodant la forme sauvage de IDH1/2 est nécessaire à la production de 2HG puisque les niveaux de 2HG chutent drastiquement lorsqu'il y a mutation au niveau des deux allèles encodant IDH1/2 (Jin et al., 2013). Le 2HG est en mesure de lier les oxygénases α-kétoglutarate-dépendantes et de les inhiber (Figure 1.5) (Chowdhury et al., 2011). Il existe deux énantiomères de 2HG (D-2HG et L-2HG) et seul le D-2HG est généré par les formes mutées de IDH1/2 (Dang et al., 2009).

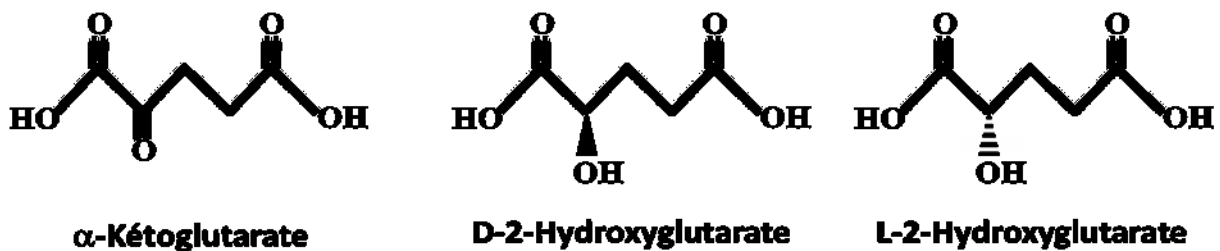


Figure 1.5. Structures de l'α-kétoglutarate et du 2-hydroxyglutarate

La similarité entre l' α -kétoglutarate et le 2HG permet d'expliquer que le 2HG soit en mesure de lier les oxygénases α -kétoglutarate-dépendantes (Chowdhury et al., 2011).

Le 2HG n'est cependant pas retrouvé uniquement chez les cellules présentant une mutation de IDH1/2. En effet, la conversion de GHB (γ -hydroxybutyrate) en SSA (succinic semialdehyde) par la transhydrogénase hydroxyacide-oxoacide (HOT) est couplée à la conversion de l' α -kétoglutarate en D-2HG (Struys et al., 2005). Pour ce qui est du L-2HG, la conversion du L-malate en oxaloacétate catalysée par la L-malate déshydrogénase au niveau du cycle de l'acide citrique est couplée à la conversion de l' α -kétoglutarate en L-2HG (Rzem et al., 2007). Afin d'éviter que le 2HG ainsi généré ne s'accumule, le D-2HG et le L-2HG sont reconvertis en α -kétoglutarate par la D-2-hydroxyglutarate déshydrogénase (D2HGDH) et la L-2-hydroxyglutarate déshydrogénase (L2HGDH) respectivement (Achouri et al., 2004, Rzem et al., 2004, Topcu et al., 2004). Des mutations au niveau de ces enzymes peuvent entraîner une acidurie 2-hydroxyglutarique. On retrouve trois types d'aciduries 2-hydroxyglutariques classées selon le métabolite produit, soit l'acidurie L-2-hydroxyglutarique (L-2-HGA) (Duran et al., 1980), l'acidurie D-2-hydroxyglutarique (D-2-HGA) (Chalmers et al., 1980) de même que l'acidurie combinée D,L-2-hydroxyglutarique (D,L-2-HGA) (Muntau et al., 2000).

Chez les cellules cancéreuses possédant une mutation de IDH2, la surexpression de la D2HGDH permet d'éliminer le 2HG normalement accumulé (Ma et al., 2015). En revanche, chez les cellules tumorales présentant une mutation de IDH1, la surexpression de la D2HGDH permet de réduire les niveaux de 2HG sans toutefois être en mesure d'éliminer complètement cet oncométabolite (Ma et al., 2015). La D2HGDH étant retrouvée au niveau de la mitochondrie, il est possible qu'elle soit plus efficace dans les cas où IDH2 est muté puisque, cette enzyme étant mitochondriale, le 2HG est généré dans la mitochondrie, étant ainsi plus facilement accessible pour la D2HGDH (Ma et al., 2015). Dans les deux cas, la surexpression de la D2HGDH permet de restaurer l'activité des différentes oxygénases α -kétoglutarate-dépendantes généralement inhibée par le 2HG (Ma et al., 2015).

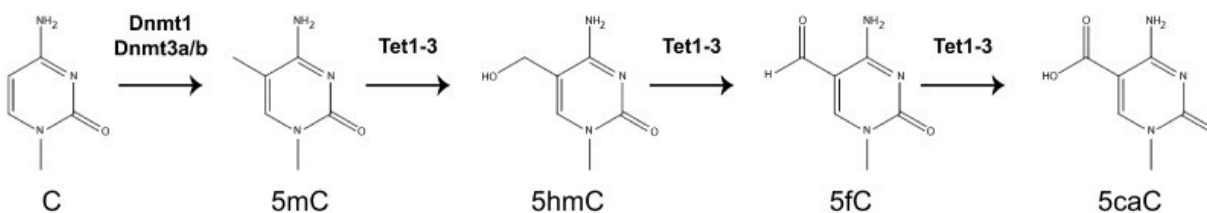
1.2.2.1. Régulation de HIF-1 α

L'accumulation de 2HG générée par les formes mutées de IDH1/2 affecte l'angiogénèse via HIF-1 α (Hypoxia Inductible Factor 1 α). En conditions d'hypoxie, la stabilisation de HIF-1 α permet à ce dernier de former un hétérodimère avec HIF-1 β et d'ainsi pouvoir agir en tant que facteur de transcription. L'hétérodimère ainsi formé active la transcription de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), permettant ainsi l'initiation du processus d'angiogénèse (Forsythe et al., 1996, Jiang et al., 1996, Wang et al., 1995). Parmi les oxygénases α -kétoglutarate-dépendantes dont l'activité est modulée par le 2HG on retrouve notamment PHD (Prolyl Hydroxylase), qui est responsable de l'hydroxylation de HIF-1 α (Zhao et al., 2009, Koivunen et al., 2012). Cette hydroxylation entraîne l'ubiquitination de HIF-1 α et, par conséquent, sa dégradation protéolytique (Epstein et al., 2001, Huang et al., 1998, Salceda and Caro, 1997, Sutter et al., 2000). Ainsi, l'inhibition de PHD par le 2HG généré par les formes mutées de IDH1/2 permet de stabiliser HIF-1 α (Zhao et al., 2009). Cependant, PHD est en mesure d'utiliser le 2HG comme co-substrat, diminuant ainsi l'activité de HIF-1 α chez les cellules possédant une mutation de IDH1/2 (Koivunen et al., 2012). Une observation permettant d'expliquer en partie ces deux résultats contradictoires à première vue est que l'élévation des niveaux de HIF-1 α est généralement restreinte à certaines régions de nécrose associées à des conditions d'hypoxie (Williams et al., 2011). Ainsi, l'activation de HIF-1 α demeurerait associée à l'hypoxie chez les cellules possédant une mutation de IDH1/2, mais la «dose-réponse» serait modifiée par la présence de 2HG (Koivunen et al., 2012).

1.2.2.2. Inhibition de la famille TET méthylcytosine déoxygénase

La méthylation de l'ADN permet de réguler de nombreux processus biologiques parmi lesquels figurent notamment l'inactivation du chromosome X, l'empreinte génomique de même que l'expression génique (Suzuki and Bird, 2008). La méthylation de l'ADN constitue un processus réversible grâce aux TETs (Ten-Eleven Translocation) méthylcytosine déoxygénase dont la famille regroupe 3 membres, soit TET1, TET2 et TET3 (Ito et al., 2010). Ceux-ci sont en mesure de catalyser l'oxydation de 5-méthylcytosine (5mC) en 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC) (Figure 1.6) (Tahiliani et al., 2009). Le 5hmC ainsi obtenu

peut par la suite être converti en 5-formylcytosine (5fC) puis en 5-carboxylcytosine (5caC) par les TETs (He et al., 2011, Ito et al., 2011).



Tiré de Hill P.W. *et al*, Genomics, 2014, 104(5) :324-33

Figure 1.6. Réaction de déméthylation de l'ADN générée par les TETs.

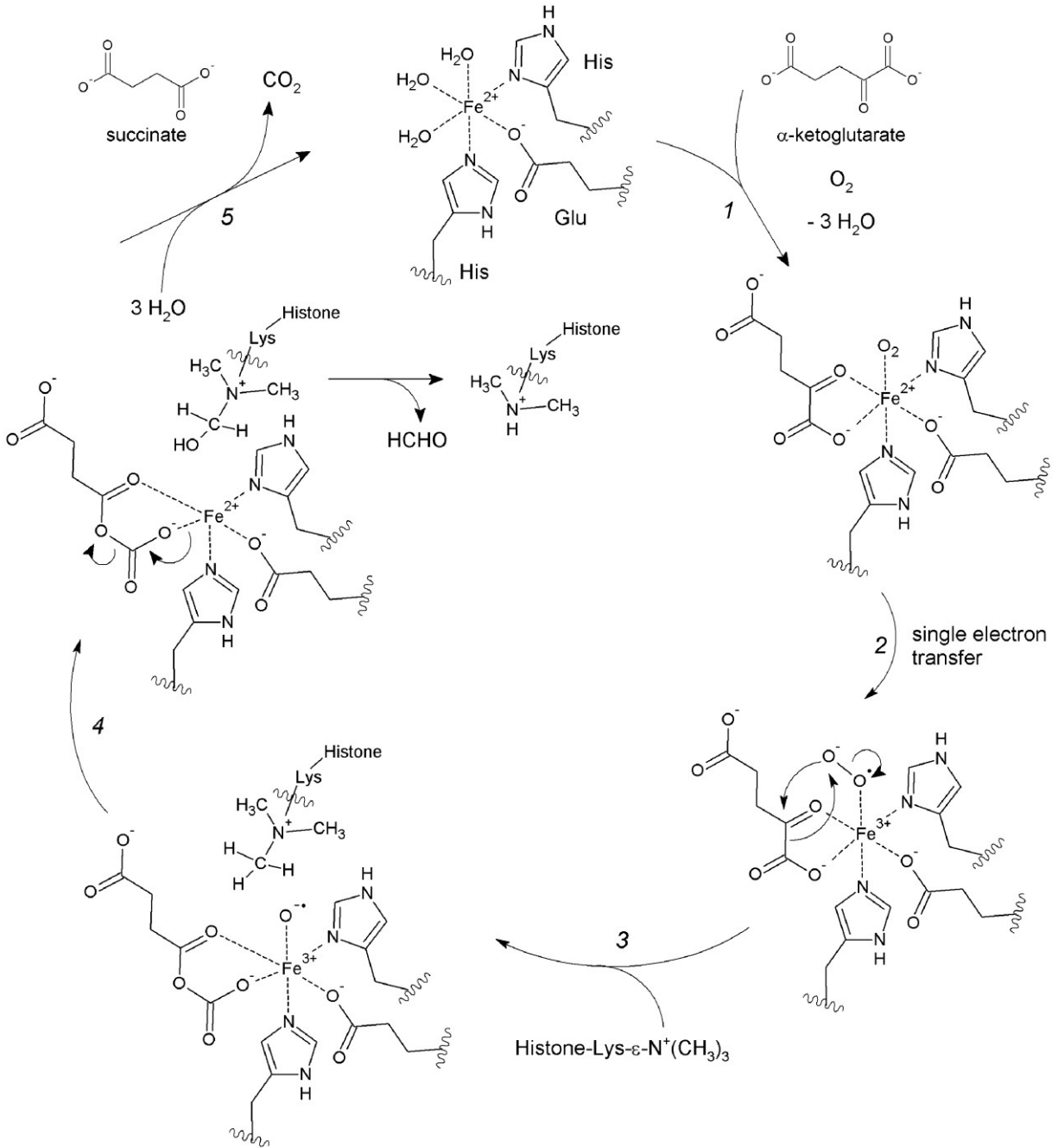
Les réactions catalysées par les TETs permettant de diminuer les niveaux de méthylation de l'ADN ont lieu au niveau de cytosines ayant été préalablement méthylées par Dnmt1 (DNA (Cytosine-5) Methyltransferase) ou Dnmt3a/b (Gaudet et al., 1998, Deng and Szyf, 1998).

Les TETs sont des oxygénases requérant du fer et l' α -kétoglutarate afin de catalyser leur réaction (Tahiliani et al., 2009, Ito et al., 2011). Par conséquent, ces oxygénases peuvent être inhibées par le 2HG généré par les formes mutées de IDH1/2 (Koivunen et al., 2012, Xu et al., 2011). Ainsi, bien que des mutations au niveau de TET soient retrouvées chez 22% des leucémies myéloïdes aiguës, les mutations de ces enzymes et de IDH1/2 sont mutuellement exclusives chez ces leucémies (Figuroa et al., 2010, Yang et al., 2013). Un phénotype d'hyperméthylation de l'ADN a d'ailleurs pu être associé aux tumeurs présentant une mutation de IDH1/2 (Figuroa et al., 2010, Turcan et al., 2012). Les formes mutées de IDH1/2 peuvent donc contrôler les niveaux de méthylation de l'ADN et, par conséquent, sont en mesure de modifier la régulation transcriptionnelle de l'ensemble du génome.

1.3. Déméthylases de la famille JUMONJI

La régulation épigénétique par les formes mutées de IDH1/2 ne se limite pas à la méthylation de l'ADN puisque d'autres oxygénases responsables de la régulation transcriptionnelle peuvent être inhibées par le 2HG. C'est notamment le cas des JUMONJIs, une famille de déméthylases de lysines (Chowdhury et al., 2011, Lu et al., 2012). Il existe deux grandes familles de déméthylases de lysines, soit la famille JUMONJI de même que la famille LSD (Kooistra and Helin, 2012). Tandis que la famille LSD permet la déméthylation

de lysines mono- ou di-méthylées, les JUMONJIs sont surtout connues pour la déméthylation de lysines di- ou tri-méthylée, bien que certaines JUMONJIs soient en mesure de démétyler des lysines mono-méthylées (Kooistra and Helin, 2012). Les JUMONJIs utilisent l' α -kétoglutarate et le fer comme cofacteurs afin de catalyser la réaction de déméthylation (Figure 1.7) (Tsukada et al., 2006). Par conséquent, leur activité est inhibée par le 2HG généré par les formes mutées de IDH1/2 (Chowdhury et al., 2011). Les JUMONJIs possédant la capacité de démétyler des lysines au niveau des histones, leur inhibition par le 2HG engendre une hyperméthylation des histones (Lu et al., 2012). IDH1/2 ne sont cependant pas les seules enzymes du cycle de l'acide citrique dont la mutation permet d'inhiber les JUMONJIs. Les mutations de la succinate déshydrogénase entraînent une accumulation de succinate alors que les mutations de la fumarase mènent pour leur part à l'accumulation de succinate et de fumarate (Xiao et al., 2012). Le succinate et le fumarate ainsi accumulés entraînent l'inhibition d'oxygénases α -kétoglutarate dépendantes parmi lesquelles figurent les JUMONJIs (Xiao et al., 2012). Tout comme l'inhibition des JUMONJIs par le 2HG, l'inhibition de cette famille de déméthylases de lysines par le succinate a été associée à une hyperméthylation des histones (Xiao et al., 2012).



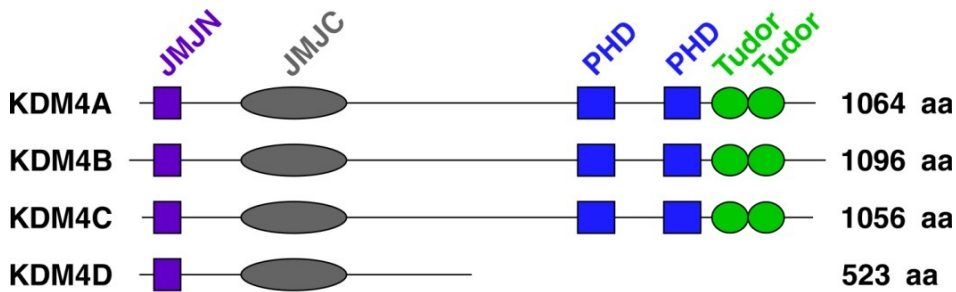
Tiré de Hoffmann I. *et al*, Molecular Oncology, 2012, 6(6) :683-703

Figure 1.7. Réaction de déméthylation catalysée par les JUMONJIs

Jusqu'à maintenant, 18 des 30 JUMONJIs répertoriées ont été associées à une activité de déméthylation (Kooistra and Helin, 2012).

1.3.1. Famille KDM4

Les JUMONJIs sont classées en sous-familles selon leur niveau d'homologie, la présence de domaines autres que JMJC ainsi que leurs substrats. La sous-famille KDM4 (lysine-specific demethylase 4) comporte quatre membres : KDM4A, KDM4B, KDM4C et KDM4D (Figure 1.8) (Katoh and Katoh, 2004). Ces quatre déméthylases de lysines possèdent un domaine JMJN en N-terminal de même qu'un domaine catalytique JMJC (Katoh and Katoh, 2004). Les KDM4A/B/C possèdent également un domaine PHD (Plant Homeodomain) en tandem ainsi qu'un domaine Tudor en tandem (Katoh and Katoh, 2004). Leur domaine Tudor permet la liaison de lysines méthylées alors que leur domaine PDH ne possède quant à lui aucune fonction connue à ce jour (Huang et al., 2006, Kim et al., 2006). Or, les domaines PHD d'autres protéines permettent à celles-ci de lier différentes protéines nucléaires dont les histones afin de réguler la chromatine et la transcription (Bienz, 2006).



Adapté de Berry W.L. *et al*, Cancer Research, 2013, 73(10) :2936-42

Figure 1.8. Famille de déméthylases KDM4.

La famille KDM4 est caractérisée par la présence de domaines JMJN et JMJC conservés entre les différents membres de cette famille (Katoh and Katoh, 2004). Aucune fonction n'a cependant pu être associée au domaine JMJN à ce jour.

Les quatre membres de la famille KDM4 catalysent la déméthylation de H3K9(me2), H3K9(me3), H3K36(me2), H3K36(me3), H1.4K26(me2) et H1.4K26(me3) (Cloos et al., 2006, Fodor et al., 2006, Klose et al., 2006, Whetstine et al., 2006, Trojer et al., 2009). Bien que le rôle de chaque marque de méthylation puisse varier selon le contexte cellulaire, tissulaire ou développemental, la di- ou triméthylation de H3K9 est généralement associée à la répression transcriptionnelle et à la formation d'hétérochromatine impliquant notamment le

recrutement de HP1 (Heterochromatin Protein 1) (Bannister et al., 2001, Lachner et al., 2001). En ce qui concerne la di- ou tri-méthylation de H3K36, son rôle au niveau de la transcription est moins clair. D'une part, cette marque de méthylation est associée à l'élongation de la transcription (Keogh et al., 2005, Joshi and Struhl, 2005). Or cette marque de méthylation est reconnue par DNMT3a (Dhayalan et al., 2010). DNMT3a étant une méthyltransférase d'ADN, son recrutement par H3K36(me2/3) permet de promouvoir la méthylation de l'ADN, réprimant ainsi l'expression des gènes environnants (Okano et al., 1998, Dhayalan et al., 2010). Ainsi, il est plus difficile de classer H3K36(me2/3) comme étant une marque associée à l'activation ou à la répression transcriptionnelle.

Bien que le substrat des JUMONJIs le mieux caractérisé soit les histones, d'autres protéines seraient également déméthylées par cette famille de déméthylase. En effet, KDM4A/B/C possèdent la capacité de déméthyliser des peptides de WIZ (Widely Interspaced Zinc finger motifs protein), CDYL1 (Chromodomain Y-Like protein 1), CSB (Cockayne Syndrome group B protein) de même que de la méthyltransférase G9a (Ponnaluri et al., 2009), suggérant ainsi que ces déméthylases de lysines pourraient également posséder certains substrats autres que les histones n'ayant pas encore été caractérisés à ce jour.

1.3.1.1. KDM4A

Grâce à son rôle au niveau des histones, KDM4A est impliqué dans la régulation de nombreux processus dont la progression du cycle cellulaire. Lors de la division cellulaire, la réplication de l'ADN nécessite de nombreux réarrangements de la chromatine. KDM4A permet d'augmenter l'accessibilité à la chromatine, stimulant ainsi la réplication de l'ADN et permettant la progression de la phase S du cycle cellulaire (Black et al., 2010).

KDM4A est également impliqué dans la régulation de la réponse aux dommages d'ADN. Le domaine Tudor de KDM4A lui permet de lier H3K4(me2/3) de même que H4K20(me2/3) (Kim et al., 2006, Huang et al., 2006). 53BP1 possède également un domaine Tudor en tandem lui permettant de lier H4K20(me2) (Botuyan et al., 2006, Sanders et al., 2004, Kim et al., 2006). L'affinité de KDM4A pour ce site de méthylation est cependant plus élevée que celle de 53BP1, expliquant ainsi que l'on retrouve KDM4A au niveau de ces lysines lorsqu'il n'y a pas de perturbation de l'ADN (Mallette et al., 2012). En revanche, suite

à un dommage au niveau de l'ADN, KDM4A est ubiquitiné par RNF8 et RNF168, provoquant ainsi la dégradation de KDM4A et permettant l'exposition des lysines 20 diméthylées des histones H4 qui deviennent alors accessibles pour 53BP1 (Malette et al., 2012). 53BP1 peut ainsi être recruté au niveau de ces lysines et initier la réponse aux dommages à l'ADN.

KDM4A est également en mesure de coopérer avec Ras afin de contourner la sénescence (Malette and Richard, 2012). La sénescence constitue en un arrêt permanent et irréversible du cycle cellulaire pouvant entre autre être induit par l'activation d'oncogènes tels que Ras (Serrano et al., 1997). Chez les cellules cancéreuses, les mutations menant à l'activation constitutive de Ras sont extrêmement fréquentes (Der et al., 1982, Parada et al., 1982, Santos et al., 1982). Ras étant une petite GTPase, ces mutations ont généralement pour effet d'inhiber la capacité de Ras à hydrolyser le GTP auquel il est lié (Kiaris and Spandidos, 1995). En revanche, ces mutations seules ne sont pas suffisantes pour permettre la transformation cellulaire puisque les cellules disposent de divers mécanismes s'opposant à l'activation d'oncogènes. En effet, le processus de transformation maligne implique l'inhibition de l'apoptose et de la sénescence cellulaire (Schmitt, 2003). Les mutations de suppresseurs tumoraux impliqués dans les voies stimulant l'apoptose et/ou la sénescence sont donc fréquentes chez les cellules cancéreuses (Schmitt, 2003). Parmi ces suppresseurs tumoraux fréquemment mutés, on retrouve les protéines impliquées dans les voies INK4A/CyclinD/Rb et ARF/MDM2/p53 (Yeang et al., 2008). L'établissement et le maintien de la sénescence reposent à la fois sur la voie p53 et la voie Rb. En effet, l'inactivation de ces deux suppresseurs tumoraux permet aux cellules chez lesquelles Ras est muté de contourner la sénescence (Serrano et al., 1997, Ferbeyre et al., 2000, Malette et al., 2007). La voie p53 est responsable de la régulation transcriptionnelle de nombreux gènes permettant l'établissement et la maintenance de la sénescence parmi lesquels figurent notamment p21 (el-Deiry et al., 1993), PML (Promyelocytic Leukemia protein) (de Stanchina et al., 2004) ainsi que PAI-1 (Kortlever et al., 2006). La régulation de p53 lors de la sénescence induite par les oncogènes est médiée par la réponse aux dommages à l'ADN (Malette et al., 2007) ainsi que via CHD5 (chromodomain helicase DNA-binding domain 5) (Bagchi et al., 2007). Les lysines 9 triméthylées des histones H3 retrouvées au niveau du promoteur de CHD5 peuvent être déméthylées par KDM4A, régulant ainsi l'expression de CHD5 (Malette and Richard, 2012).

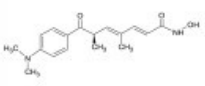
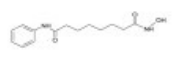
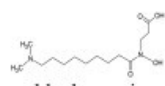


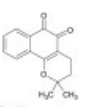
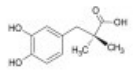
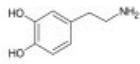
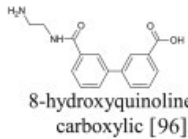
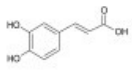
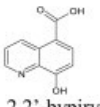
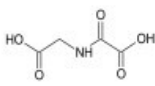
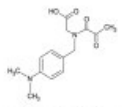
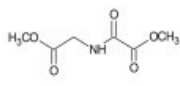
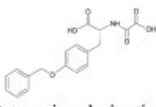
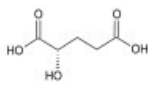
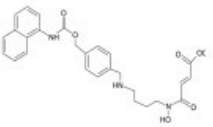
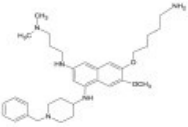
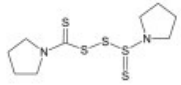
La déplétion de KDM4A permet donc d'induire la sénescence grâce à l'activation de la voie p53 (Mallette and Richard, 2012). Au contraire, lors de la sénescence induite par Ras, KDM4A permet de contrer l'augmentation de CHD5 engendrée par cet oncogène, empêchant ainsi l'activation de la voie p53 (Mallette and Richard, 2012, Stokoe et al., 1997). KDM4A collabore donc avec Ras afin de contourner la sénescence et favoriser la formation de tumeurs.

1.3.1.1.1. KDM4A et cancer

Une analyse regroupant des données sur le cancer du sein, de la tête et du cou, du poumon, des ovaires, de l'utérus et de l'endomètre, les adénocarcinomes rénaux et gastriques a permis de démontrer que le nombre de copies du gène *KDM4A* est augmenté dans 18.9% des cancers alors qu'une copie est perdue dans 22.1% des cas (Black et al., 2013). Ainsi, bien que KDM4A soit régulièrement considéré comme un oncogène, le fait que ses niveaux soient diminués aussi fréquemment suggère que cette déméthylase de lysines pourrait également posséder certaines propriétés anti-tumorales en fonction du contexte cellulaire et/ou génétique.

Néanmoins, l'inhibition de KDM4A constitue une avenue thérapeutique attrayante en raison de sa surexpression fréquente chez les cellules cancéreuses. Cinq catégories d'inhibiteurs de déméthylases de lysines ont été décrites à ce jour : chélateurs de fer, analogues de l' α -kétoglutarate, inhibiteurs du site catalytique, prodrogues et chélateurs de zinc (Tableau III). Toutefois, le manque de spécificité de ces inhibiteurs constitue leur principale limitation puisque ceux-ci inhibent l'ensemble des JUMONJIs

Tableau III. Inhibiteurs de JUMONJIs

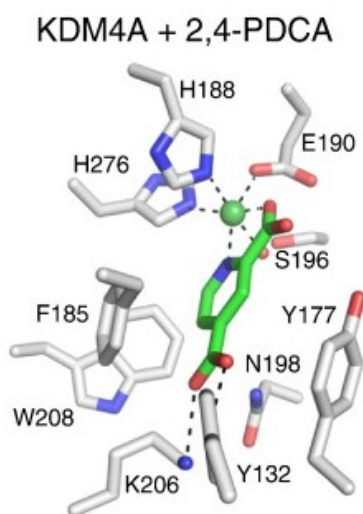
Iron chelators					
 Trichostatin [94].	 Suberoylanilide hydroxamic [94].	 Internal hydroxamic acid [98].	 Pyridine 2,4-dicarboxylic acid [97].	 PDCA derivative [97].	 β -lapachone [99].
 [S]-[-]-carbidopa [99].	 Dopamine [99].	 8-hydroxyquinoline-5-carboxylic [96].	 3,4-dihydroxy cinnamic acid [101].	 2,2'-bipyridine derivative [100].	
α -ketoglutarate analogs					
 N-oxalylglycine [93].	 NOG-derivative [93].	 Dimethyl N-oxalylglycine [DMOG] [93].	 N-oxalyl D-tyrosine derivative [102].	 [S]-2-hydroxyglutaric acid [2-HG] [92].	
Prodrug	Binds to the active site		Zinc chelators		
 Methylstat [103].	 E67 [104].		 Disulfiram derivative [95].		

Tiré de Guerra-Calderas L. *et al*, Cancer Genetics, 2014, 208(5) :215-24

Les chélateurs de fer, qui constituent la plus grande catégorie d'inhibiteurs de KDM4A, comprennent le Trichostatin (Rose *et al.*, 2008), le Suberoylanilide hydroxamic (Rose *et al.*, 2008), le Internal hydroxamic acid (Hamada *et al.*, 2010), le Pyridine 2-4-dicarboxylic acid (2,4-PDCA) (Thalhammer *et al.*, 2011), le PDCA derivative (Thalhammer *et al.*, 2011), le β -lapachone (Sakurai *et al.*, 2010), le [S]-[-]-carbidopa (Sakurai *et al.*, 2010), la dopamine (Sakurai *et al.*, 2010), le 8-hydroxyquinoline-5-carboxylic (King *et al.*, 2010), le 3-4-dihydroxy cinnamic acid (Nielsen *et al.*, 2012) et le 2,2'-bipyridine derivative (Chang *et al.*, 2011). Au niveau des analogues de l' α -kétoglutarate, on retrouve le N-oxalylglycine (Hamada *et al.*, 2009), le NOG-derivative (Hamada *et al.*, 2009), le Dimethyl N-oxalylglycine (DMOG) (Hamada *et al.*, 2009), le N-oxalyl D-tyrosine derivative (Rose *et al.*, 2010) et le [S]-2-hydroxyglutaric acid (2HG) (Xu *et al.*, 2011). Le Methylstat (Luo *et al.*, 2011), le E67

(Upadhyay et al., 2012) et le Disulfiram derivate (Sekirnik et al., 2009) constituent pour leur part une prodrogue, un inhibiteur liant le site actif et un chélateur de zinc respectivement.

Les chélateurs de fer sont des inhibiteurs dont le mécanisme d'action repose sur les interactions électrostatiques avec une lysine retrouvée au niveau du site actif (Rose et al., 2008, Hamada et al., 2010, Thalhammer et al., 2011, Sakurai et al., 2010, King et al., 2010, Nielsen et al., 2012, Chang et al., 2011). Par exemple, le 2,4-PDCA interagit avec la tyrosine 132 et la lysine 206 de KDM4A (Figure 1.9) (Rose et al., 2008). Cependant, loin d'être spécifiques aux déméthylases de lysines, ces composés sont également en mesure d'inhiber les déacétylases d'histones (Marks and Breslow, 2007).



Tiré de Thinnes CC *et al*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA), 2014, 1839(12) :1416-32

Figure 1.9. Structure du 2,4-PDCA lié à KDM4A

Le 2,4-PDCA occupe le site actif de KDM4A (Rose et al., 2008). Pour l'obtention de la structure, le site actif du fer fut remplacé par du nickel (Rose et al., 2008).

En ce qui concerne les analogues de l' α -kétoglutarate, ils inhibent toutes les oxygénases α -kétoglutarate dépendantes (Hamada et al., 2009, Rose et al., 2010, Xu et al., 2011). Ainsi, les effets engendrés par l'utilisation de tels inhibiteurs seraient probablement comparables à ceux obtenus avec le 2HG, qui appartient également à cette famille d'inhibiteurs (Chowdhury et al., 2011).

1.4. Formes mutées de IDH1/2 comme cibles thérapeutiques

1.4.1. Inhibiteurs des formes mutées de IDH1/2

Des agents pharmaceutiques permettant de cibler spécifiquement les mutations de IDH1/2 furent rapidement développés puisque ces mutations surviennent fréquemment au niveau des mêmes résidus. L'un de ces agents est l'AGI-5198, ciblant IDH1^{R132H} et IDH1^{R132C} (Rohle et al., 2013). L'AGI-5198 empêche la production de 2HG tout en contrant l'hyperméthylation de H3K9(me3) et en favorisant la différenciation chez des lignées cellulaires de gliomes possédant une mutation de IDH1 (Rohle et al., 2013). Cependant, l'AGI-5198 n'est pas en mesure de renverser l'hyperméthylation de l'ADN, suggérant ainsi que d'autres mécanismes encore inconnus à ce jour pourraient être affectés par les formes mutées de IDH1 (Rohle et al., 2013). D'autres inhibiteurs des formes mutées de IDH1 furent également développés (Popovici-Muller et al., 2012, Zheng et al., 2013). En ce qui concerne les formes mutées de IDH2, l'AGI-6780 permet d'inhiber IDH2^{R140Q}, restaurant ainsi la différenciation chez des cellules d'érythroleucémie (Wang et al., 2013).

1.4.2. Vaccination contre les formes mutées de IDH1/2

Récemment, un vaccin constitué de peptides de IDH1^{R132H} a été utilisé chez la souris. Ce vaccin permettait de réduire la croissance tumorale chez les souris dont la tumeur possédait la mutation IDH1^{R132H}, mais n'avait aucun effet sur la croissance tumorale chez les souris dont la tumeur ne possédait pas de mutation de IDH1 (Schumacher et al., 2014). Aucune toxicité ne fut décelée suite au vaccin et le vaccin n'affectait aucunement l'activité enzymatique de la forme sauvage de IDH1 (Schumacher et al., 2014).

2. Activation oncogénique de la voie mTOR chez les cellules tumorales

La voie mTOR est fréquemment suractivée chez les glioblastomes en raison de certaines mutations récurrentes. C'est notamment le cas des mutations de PTEN, retrouvées dans 23.5% des glioblastomes (Ohgaki et al., 2004). Les amplifications de EGFR, présentes chez 34% des glioblastomes, activent également la voie mTOR (Ohgaki et al., 2004).

mTOR fut initialement découvert grâce à la rapamycine, une molécule aux propriétés antifongiques produite naturellement par *Streptomyces hygroscopicus* (Vezina et al., 1975, Sehgal et al., 1975). Possédant des effets anti-prolifératifs, la rapamycine fut largement utilisée afin d'étudier la régulation de la croissance cellulaire. C'est ainsi que les protéines ciblées par la rapamycine furent mis en évidence chez la levure, TOR1 (target of rapamycin 1) et TOR2 (target of rapamycin 2) (Heitman et al., 1991). La découverte de ces gènes permit par la suite l'identification des gènes TOR chez d'autres eucaryotes, notamment mTOR (mechanistic/mammalian target of rapamycin) chez les mammifères (Brown et al., 1994).

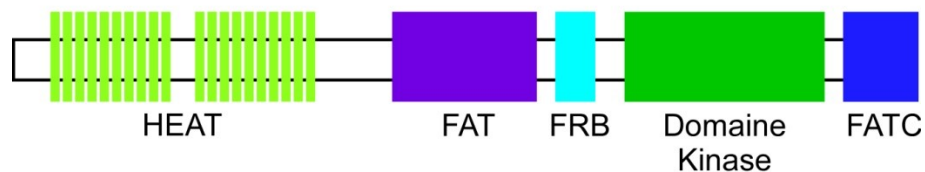
mTOR régule de nombreux processus cellulaires en intégrant des signaux extracellulaires, la disponibilité des acides aminés de même que les niveaux énergétiques (Laplane and Sabatini, 2012). L'intégration de ces signaux par mTOR lui permet notamment de moduler la croissance et la prolifération cellulaire de même que la survie cellulaire et l'organisation du cytosquelette (Laplane and Sabatini, 2012). Ainsi, l'activation constitutive de la voie mTOR chez les cellules cancéreuses permet à ces dernières de proliférer indépendamment de la présence de signaux prolifératifs tout en favorisant leur survie et les processus de migration et d'invasion. Les mutations au niveau des voies de contrôle de mTOR confèrent donc un avantage prolifératif aux cellules cancéreuses et sont extrêmement fréquentes, entraînant une surstimulation de mTOR dans près de 80% des cancers (Menon and Manning, 2008).

2.1. Kinase mTOR

mTOR est une kinase de sérines et thréonines appartenant à la famille PIKK (PI3K-related protein kinase), laquelle regroupe des kinases possédant une séquence similaire à celle de PI3K (Phosphoinositide 3-Kinase) (Lempiainen and Halazonetis, 2009). Chez l'être humain, cette famille regroupe également les kinases ATM (ataxia telangiectasia mutated), ATR (ataxia telangiectasia- and RAD3-related), SMG1 (suppressor with morphological effect on genitalia family member), DNA-PKcs (DNA-dependant protein kinase catalytic subunit) et TRRAP (transformation/transcription domain-associated protein) (Lempiainen and Halazonetis, 2009).

L'extrémité N-terminale de mTOR contient des répétitions HEAT (Huntingtin, elongation factor 3, a subunit of protein phosphatase 2A, TOR1) en tandem permettant certaines interactions protéines-protéines (Figure 1.10) (Andrade and Bork, 1995). Ce domaine est suivi d'un domaine FAT (FRAP, ATM, TRAP), qui est également retrouvé chez les autres kinases de la famille PIKK, puis d'un domaine FRB (Bosotti et al., 2000). Le domaine FRB confère la sensibilité de mTOR à la rapamycin, puisque ce domaine lie le complexe formé par la rapamycine et FKBP12 (FK506-binding protein 12kDa) (Chen et al., 1995). Le domaine FRB de mTOR est suivi du domaine kinase, puis d'un domaine FATC, ce dernier étant essentiel à l'activité de mTOR (Peterson et al., 2000, Takahashi et al., 2000).

mTOR



Adapté de Yang Q. et Guan K.-L., Cell Research, 2007, 17(8) :666-81

Figure 1.10. Domaines de la kinase mTOR

mTOR contient des répétitions HEAT, un domaine FAT, un domaine FRB, un domaine kinase ainsi qu'un domaine FATC.

2.2. Différents complexes formés par mTOR

mTOR s'associe à différentes protéines afin de former deux complexes aux fonctions distinctes, soit mTORC1 (mTOR complex 1) et mTORC2 (Figure 1.11). mTOR, mLST8 et DEPTOR sont communs aux deux complexes (Kim et al., 2003, Peterson et al., 2009). Raptor et PRAS40 sont retrouvés uniquement au niveau de mTORC1 alors que Rictor, mSin1 et Protor1/2 sont exclusifs à mTORC2 (Hara et al., 2002, Kim et al., 2002, Sancak et al., 2007, Vander Haar et al., 2007, Jacinto et al., 2004, Sarbassov et al., 2004, Frias et al., 2006, Pearce et al., 2007).

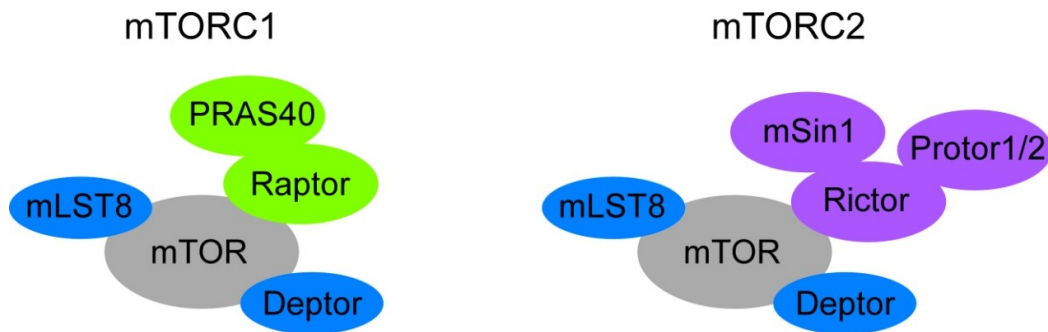


Figure 1.11. Complexes mTORC1 et mTORC2

L'association de mTOR à Raptor entraîne la formation d'un complexe mTORC1 alors que la liaison de mTOR à Rictor permet la création d'un complexe mTORC2.

mLST8 lie fortement le domaine kinase de mTOR (acides aminés 2115-2431), mais également les fragments de mTOR comprenant les acides aminés 2185-2254 et 2255-2431, bien que l'interaction via ces derniers sites semble plus modeste (Kim et al., 2003). mLST8 permet d'activer la voie mTOR en stimulant l'activité kinase de mTOR (Kim et al., 2003).

Raptor interagit avec la portion N-terminale de mTOR (acides aminés 1-1482) où est retrouvé le motif HEAT et permet l'assemblage d'un complexe mTORC1 plutôt que d'un complexe mTORC2 (Kim et al., 2002). Cette interaction est d'ailleurs stabilisée par mLST8 (Kim et al., 2003). Au contraire, l'interaction entre le complexe FKPB12/rapamycin et mTOR vient déstabiliser l'interaction entre mTOR et Raptor, empêchant par conséquent la formation du complexe mTORC1 (Kim et al., 2002). PRAS40 est recruté au sein de mTORC1 grâce à son interaction avec Raptor et possède une activité inhibitrice de mTORC1 (Sancak et al., 2007, Vander Haar et al., 2007).

Au niveau de mTORC2, Rictor interagit avec mTOR (Sarbasov et al., 2004, Jacinto et al., 2004). Dépendamment des types cellulaires, les ratios de Raptor et Rictor ne sont pas équivalents. En effet, alors que la quantité de Raptor et de Rictor est semblable chez les cellules HEK293T, ce n'est pas le cas chez les cellules HeLa, chez lesquelles on retrouve davantage de Rictor et moins de Raptor (Kim et al., 2002, Sarbasov et al., 2004). Chez certaines lignées cellulaires de gliomes et de glioblastomes multiformes, Rictor est surexprimé (Masri et al., 2007). En fait, il semblerait y avoir une corrélation inverse entre les niveaux de Rictor et Raptor. Bien que mTORC2 ait été initialement considéré comme insensible à la

rapamycine, un traitement prolongé à la rapamycine empêche également la formation de complexes mTORC2 chez certains types cellulaires (Sarbasov et al., 2004, Sarbasov et al., 2006, Jacinto et al., 2004), tandis que d'autres lignées cellulaires demeurent insensibles à la rapamycine indépendamment de la durée de traitement (Sarbasov et al., 2006). mSin1 et Protor1/2 sont recrutés au sein de mTORC2 grâce à leur interaction avec Rictor (Frias et al., 2006, Pearce et al., 2007). Au moins trois différents isoformes de mSin1 peuvent contribuer à la formation du complexe mTORC2, soit mSin1.1, mSin1.2 et mSin1.5 (Frias et al., 2006). mSin1.4 n'est pas retrouvé chez mTORC2, mais pour des raisons techniques l'interaction entre mSin1.3 et Rictor n'a pu être vérifiée (Frias et al., 2006). Ainsi, la possibilité que mSin1.3 soit également en mesure de contribuer à la formation d'un complexe mTORC2 ne peut être exclue. Alors qu'à court terme (1 heure) la rapamycin n'a aucun effet sur l'interaction entre mSin1 et mTORC2, à long terme (24 heures), l'interaction entre mSin1.1 ou mSin1.2 et mTORC2 est perdue (Frias et al., 2006). Les deux isoformes de Protor, soit Protor1 et Protor2, interagissent également avec Rictor (Pearce et al., 2007). Parmi les variants d'épissage, seul Protor1- α et Protor1- β sont en mesure d'interagir avec Rictor, contrairement à Protor1- γ . La portion N-terminale de ce dernier ne possède pas les acides aminés 1-97 retrouvés chez Protor1- α , Protor1- β et Protor 2, suggérant ainsi que l'interaction entre Protor1/2 et mTORC2 pourrait avoir lieu au niveau de l'extrémité N-terminale de Protor (Pearce et al., 2007).

2.2.1. DEPTOR

DEPTOR constitue un inhibiteur des complexes mTORC1 et mTORC2 interagissant avec mTOR au niveau du domaine FAT (1483-2000) de ce dernier (Peterson et al., 2009). DEPTOR possède un domaine DEP en tandem au niveau de son extrémité N-terminale (acides aminés 36-117 et 133-217) de même qu'un domaine PDZ en C-terminal (acides aminés 324-409) (Peterson et al., 2009). Treize sérines et thréonines phosphorylées furent initialement identifiées entre les domaines DEP et PDZ de DEPTOR (T241, S244, S259, T260, S263, S265, S282, S283, S287, S293, S297, S298, S299) (Peterson et al., 2009). Lorsque phosphorylé au niveau de ces sites, DEPTOR se dissocie de mTOR et permet ainsi l'activation de mTOR.

La dissociation de DEPTOR et mTOR est initiée par la phosphorylation des sérines 265, 286, 293 et 299 ainsi que la thréonine 295 de DEPTOR par mTOR (Duan et al., 2011, Gao et al., 2011). Ces phosphorylations permettent par la suite à CK1 de phosphoryler les sérines 286 et 287 de DEPTOR qui sont retrouvées au niveau de son phospho-degron (Gao et al., 2011). L'ubiquitine ligase SCF^{β-TrCP} reconnaissant ces formes phosphorylées de DEPTOR, l'ubiquitination et la dégradation protéolytique de DEPTOR s'en suivent (Gao et al., 2011, Duan et al., 2011, Zhao et al., 2011).

2.3. Mécanismes de régulation de la voie mTOR

La régulation de mTOR repose entre autres sur la stimulation par les facteurs de croissance, la quantité d'acides aminés disponibles de même que les niveaux d'énergie et d'oxygène (Laplanche and Sabatini, 2012). Les mécanismes de régulation varient entre les deux complexes mTOR et sont beaucoup mieux caractérisés pour mTORC1 que pour mTORC2.

2.3.1. Régulation de mTORC1

2.3.1.1. Facteurs de croissance

Différents facteurs de croissances dont l'insuline et l'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1) permettent la régulation de mTOR grâce aux voies PI3K/AKT et Ras/ERK.

2.3.1.1.1. Voie PI3K/AKT

L'activation de la voie PI3K/AKT engendrée par les facteurs de croissance est relativement bien caractérisée. Lorsque la voie PI3K/AKT est activée, PI3K phosphoryle le phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP₂), générant ainsi du phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP₃) (Figure 1.12) (Abrams et al., 1996). Le suppresseur tumoral PTEN est une phosphatase s'opposant à l'activité de PI3K en permettant la conversion du PIP₃ en PIP₂ (Maehama and Dixon, 1998). Le PIP₃ permet le recrutement de PDK1 et AKT à la membrane plasmique en se liant à leur domaine PH (pleckstrin homology), activant par le fait même PDK1 (Stokoe et al., 1997). PDK1 est alors en mesure de phosphoryler la thréonine 308 d'AKT retrouvée au niveau de sa boucle d'activation (Alessi et al., 1997). Cependant, afin qu'AKT soit complètement activé, la sérine 473 de son motif hydrophobique doit également

être phosphorylée par mTORC2 (Sarbassov et al., 2005). Suite à ces deux événements de phosphorylation, AKT est apte à moduler l'activation de mTOR de deux manières distinctes. Premièrement, AKT permet le contrôle de l'activité de TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex 2), un régulateur de mTOR (Inoki et al., 2002). TSC2 est retrouvé sous forme de complexe avec TSC1 (Tuberous Sclerosis Complex 1) dont le rôle est de prévenir l'ubiquitination de TSC2, empêchant ainsi sa dégradation (Benvenuto et al., 2000). TSC1 stabilise également TBC1D7 (Tre2-Bub2-Cdc16 (TBC) 1 domain family member 7), qui est aussi retrouvé au sein de ce complexe et permet de stabiliser l'interaction entre TSC1 et TSC2, favorisant par conséquent la stabilité de TSC2 (Dibble et al., 2012). TSC2 possède pour sa part une activité GAP (GTPase-activating protein) stimulant l'activité GTPase de rheb (Ras homologous enriched in brain) et favorisant ainsi la conversion du GTP lié à rheb en GDP (Inoki et al., 2003a, Tee et al., 2003). Suite à sa phosphorylation par AKT en sérine 939 et thréonine 1462, TSC2 est dissocié de TSC1 et migre vers le cytosol où il lie plutôt 14-3-3 (Cai et al., 2006). Rheb étant pour sa part localisé au niveau de la membrane lysosomale, la séquestration de TSC2 dans le cytosol l'empêche de stimuler l'activité GTPase de rheb (Saito et al., 2005). Par conséquent, rheb demeure sous sa forme active, lui permettant d'interagir directement avec mTORC1 et de l'activer (Long et al., 2005). AKT phosphoryle également PRAS40 en T246 (Kovacina et al., 2003), stimulant ainsi sa liaison à 14-3-3 ainsi que sa dissociation du complexe mTORC1 (Kovacina et al., 2003, Vander Haar et al., 2007). PRAS40 étant un inhibiteur de mTOR, sa séparation du complexe permet de lever cette inhibition, menant donc à une activation du complexe (Vander Haar et al., 2007, Sancak et al., 2007).

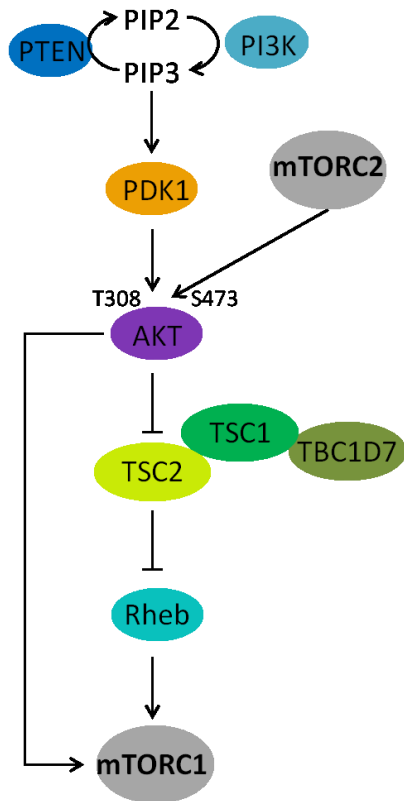


Figure 1.12. Voie PI3K/AKT

La voie PI3K/AKT est activée par les facteurs de croissance. L'activation de PI3K permet la conversion du PIP2 en PIP3, activant ainsi PDK1 qui phosphoryle alors AKT, qui doit également être phosphorylé par mTORC2 afin d'être complètement activé. Akt inhibe alors l'activité GTPase de TSC2 envers rheb tout en phosphorylant PRAS40, activant par ces deux mécanismes mTORC1.

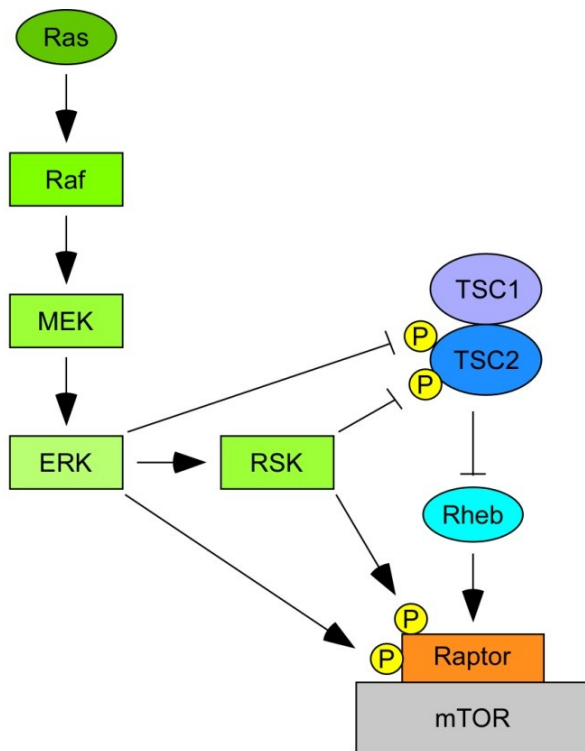
2.3.1.1.2. Voie Ras/ERK

Les voies MAPK (mitogen-activated protein kinase) constituent des cascades d'événements de phosphorylation au sein desquelles une MAPK est phosphorylée par une MAPKK (mitogen-activated protein kinase kinase), elle-même phosphorylée par une MAPKKK (mitogen-activated protein kinase kinase kinase) (Dhillon et al., 2007). La voie Ras est l'une des voies MAPK les mieux caractérisées à ce jour. L'activation de récepteurs tyrosine kinases résultant de la liaison de facteurs de croissance ou d'agents mitogènes entraîne la conversion du GDP lié à Ras en GTP (Margolis and Skolnik, 1994). Une fois lié au

GTP, Ras recrute Raf à la membrane pour son activation (Figure 1.13) (Vojtek et al., 1993, Van Aelst et al., 1993, Moodie et al., 1993). Par la suite, Raf phosphoryle et active MEK1/2 qui à son tour phosphoryle et active ERK1/2 (Blenis, 1993, Kyriakis et al., 1992, Crews and Erikson, 1992).

La régulation de mTORC1 par la voie Ras/ERK a notamment lieu au niveau de TSC2. En effet, suite à l'activation de cette voie de signalisation, ERK1/2 phosphoryle la sérine 664 de TSC2, entraînant ainsi la dissociation de TSC1 et TSC2 (Ma et al., 2005). L'activation de ERK1/2 permet également la phosphorylation de RSK (Sturgill et al., 1988), qui phosphoryle ensuite la sérine 1798 de TSC2 afin d'inhiber TSC2 (Roux et al., 2004).

La voie Ras/ERK est également en mesure de réguler mTORC1 en contrôlant la phosphorylation de Raptor. Effectivement, ERK1/2 phosphoryle les sérines 8, 696 et 863 de Raptor, ce qui permet de stimuler l'activité kinase de mTORC1 (Carriere et al., 2011). De plus, RSK1/2 phosphoryle les sérines 719, 721 et 722 de Raptor, ces événements de phosphorylation stimulant également l'activité de mTORC1 (Carriere et al., 2008).



Adapté de Carriere *et al*, Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(1) :567-77

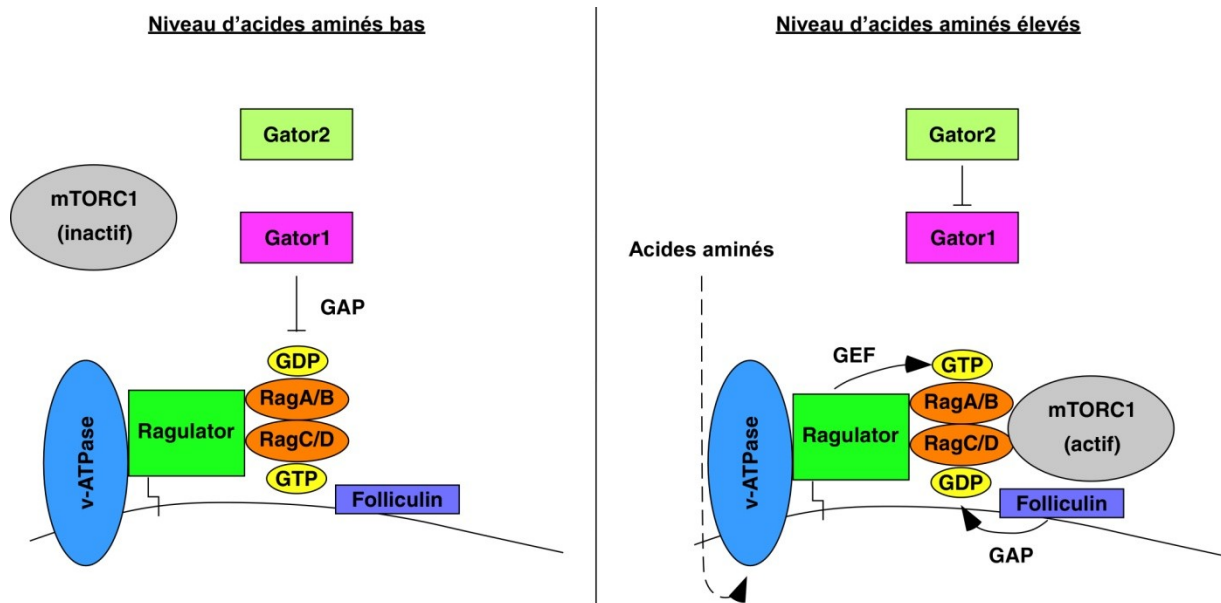
Figure 1.13. Modulation de l'activité mTORC1 par la voie Ras/ERK

Suite à l'activation de la voie Ras/ERK par des facteurs de croissance, Ras est activé. Ainsi, Ras phosphoryle Raf, qui phosphoryle par la suite MEK, qui phosphoryle alors ERK, ce dernier phosphorylant pour sa part RSK. Une fois activés, ERK et RSK phosphorylent TSC2 et Raptor, activant ainsi mTORC1.

2.3.1.2. Acides aminés

La bio-disponibilité des acides aminés joue un rôle important dans l'activation de mTORC1. En effet, lorsque la quantité d'acides aminés est limitante, mTORC1 ne peut être activé par les facteurs de croissance (Sancak et al., 2008, Hara et al., 1998, Wang et al., 1998). Cependant, la liste exhaustive des acides aminés impliqués dans la régulation de l'activation de mTORC1 demeure incertaine. Néanmoins, la leucine, l'arginine et la glutamine contribueraient à la régulation de mTORC1 (Sancak et al., 2008, Hara et al., 1998, Bauchart-Thevret et al., 2010, Nicklin et al., 2009, Duran et al., 2012, van der Vos and Coffey, 2012, van der Vos et al., 2012). La contribution de la leucine à la régulation de mTORC1 reposerait sur la LSR (leucyl-tRNA synthetase), qui lie les GTPases Rag (Ras-related GTP binding protein) afin d'activer mTORC1 (Bonfils et al., 2012, Han et al., 2012). La régulation de mTORC1 par les niveaux d'arginine repose pour sa part sur SLC38A9 (Solute Carrier family 38 member 9), un transporteur d'acides aminés interagissant avec les protéines Rag et Ragulator (Rebsamen et al., 2015, Wang et al., 2015). Cette interaction est modulée par les niveaux d'acides aminés et est favorisée lorsque RagB est associé au GDP (Wang et al., 2015). Chez les mammifères, on retrouve quatre protéines Rag : RagA, RagB, RagC et RagD. Celles-ci sont des GTPases se distinguant des autres protéines GTPases par leur capacité à former des hétérodimères. En effet, ces derniers sont formés par l'association de RagA ou RagB à RagC ou RagD (Sekiguchi et al., 2001). Tout comme RagA et RagB, RagC et RagD possèdent une séquence hautement similaire et sont fonctionnellement redondants. En plus de favoriser leur stabilité protéique, la dimérisation des GTPases Rag est essentielle afin que mTORC1 puisse être activé (Kim et al., 2008). En présence d'acides aminés, RagA/B lie le GTP alors que RagC/D lie quant à lui le GDP (Figure 1.14) (Kim et al., 2008). Cette forme active de dimère Rag est en mesure de lier Raptor et d'ainsi localiser mTORC1 au niveau de la membrane lysosomale où est également localisé rheb (Sancak et al., 2008, Kim et al., 2008). Ainsi, l'activation de mTORC1 par rheb résultant de la liaison de facteurs de croissance sur leurs récepteurs n'est

possible qu'en présence d'acides aminés. À l'opposé, en absence d'acides aminés, mTORC1 est dispersé dans le cytosol, ne pouvant ainsi pas être activé par rheb en réponse aux facteurs de croissance (Kim et al., 2008, Sancak et al., 2008). La modulation de la liaison de RagA/B et RagC/D au GTP ou GDP constitue donc un élément clé de la régulation de l'activation de mTORC1 par les acides aminés.



Adapté de Bar-Peled L. *et al*, Trends in Cell Biology, 2014, 24(7) :400-6

Figure 1.14. Régulation de mTORC1 par les acides aminés

Lorsque la quantité d'acides aminés disponibles est faible, l'activité GAP de GATOR1 envers RagA/B est stimulée. Par conséquent, mTORC1 demeure dans le cytosol. Au contraire, lorsque la quantité d'acides aminés disponibles augmente, Gator 2 inhibe Gator1. Ragulator agit alors comme GEF envers RagA/B alors que la folliculine agit quant à elle en tant que GAP envers RagC/D. mTORC1 peut ainsi être recruté à la membrane lysosomale, où rheb est également localisé.

2.3.1.2.1. Régulation de RagA/B

Ragulator est un complexe protéique agissant en tant que GEF (Guanine Exchange Factor) envers RagA/B (Bar-Peled et al., 2012). Ragulator est constitué de p18 (LAMTOR1 (late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and mTOR activator 1)), p14 (LAMTOR2), MP1

(MEK-binding partner 1 (LAMTOR3)), C7orf59 (LAMTOR4) et HBXIP (hepatitis B virus X-interacting protein (LAMTOR5)) (Sancak et al., 2010, Bar-Peled et al., 2012). p18 est responsable de l'association de Ragulator à la membrane lysosomale grâce à ses résidus palmitoylés et myristoylés (Sancak et al., 2010). Ainsi, Ragulator participe à l'activation de mTORC1 en présence d'acides aminés.

Au contraire, Gator permet de réguler négativement mTORC1 en absence d'acides aminés via son activité GAP envers RagA/B (Bar-Peled et al., 2013). Gator est formé de deux sous-complexes, appelés Gator1 et Gator2 (Bar-Peled et al., 2013). Au niveau de Gator 1, on retrouve DEPDC5 (DEP domain-containing 5), Nprl2 (nitrogen permease regulator-like 2) et Nprl3 (nitrogen permease regulator-like 3) alors que Gator 2 est pour sa part constitué de Mios (missing oocyte, meiosis regulator), WDR24 (WD repeat domain 24), WDR59 (WD repeat domain 59), Seh1L (SEH1-like) et Sec13 (GTPase-activating protein SEC13) (Bar-Peled et al., 2013). Gator1 agit en tant que GAP envers RagA/B alors que Gator2 agit plutôt comme régulateur négatif de Gator1 (Bar-Peled et al., 2013).

L'activation de mTORC1 par les acides aminés nécessite également l'association de la v-ATPase à Ragulator et Rag (Zoncu et al., 2011). Bien que la v-ATPase soit impliquée dans l'acidification du lysosome, cette acidification n'est pas requise pour l'activation de mTORC1 (Zoncu et al., 2011).

2.3.1.2.2. Régulation de RagC/D

La régulation de RagC/D repose en partie sur le complexe folliculine, qui est formé de la folliculine elle-même (FLCN) et de FNIP1 (folliculin interacting protein 1). Ce complexe agit en tant que GAP envers RagC/D, stimulant ainsi l'activation de mTORC1 (Tsun et al., 2013).

2.3.1.3. Niveaux énergétiques

La régulation de la voie mTOR est également affectée par les niveaux énergétiques qui sont intégrés grâce à l'AMPK (AMP-activated protein kinase). L'AMPK est composé d'une sous-unité catalytique α et de deux sous-unités régulatrices β et γ (Carling, 2004). Lorsque le ratio ATP/AMP diminue, l'AMP lie les répétitions en tandem du domaine cystathionine- β -

synthase (CBS) de la sous-unité γ de l'AMPK (Cheung et al., 2000). Cette liaison a pour effet d'empêcher la déphosphorylation de la thréonine 172 d'AMPK retrouvée dans la boucle d'activation de la sous-unité α dont la phosphorylation est requise pour l'activation de l'AMPK (Hawley et al., 1996). En condition de stress énergétique, la principale kinase responsable de la phosphorylation activatrice d'AMPK est LKB1 (Shaw et al., 2005, Sakamoto et al., 2005, Mirouse et al., 2007, Lee et al., 2007, Apfeld et al., 2004).

Lorsque les niveaux d'énergie diminuent, AMPK phosphoryle la thréonine 1227 de même que la sérine 1345 de TSC2 (Inoki et al., 2003b). Ces phosphorylations ont pour effet de stimuler l'activité de TSC2, inhibant par le fait même mTORC1 (Inoki et al., 2003b). La régulation de mTORC1 par AMPK ne repose cependant pas uniquement sur TSC2 puisque AMPK phosphoryle également les sérines 722 et 792 de Raptor (Gwinn et al., 2008), entraînant ainsi la liaison de ce dernier à 14-3-3 et provoquant l'inhibition de mTORC1. (Gwinn et al., 2008).

La régulation de mTORC1 en fonction des niveaux énergétiques repose également sur REDD1, dont la transcription est activée en réponse à divers stress cellulaires parmi lesquels figurent l'hypoxie, les dommages à l'ADN de même que les stress énergétiques (Ellisen et al., 2002, Shoshani et al., 2002, Sofer et al., 2005). Bien que REDD1 ne soit pas requis pour que AMPK puisse phosphoryler TSC2 lorsque les ratios d'AMP sont trop élevés, REDD1 est essentiel à l'inhibition de mTORC1 dans ces conditions (Sofer et al., 2005). Ainsi, malgré que AMPK et REDD1 ne soient pas en mesure de se réguler entre eux, ils coopéreraient afin de permettre l'inhibition de mTORC1 en agissant en amont de rheb lorsque les niveaux énergétiques diminuent (Sofer et al., 2005). La modulation de l'activité de mTORC1 par REDD1 repose sur la stabilité de ce dernier. En effet, la phosphorylation de REDD1 par GSK3 β entraîne le recrutement du complexe d'ubiquitine ligase CUL4A–DDB1–ROC1– β -TRCP qui est en mesure d'ubiquitiner REDD1, résultant ainsi en sa dégradation protéolytique (Katiyar et al., 2009).

2.3.1.4. p53

Le suppresseur tumoral p53 joue également un rôle important dans la modulation de l'activité mTORC1. En effet, l'activation de p53 par l'ETO, un inhibiteur de la topoisomérase-

II, stimule AMPK, menant ainsi à l'inhibition de mTORC1 (Feng et al., 2005). Suite à son activation, p53 stimule également la transcription de PTEN et TSC2, inhibant par conséquent mTORC1 (Feng et al., 2005, Stambolic et al., 2001).

2.3.1.5. Voie Wnt

La voie Wnt est notamment impliquée dans la prolifération et la survie cellulaire ainsi que dans différents processus développementaux (Anastas and Moon, 2013). Lorsque la voie Wnt n'est pas activée, la β -caténine est initialement phosphorylée par CK1, ce qui entraîne par la suite sa phosphorylation par GSK3 (Amit et al., 2002, Yost et al., 1996). Ces phosphorylations permettent la reconnaissance de la β -caténine par le complexe E3 ubiquitine ligase SCF ^{β TrCP} qui est responsable de l'ubiquitination de la β -caténine et, par conséquent, de sa dégradation protéolytique (Hart et al., 1999, Latres et al., 1999, Kitagawa et al., 1999, Winston et al., 1999). Afin que ces phosphorylations puissent avoir lieu, la β -caténine est recrutée au «complexe de destruction» au niveau duquel on retrouve CK1 et GSK3, mais également APC (Adenomatous Polyposis Coli) (Rubinfeld et al., 1993, Su et al., 1993), PP2A (Protein Phosphatase 2A) (Hsu et al., 1999, Seeling et al., 1999, Ratcliffe et al., 2000) et Axin (Ikeda et al., 1998). Au contraire, lorsqu'une protéine Wnt lie son récepteur, l'activité de GSK3 diminue, prévenant ainsi la dégradation de la β -caténine (Cook et al., 1996, Ding et al., 2000).

GSK3 α et GSK3 β sont en mesure de coopérer avec l'AMPK afin de réguler mTORC1. En effet, suite à la phosphorylation de TSC2 par l'AMPK, GSK3 α et GSK3 β permettent la phosphorylation des sérines 1341 et 1337 de TSC2 (Inoki et al., 2006). Ces phosphorylations, tout comme celles effectuées par AMPK, permettent de stimuler TSC2 et d'ainsi inhiber mTORC1 (Inoki et al., 2006). L'activation de la voie Wnt permet donc de stimuler mTORC1 grâce à l'inhibition de GSK3.

2.3.1.6. α -kétoglutarate et ATP synthase

L' α -kétoglutarate possède la capacité de lier et d'inhiber l'ATP synthase, diminuant ainsi les ratios ATP/AMP et la consommation d'oxygène (Chin et al., 2014). L'inhibition de l'ATP synthase permet de bloquer l'activité de mTOR (Chin et al., 2014). L'inhibition de TOR entraînant l'augmentation de la durée de vie de *C. elegans* (Vellai et al., 2003), l' α -

kétoglutarate possède ainsi la capacité d'augmenter la durée de vie de cet organisme modèle (Chin et al., 2014). Bien qu'il ait été démontré que HIF-1 ne contribue pas à cet effet, la possibilité que d'autres oxygénases α -kétoglutarate dépendantes puissent contribuer à la régulation de mTOR ne peut être exclue (Chin et al., 2014).

2.3.2. Régulation de mTORC2

Les mécanismes régulant mTORC2 sont moins bien caractérisés que ceux régulant mTORC1. mTORC2 est activé par le PIP3 généré par l'activation de PI3K via la stimulation par les facteurs de croissance. Or, en réponse à l'insuline, seuls les complexes mTORC2 contenant mSin1.1 ou mSin1.2 sont activés (Frias et al., 2006). L'activation de PI3K entraîne l'association de mTORC2 avec la sous-unité ribosomale 60S, stimulant ainsi mTORC2 (Zinzalla et al., 2011). La quantité de ribosomes est directement reliée à la capacité d'une cellule à croître et mTORC2 permet la régulation de processus associés à la croissance cellulaire. Ainsi, la régulation de mTORC2 par les ribosomes permet de coordonner son activité en fonction de la capacité d'une cellule à croître (Zinzalla et al., 2011).

Le complexe TSC1-TSC2 serait également impliqué dans la régulation de mTORC2. En effet, l'activité kinase de mTORC2 est diminuée chez des MEF TSC2^{-/-} (Huang et al., 2008). La capacité du complexe TSC1-TSC2 à activer mTORC2 ne relève pas de sa capacité à stimuler l'activité GTPase de rheb (Huang et al., 2008). De plus, alors qu'aucune interaction entre mTORC1 et le complexe TSC1-TSC2 n'a pu être observée, une interaction entre ce complexe et mTORC2 a été identifiée (Huang et al., 2008).

La régulation de mTORC2 repose également sur l'activité de mTORC1. Une fois activé par mTORC1, p70S6K1 phosphoryle les thréonines 86 et 398 de mSin1, résultant en la dissociation de mSin1 du complexe mTORC2 et, par conséquent, en l'inhibition de mTORC2 (Liu et al., 2013). p70S6K1 phosphoryle également la thréonine 1135 de Rictor (Dibble et al., 2009, Julien et al., 2010, Treins et al., 2010). Cette phosphorylation a pour effet d'inhiber la phosphorylation d'ATK par mTORC2 sans toutefois affecter la phosphorylation d'autres substrats de mTORC2 tels SGK1 et PKC α (Dibble et al., 2009, Julien et al., 2010). La phosphorylation de la thréonine 1135 de Rictor entraîne la création d'un site de liaison pour

14-3-3 sur Rictor sans toutefois affecter l'intégrité de mTORC2 (Dibble et al., 2009, Treins et al., 2010).

2.4. Processus cellulaires régulés par la voie mTOR

Les complexes mTORC1 et mTORC2 exercent des fonctions différentes et contrôlent des processus variés. mTORC1 est impliqué dans la régulation de la synthèse protéique et de la croissance cellulaire, le métabolisme, l'autophagie ainsi que l'angiogenèse (Laplane and Sabatini, 2012, Shimobayashi and Hall, 2014). mTORC2 est pour sa part impliqué dans la survie cellulaire et l'organisation du cytosquelette d'actine (Laplane and Sabatini, 2012, Shimobayashi and Hall, 2014).

2.4.1. Processus cellulaires contrôlés par mTORC1

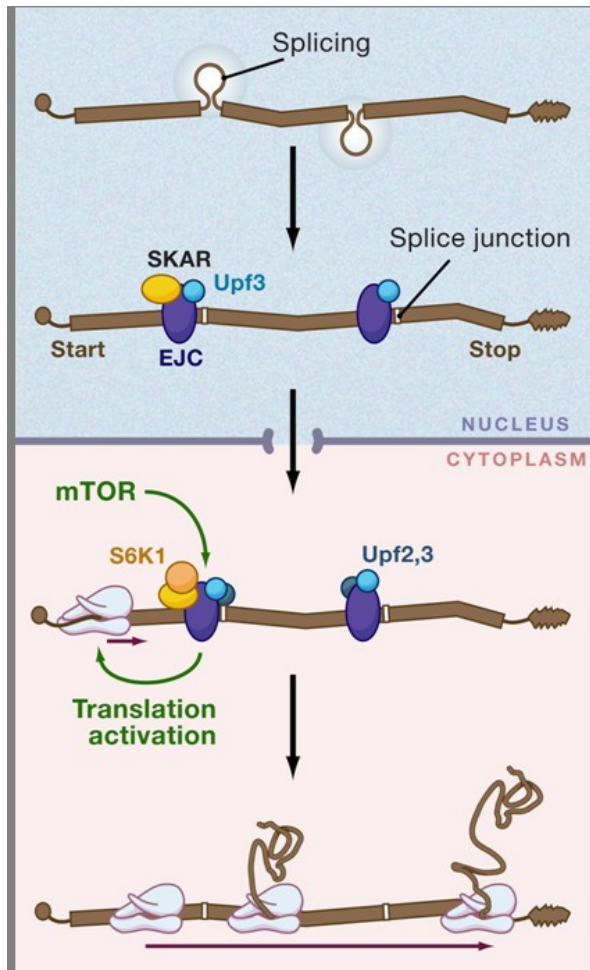
2.4.1.1. Synthèse protéique et croissance cellulaire

Afin de soutenir la croissance et la division constante des cellules cancéreuses, leur synthèse protéique doit être stimulée. La synthèse protéique étant un processus consommant énormément d'énergie, elle est sujette à une régulation très rigoureuse à laquelle contribue mTORC1 (Buttgereit and Brand, 1995). En effet, mTORC1 est impliqué dans la régulation de l'initiation et l'élongation de la traduction. Les deux substrats de mTORC1 les mieux caractérisés sont p70S6K de même que 4E-BP1, qui sont tous deux impliqués dans la régulation de la synthèse protéique. p70S6K est une kinase de la famille des kinases AGC (Protein kinases A, G and C) dont la thréonine 229, retrouvée au niveau de sa boucle d'activation, est phosphorylée par PDK1 (Pullen et al., 1998). En ce qui concerne le motif hydrophobe retrouvé sur p70S6K1, sa thréonine 389 est phosphorylée par mTORC1 (Pearson et al., 1995). p70S6K permet la régulation de protéines impliquées dans la synthèse protéique parmi lesquelles figurent notamment la protéine ribosomale S6 (Kozma et al., 1990, Banerjee et al., 1990), 4E-BP1 (Gingras et al., 1999a), eIF4B (Raught et al., 2004, Shahbazian et al., 2006), eEF2K (eukaryotic *Elongation Factor 2 Kinase*) (Wang et al., 2001), PDCD4 (Programmed Cell Death 4)(Dorrello et al., 2006) et SKAR (S6K1 Aly/REF-like substrate) (Ma et al., 2008).

mTORC1 favorise particulièrement la traduction des ARNm contenant un 5' TOP (Terminal Oligopyrimidine Tract), qui encodent notamment des protéines ribosomales ainsi que des facteurs d'élongation (Hsieh et al., 2012, Thoreen et al., 2012). Cette régulation nécessite la phosphorylation de 4E-BP1 par mTORC1 (Thoreen et al., 2012).

2.4.1.1.1. Initiation de la traduction

Avant que l'ARNm ne puisse être exporté vers le cytoplasme, les introns doivent être retirés grâce au processus d'épissage. Durant ce processus, le complexe EJC (Exon-Junction Complex) est recruté à environ 20-24 nucléotides en amont de chaque jonction exon-exon (Figure 1.15) (Le Hir et al., 2000). Ce complexe, formé des protéines Srm160, DEK, RNPS1, Y14 et REF, reste lié à l'ARNm lorsque ce dernier est exporté vers le cytoplasme (Le Hir et al., 2000, Kataoka et al., 2000, Kim et al., 2001). SKAR, qui est également en mesure d'être exporté du noyau vers le cytoplasme, est localisé au niveau du complexe EJC où il permet le recrutement de p70S6K1 une fois l'ARNm arrivé dans le cytoplasme (Ma et al., 2008). La déplétion de SKAR ou p70S6K1 diminuant l'efficacité de traduction d'ARNm ayant préalablement été épissés, ces deux protéines seraient impliquées dans l'activation de la traduction de ces ARNm lors de laquelle l'extrémité 5' est déroulée (Ma et al., 2008).



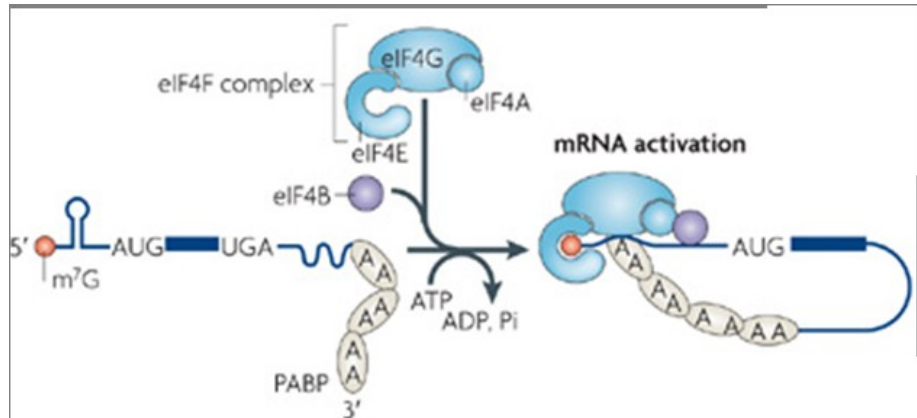
Adapté de Le Hir H. et Séraphin B., Cell, 2008, 133(2) :213-6

Figure 1.15. Stimulation de la traduction par mTORC1 grâce aux EJC

L'association entre SKAR et l'ARNm a lieu au niveau des EJC dans le noyau. Une fois exporté dans le cytoplasme, SKAR recrute S6K1 au niveau des EJC, permettant alors la traduction de l'ARNm.

Le 5' UTR de la majorité des ARNm possède une structure secondaire complexe ne permettant pas la liaison de ribosomes aux ARNm lors de l'initiation de la traduction. C'est pourquoi eIF4F et eIF4B participent à l'étape d'activation de l'ARNm durant laquelle la consommation d'ATP permet le déroulement de l'extrémité 5' de l'ARNm afin de le rendre accessible aux ribosomes (Figure 1.16) (Gingras et al., 1999b). eIF4F est en fait un complexe formé de eIF4A, eIF4E et eIF4G permettant le recrutement de ribosomes à l'extrémité 5' des ARNm (Gingras et al., 1999b). Alors que eIF4E permet la liaison de l'extrémité 5' des ARNm,

eIF4A possède une activité hélicase tandis que eIF4G est pour sa part une protéine d'échafaudage liant eIF4E, eIF4A, PABP (Poly(A)-Binding Protein) et eIF3 (Sonenberg et al., 1978, Rogers et al., 2001a, Gingras et al., 1999b). eIF4B permet de stimuler l'activité hélicase de eIF4A (Rogers et al., 2001b). La phosphorylation de eIF4B par p70S6K est impliquée dans le recrutement de eIF4B et eIF4A au complexe d'initiation de la transcription (Raught et al., 2004, Holz et al., 2005).



Adapté de Jackson J. R. *et al*, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2010, 11(2), 113-27
Figure 1.16. Régulation de l'activation de l'ARNm par mTORC1

4E-BP1 séquestre eIF4E, empêchant la formation du complexe eIF4F. Or, suite à l'activation de mTORC1, la phosphorylation de 4E-BP1 entraîne le relâchement de eIF4E qui peut alors contribuer à la formation du complexe eIF4F. L'activation de mTORC1 permet également la stimulation de l'activité hélicase de eIF4A grâce à la phosphorylation de eIF4B.

Sous sa forme hypophosphorylée, eIF4E interagit fortement avec 4E-BP1 (eIF4E Binding Protein 1), ce qui l'empêche de participer à la formation du complexe eIF4F (Pause et al., 1994). La phosphorylation des thréonines 37 et 46 de 4E-BP1 par mTORC1 est essentielle afin que la phosphorylation subséquente de la sérine 65 et de la thréonine 70 de 4E-BP1 puissent avoir lieu. Ces phosphorylations entraînent la dissociation de 4E-BP1 et eIF4E (Gingras et al., 1999a). eIF4E est alors en mesure de participer à la formation de complexes eIF4F et, par conséquent, à l'activation de l'ARNm lors de laquelle l'extrémité 5' de l'ARNm est déroulée (Gingras et al., 1999a). L'augmentation de l'expression de eIF4E est fréquente chez les cancers du poumon, de la vessie, du colon, du sein, de la prostate, du col de l'utérus,

des ovaires, de la thyroïde, de la tête et du cou (Nathan et al., 1997a, Pettersson et al., 2011, Seki et al., 2002, Crew et al., 2000, Nathan et al., 1997b, De Benedetti and Harris, 1999, Li et al., 2002, Lee et al., 2005, Matthews-Greer et al., 2005, Culjkovic and Borden, 2009, Berkel et al., 2001).

2.4.1.1.2. Élongation de la traduction

Lors de l'élongation de la traduction, eEF2 (eukaryotic Elongation Factor 2) permet la translocation du ribosome le long de l'ARNm. La phosphorylation de eEF2 par eEF2K inhibe ce facteur d'élongation. Afin que cette inhibition puisse être levée, la sérine 366 de eEF2K doit être phosphorylée par p70S6K (Wang et al., 2001). L'activation de mTORC1 entraîne donc l'activation de eEF2 grâce à l'inhibition de eEF2K, permettant ainsi l'élongation de la traduction.

2.4.1.1.3. Protéine ribosomale S6

La protéine S6 est une composante de la sous-unité ribosomale 40S dont les sérines 235, 236, 240, 244 et 247 peuvent être phosphorylées par p70S6K (Krieg et al., 1988, Banerjee et al., 1990, Kozma et al., 1990). Lorsque ces cinq sérines sont mutées en alanines, le taux de synthèse protéique et de division cellulaire est augmenté alors que la taille cellulaire est réduite en raison de défauts de croissance (Ruvinsky et al., 2005). La modulation de l'activité de S6 par mTORC1 permet donc la régulation de la synthèse protéique et de la croissance cellulaire. La surexpression de S6 et l'augmentation de sa phosphorylation sont fréquentes chez les cancers du poumon (Chen et al., 2014). La diminution des niveaux d'activité de S6 chez ces cellules permet d'induire un arrêt du cycle cellulaire en G0-G1 (Chen et al., 2014).

2.4.1.2. *Biogénèse ribosomale*

Afin de soutenir leur synthèse protéique accrue, les cellules cancéreuses doivent augmenter leur quantité de ribosomes. Ainsi, en plus de stimuler la synthèse protéique, mTORC1 favorise également la biogénèse ribosomale. En effet, la déplétion de p70S6K réduit les niveaux d'ARNm de plus de 75% des facteurs impliqués dans ce processus, dont Nop56, Nop14, Gar1, Rrp9, Rrp15, Rrp12 et Pwp2 (Chauvin et al., 2014). Ainsi, la déplétion de

p70S6K entraîne une diminution de l'activité transcriptionnelle des promoteurs de ces différents facteurs (Chauvin et al., 2014). Le même effet est observé chez des cellules possédant une forme mutée de S6 ne pouvant être phosphorylée par p70S6K, suggérant que S6 pourrait être responsable des effets de p70S6K dans la biogénèse ribosomale (Chauvin et al., 2014). p70S6K est fréquemment suractivé chez différents types de cancers dont les cancers du sein, chez lesquels une augmentation de la phosphorylation de p70S6K est observée dans 36% des cas (Noh et al., 2008). Les cancers du sein présentant une augmentation de phosphorylation de p70S6K possèdent généralement un moins bon pronostic que ceux chez lesquels l'activité de p70S6K n'est pas augmentée (Noh et al., 2008).

2.4.1.3. Synthèse lipidique

Les cellules cancéreuses se divisant constamment, leur synthèse lipidique est accrue. mTORC1 permet la régulation des facteurs de transcription SREBPs (Sterol Regulatory Element Binding Protein), qui contrôlent des gènes impliqués dans la lipogénèse. mTORC1 phosphoryle LIPIN1, inhibant ainsi sa translocation dans le noyau (Peterson et al., 2011). LIPIN1 étant une phosphatase inhibant SREBPs, ces-derniers sont alors activés, initiant ainsi la transcription de gènes associés à la lipogénèse (Peterson et al., 2011). Cependant, mTORC2 est également impliqué dans ce processus, en partie grâce à la phosphorylation de la sérine 473 de AKT, mais également par un mécanisme semblant être indépendant de AKT (Hagiwara et al., 2012, Yuan et al., 2012). L'activité de SREBP-1 est augmentée chez les glioblastomes et son inhibition entraîne un arrêt de la croissance cellulaire tout en favorisant l'apoptose (Guo et al., 2009, Guo et al., 2011).

2.4.1.4. Synthèse de nucléotides

Afin de soutenir leur division constante, les cellules cancéreuses doivent être en mesure de synthétiser suffisamment de nucléotides afin que leur ADN puisse être répliqué en phase S. mTORC1 participe à la synthèse nucléotidique en augmentant l'expression des gènes PPP (Pentose Phosphate Pathway) grâce à l'activation de SREBPs, stimulant ainsi la production de PPRP (5'-phosphoribosyl-1'-pyrophosphate) requis pour la synthèse de purines et de pyrimidines (Duvel et al., 2010). Le fait que mTORC2 soit aussi en mesure d'activer SREBPs laisse croire que ce complexe pourrait également stimuler l'expression des gènes

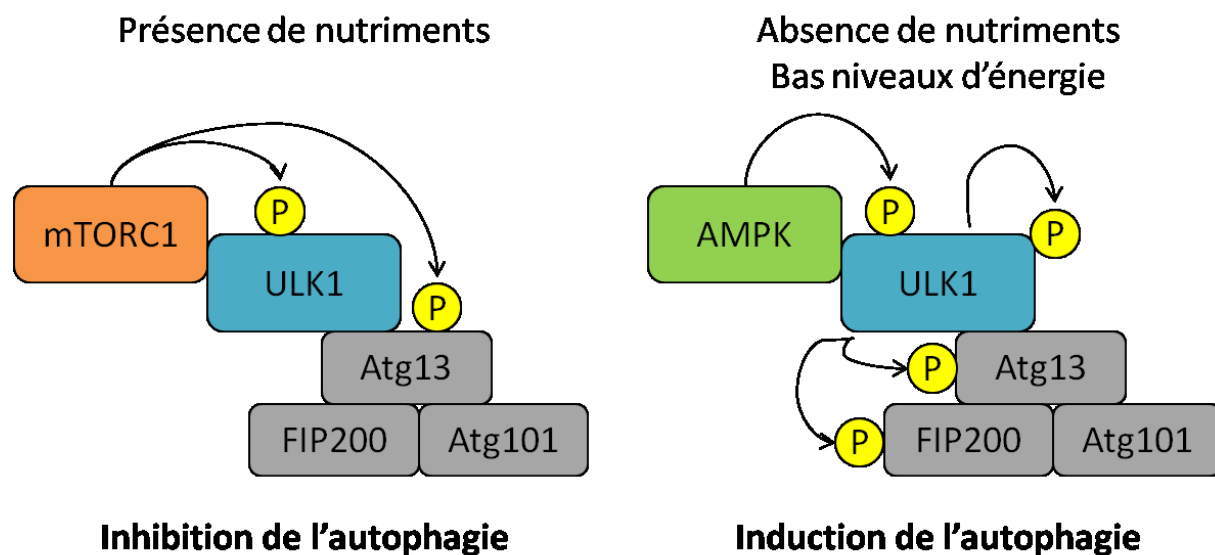
PPP, mais l'implication de ce complexe dans la synthèse de nucléotides reste à déterminer. p70S6K phosphoryle également la sérine 1859 de CAD (Gln-dependent carbamoyl-phosphate synthase, Asp carbamoyltransferase, Dihydroorotase), dont l'activation stimule la synthèse de pyrimidines *de novo* (Robitaille et al., 2013, Ben-Sahra et al., 2013). L'augmentation des niveaux de pyrimidines ainsi générée stimule la synthèse d'ADN et d'ARN de même que la progression de la phase S du cycle cellulaire (Ben-Sahra et al., 2013, Robitaille et al., 2013).

2.4.1.5. Autophagie

Lorsque les cellules sont soumises à un manque de nutriments, un stress quelconque ou encore une réduction des facteurs de croissance, celles-ci doivent adapter leur métabolisme en conséquence. Ainsi, en plus d'inhiber la croissance cellulaire, ces différentes conditions ont pour effet d'activer l'autophagie afin d'optimiser l'utilisation des quantités limitées d'énergie. Alors que l'autophagie favorise la survie cellulaire, l'activation de la voie mTOR chez les cellules cancéreuses entraîne l'inhibition de l'autophagie (Degenhardt et al., 2006). Ainsi, la perte d'un mécanisme contribuant à la survie cellulaire contribuerait à la progression tumorale. Ceci s'explique en partie par le fait que l'autophagie limite les stress métaboliques, protégeant ainsi le génome afin de prévenir l'instabilité génomique (Mathew et al., 2007, Karantza-Wadsworth et al., 2007). L'inhibition de l'autophagie chez les cellules cancéreuses contribuerait donc à l'instabilité génomique et, par conséquent, à la progression tumorale. En effet, l'inhibition de l'autophagie est associée à une augmentation des dommages à l'ADN, des amplifications de gènes et à l'aneuploidie (Mathew et al., 2007, Karantza-Wadsworth et al., 2007).

Lorsque les conditions sont propices à la croissance cellulaire, mTORC1 inhibe l'autophagie en maintenant ULK1/2 inactif grâce à la phosphorylation de sa sérine 757 et en phosphorylant Atg13 (Figure 1.17) (Jung et al., 2009, Ganley et al., 2009, Hosokawa et al., 2009a, Kim et al., 2011). L'interaction entre ULK1/2 et Atg13 permet de stabiliser et d'activer ULK1/2 (Jung et al., 2009). Ces deux protéines forment un complexe au sein duquel on retrouve également FIP200 (FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa) et Atg101, ce dernier étant impliqué dans la stabilisation de Atg13 (Jung et al., 2009, Ganley et al., 2009, Hosokawa et al., 2009a, Mercer et al., 2009, Hosokawa et al., 2009b).

Suite à l'inhibition de mTORC1, l'inhibition de ULK1/2 est levée, permettant ainsi à ULK1/2 de s'autophosphoryler et de phosphoryler Atg13 et FIP200 (Hosokawa et al., 2009a, Ganley et al., 2009, Jung et al., 2009, Chan et al., 2009). L'inhibition de mTORC1 entraîne également la localisation de ULK1/2 et Atg13 au niveau de l'autophagosome (Scott et al., 2007, Chan et al., 2007, Hosokawa et al., 2009a, Chan et al., 2009). Cependant, afin que ULK1 puisse initier l'autophagie, il doit également être phosphorylé par AMPK, qui phosphoryle les sérines 317 et 377 de ULK1 (Kim et al., 2011, Kim and Guan, 2011, Egan et al., 2011).



Adapté de Zhao M. Et Klionsky D.J., Cell Metabolism, 2011

Adapté de Zhao M. et Klionsky D. J., Cell Metabolism, 2011, 13(2) :119-20

Figure 1.17. Régulation de l'autophagie en fonction des niveaux de nutriments et d'énergie

En présence de nutriments, mTORC1 inhibe l'autophagie en phosphorylant ULK1 et Atg13. Au contraire, en absence de nutriments et lorsque les niveaux d'énergie diminuent, AMPK stimule l'autophagie en phosphorylant ULK1, qui phosphoryle à son tour ATG13, FIP200 en plus de s'autophosphoryler.

mTORC1 inhibe également l'autophagie en phosphorylant les sérines 142 et 211 de TFEB (Transcription Factor EB), un facteur de transcription régulant des gènes associés à la biogénèse lysosomale de même qu'à l'autophagie dont Lamp1 (Lysosomal-associated membrane protein 1) et Atg9b (Autophagy related 9B) (Settembre et al., 2011). La

phosphorylation de TFEB entraîne sa séquestration dans le cytoplasme où il interagit avec 14-3-3 (Settembre et al., 2012, Roczniak-Ferguson et al., 2012, Martina et al., 2012). Le recrutement de TFEB à la membrane lysosomale où est localisé mTORC1 est possible grâce aux GTPases Rag (Martina and Puertollano, 2013). Au contraire, la déphosphorylation de TFEB résultant de l'inhibition de mTORC1 entraîne la translocation de TFEB dans le noyau, où il est en mesure d'activer l'autophagie (Martina et al., 2012, Roczniak-Ferguson et al., 2012, Settembre et al., 2012).

2.4.1.6. Angiogénèse

La formation de nouveaux vaisseaux sanguins est essentielle afin que les tumeurs puissent croître. En conditions hypoxiques, l'angiogénèse est stimulée grâce à la stabilisation de HIF-1 α . Ce-dernier doit s'associer à HIF-1 β afin d'agir en tant que facteur de transcription, favorisant ainsi la transcription de gènes associés à l'angiogénèse dont VEGF (Forsythe et al., 1996, Jiang et al., 1996, Wang et al., 1995). mTORC1 contribue également à ce processus en augmentant les niveaux d'expression de HIF-1 α (Zhong et al., 2000, Zundel et al., 2000). D'ailleurs, chez des cellules de cancer de la prostate, l'activation de la voie mTOR résultant de la perte de PTEN corrèle avec une augmentation de l'angiogénèse (Giri and Ittmann, 1999).

2.4.2. Processus cellulaires contrôlés par mTORC2

2.4.2.1. Survie cellulaire

Les cellules cancéreuses possèdent la capacité d'éviter l'apoptose. Pour ce faire, différents mécanismes favorisant la survie cellulaire sont activés. mTORC2 est impliqué dans la régulation de la survie cellulaire grâce à AKT et SGK1 (Serum/Glucocorticoid Regulated Kinase 1). Tel que décrit précédemment, la phosphorylation de la sérine 473 d'AKT par mTORC2 permet la pleine activation d'AKT, qui est alors en mesure de phosphoryler TSC2 (Inoki et al., 2002). Cependant, parmi les substrats d'AKT, on retrouve également les facteurs de transcription FOXO1/3a (Forkhead Box O1/3a) qui régulent la transcription de gènes pro-apoptotiques parmi lesquels on retrouve FasL, Bim, 24p3 et Puma (Brunet et al., 1999, Gilley et al., 2003, Park et al., 2009, Devireddy et al., 2001, You et al., 2006). AKT est en mesure de phosphoryler la thréonine 32 de même que les sérines 253 et 315 de FOXO3, entraînant ainsi

la translocation de ce dernier du noyau vers le cytoplasme où il est alors séquestré grâce à son interaction avec 14-3-3 (Brunet et al., 1999). Au contraire, lorsque FOXO3 n'est pas phosphorylé par AKT, il est en mesure d'agir en tant qu'activateur de la transcription (Brunet et al., 1999). Ainsi, l'activation de d'AKT par mTORC2 empêche FOXO d'agir en tant qu'activateur transcriptionnel, prévenant ainsi la transcription de gènes pro-apoptotiques.

Tout comme AKT, l'activation de SGK1 par mTORC2 mène à la phosphorylation de FOXO1/3a, entraînant ainsi sa localisation au cytoplasme (Brunet et al., 2001). Cependant, alors que l'efficacité de ces deux kinases à phosphoryler la thréonine 32 de FOXO3a est similaire, SGK1 présente une préférence pour la sérine 315 de FOXO3a alors qu'AKT démontre pour sa part une préférence pour la sérine 253 de FOXO3a (Brunet et al., 2001). Ainsi, ces deux kinases coopèrent afin d'induire la translocation de FOXO3a dans le cytoplasme suite à l'activation de mTORC2. La localisation cytoplasmique de FOXO3a chez des patients atteints de cancer du sein corrèle généralement avec un faible taux de survie (Hu et al., 2004).

SGK1 contrôle également la survie cellulaire grâce à p53. p53 est un facteur de transcription régulant la transcription de nombreux gènes impliqués dans l'apoptose parmi lesquels figurent entre autre Bax (Miyashita et al., 1994), Puma (Nakano and Vousden, 2001), Noxa (Oda et al., 2000), Bid (Sax et al., 2002) et Apaf-1 (Kannan et al., 2001, Moroni et al., 2001, Robles et al., 2001). La liaison de MDM2 à p53 permet d'activer l'activité ubiquitine ligase de MDM2, qui catalyse alors l'ubiquitination de p53 engendrant sa dégradation protéolytique (Roth et al., 1998). SGK1 phosphoryle la sérine 166 de MDM2, augmentant ainsi l'ubiquitination de p53 par MDM2 (Amato et al., 2009). Ainsi, la dégradation de p53 résultant de la phosphorylation de MDM2 par SGK1 permet de prévenir l'apoptose, favorisant par conséquent la survie cellulaire. TP53 constitue le gène le plus fréquemment muté chez les cellules cancéreuses (Kandoth et al., 2013).

2.4.2.2. Organisation du cytosquelette d'actine

Vu son implication dans la régulation du cytosquelette d'actine, mTORC2 a rapidement été perçu comme une kinase pouvant potentiellement contribuer au processus de métastase. Alors que l'actine est normalement localisée principalement au niveau du cortex

cellulaire et de manière un peu diffuse dans le cytoplasme, elle est retrouvée principalement dans le cytoplasme alors que sa présence au niveau cortical est moins importante chez les cellules chez lesquelles Rictor a été déplété (Sarbasov et al., 2004). La localisation de la paxillin, une protéine adaptatrice retrouvée aux jonctions entre la membrane plasmique et le cytosquelette d'actine, est également altérée en absence de Rictor. En effet, la paxillin est principalement retrouvée aux extrémités des fibres d'actines en absence de Rictor alors qu'elle est plutôt retrouvée majoritairement en périphérie de la cellule lorsqu'il y a déplétion de Raptor (Sarbasov et al., 2004). La déplétion de Rictor permet de diminuer la phosphorylation de la tyrosine 118 de la paxillin, suggérant ainsi que mTORC2 serait responsable de cette phosphorylation (Jacinto et al., 2004).

mTORC2 permet la ré-organisation du cytosquelette via la modulation de l'activité de PKC α , protéine ubiquitaire régulant la forme et la motilité cellulaire (Sarbasov et al., 2004, Choe et al., 2003, Ng et al., 1999). On retrouve trois isoformes de PKC, soit PKC α , PKC μ et PKC ϵ . En revanche, seule la sérine 657 de PKC α peut être phosphorylée par mTORC2 (Sarbasov et al., 2004). La déplétion de Rictor diminue l'activité kinase de PKC α , suggérant ainsi que la phosphorylation de la sérine 657 de PKC α serait requise pour son activité (Sarbasov et al., 2004). Les niveaux d'expression de PKC α varient notamment en fonction du grade de différents cancers. En effet, chez les cancers de la vessie, de la prostate et de l'endomètre, les niveaux de PKC α sont augmentés lorsqu'il s'agit d'une tumeur de haut grade alors qu'ils sont plutôt diminués chez les tumeurs de bas grade (Langzam et al., 2001, Varga et al., 2004, Koren et al., 2004, Koren et al., 2000, Fournier et al., 2001).

La régulation du cytosquelette d'actine par mTORC2 impliquerait également la famille de GTPases Rho qui regroupe trois membres, soit Rho, Rac et Cdc42. Ces GTPases sont responsables de l'assemblage et du désassemblage des fibres d'actine F (Ridley et al., 1992, Ridley and Hall, 1992). En absence de Rictor, la quantité de Rac1 et de RhoA lié au GTP diminue, suggérant ainsi que mTORC2 régulerait l'activité de ces deux GTPases (Jacinto et al., 2004, Gulhati et al., 2011). La perte d'activité de Rac1 et RhoA observée suite à la déplétion de Rictor permet d'expliquer les défauts de polymérisation d'actine observés (Jacinto et al., 2004).

mTORC1 contribuerait également à l'organisation du cytosquelette d'actine. En effet, les complexes mTORC1 et mTORC2 régulent la migration et l'invasion chez le cancer colorectal en induisant des réarrangements du cytosquelette (Gulhati et al., 2011). Au contraire, l'inhibition de ces deux complexes permet d'inhiber l'établissement de métastases (Gulhati et al., 2011). La manière dont mTORC1 contribue à l'organisation du cytosquelette n'a cependant pas été expliquée. En revanche, puisque les complexes mTORC1 et mTORC2 se régulent mutuellement de diverses façons, il serait possible que la contribution de mTORC1 à l'organisation du cytosquelette passe en fait par mTORC2.

2.5. mTOR comme cible thérapeutique

2.5.1. Rapamycin et rapalogues

La contribution de l'activation de la voie mTOR à la progression tumorale revêtant une importance cruciale chez de nombreuses tumeurs, de nouvelles stratégies thérapeutiques visant cette kinase ont été développées. Le premier inhibiteur de mTORC1 ayant été considéré est la rapamycine, qui constitue un inhibiteur naturel de ce complexe (Brown et al., 1994). La rapamycine permet de freiner la croissance de lignées cellulaires dérivées de rhabdomyosarcomes (Dilling et al., 1994), de glioblastomes (Georger et al., 2001), de cancers pulmonaires (Seufferlein and Rozengurt, 1996), d'ostéosarcomes (Ogawa et al., 1998), de cancers pancréatiques (Grewe et al., 1999), de cancers du sein (Pang and Faber, 2001), de cancers de la prostate (van der Poel et al., 2003) et de lymphomes de cellules B (Muthukkumar et al., 1995). Cependant, le fait que la rapamycine soit relativement instable et très peu soluble dans des excipients parentéraux comme l'éthanol, le glycérol propylène, la glycérine, le Polysorbate 80 de même que le polyéthylène glycol 400 limite son utilisation pour le traitement contre le cancer (Simamora et al., 2001). C'est pourquoi de nombreux analogues de la rapamycin, également appelés rapalogues, furent développés. Le Temsirolimus fut le premier rapalogue à être approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) pour le traitement des carcinomes rénaux de stade avancé (Wander et al., 2011). Par la suite, l'Everolimus fut approuvé pour le traitement de la sclérose tubéreuse, une maladie génétique caractérisée par la mutation de TSC1/2 entraînant la formation de tumeurs bénignes (van Slegtenhorst et al., 1997, Populo et al., 2012). Cependant, dans de nombreux cas, les

rapalogues ne se sont pas montrés aussi efficaces que prévu. Les rapalogues sont des molécules dont les effets sont cytostatiques et non cytotoxiques, ce qui permet d'expliquer en partie le fait que les tumeurs recommencent à se développer dès l'arrêt du traitement (Roach and Sparagana, 2004). De plus, tout comme la rapamycine, les rapalogues inhibent mTORC1 sans toutefois inhiber mTORC2, lequel contribue également à la progression tumorale. Quant à l'activité de mTORC1, bien qu'étant diminuée, elle n'est pas totalement inhibée par les rapalogues. En effet, malgré le fait que les rapalogues inhibent la phosphorylation de p70S6K, la phosphorylation de 4E-BP1 n'est que partiellement inhibée et, par conséquent, la synthèse protéique ne peut être complètement inhibée (Choo et al., 2008, Choo and Blenis, 2009). Les nombreux mécanismes de rétroaction permettant la régulation de mTOR permettent également d'expliquer l'efficacité partielle des rapalogues (Populo et al., 2012).

2.5.2. Inhibiteurs de mTORC1/mTORC2/PI3K

Les résultats peu concluants obtenus avec les rapalogues ont mené au développement d'inhibiteurs liant le site de liaison de l'ATP de mTOR parmi lesquels figurent notamment Torin1, PP242 et PP30 (Thoreen et al., 2009, Feldman et al., 2009). Ces inhibiteurs sont donc en mesure d'inhiber les deux complexes mTOR, entraînant ainsi de meilleurs effets que les rapalogues au niveau de l'inhibition de la prolifération, de la phosphorylation de 4E-BP1 et de la synthèse protéique (Feldman et al., 2009, Thoreen et al., 2009). Ces inhibiteurs sont par conséquent plus efficaces que les rapalogues pour inhiber la croissance cellulaire de même que la prolifération (Thoreen et al., 2009).

Comme les nombreux mécanismes de rétroaction régulant mTOR affectent l'efficacité des rapalogues, des molécules permettant d'inhiber à la fois mTOR et PI3K ont été développées. Tout comme les inhibiteurs de mTORC1 et mTORC2, les inhibiteurs de PI3K/mTOR sont en mesure d'inhiber les deux complexes mTOR et sont par conséquent plus efficaces que les rapalogues.

2.5.3. Inhibiteurs de mTOR en thérapie combinée

Néanmoins, les différents types d'inhibiteurs de mTOR permettent de stabiliser les tumeurs sans toutefois entraîner leur régression. C'est pourquoi la possibilité de combiner des inhibiteurs de mTOR à d'autres agents chimiothérapeutiques a été étudiée. En effet, ces

combinaisons ont des effets additifs ou synergiques selon les cas lorsque des inhibiteurs de mTOR sont combinés au paclitaxel, carboplatin, cisplatine, vinorelbine, doxorubicine ou camptothécine (Grunwald et al., 2002, Mondesire et al., 2004, Steelman et al., 2008, Georger et al., 2001). Ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs de mTOR en thérapie combinée représente une avenue thérapeutique qui pourrait se montrer efficace pour le traitement de certains types de cancer.

2.5.4. Sensibilité aux inhibiteurs de mTOR

Différents facteurs peuvent affecter la sensibilité de cellules cancéreuses aux inhibiteurs de mTOR. Ainsi, le statut de mutations ou le niveau d'expression de différentes protéines permet de prédire la réponse à ces inhibiteurs. Par exemple, la perte du suppresseur tumoral VHL (Von Hippel-Lindau) augmente la sensibilité de cellules de carcinomes rénaux au CCI-779, un inhibiteur de mTOR (Thomas et al., 2006). La déplétion de KDM4A permet pour sa part d'augmenter la sensibilité aux inhibiteurs de mTOR (Van Rechem et al., 2015a). Différents polymorphismes nucléotidiques peuvent également affecter la sensibilité aux inhibiteurs de mTOR dont la mutation E482A (acide glutamique 482 en alanine) qui augmente l'ubiquitination et la dégradation de KDM4A (Van Rechem et al., 2015b). Ainsi, KDM4A E482A augmente la sensibilité aux inhibiteurs de mTOR PP242, BEZ235, JW-5-8-1, Torin et RAD001 (Van Rechem et al., 2015b). Les niveaux protéiques de KDM4A étant fréquemment diminués chez les cellules cancéreuses, l'utilisation d'inhibiteurs de mTOR chez ces cellules pourrait donc s'avérer pertinente (Black et al., 2013).

3. Hypothèse et objectifs de recherche

La récurrence des mutations de IDH1/2 au niveau des cellules cancéreuses ayant été observée récemment, les mécanismes oncogéniques régulés par ces mutations sont encore mal caractérisés. Une meilleure compréhension de ces mécanismes pourrait donc avoir des retombées thérapeutiques importantes. C'est pour cette raison que mon projet de recherche vise à identifier un nouveau mécanisme oncogénique régulé par les formes mutées de IDH1/2.

À la recherche de nouvelles voies oncogéniques régulées par les formes mutées de IDH1/2, nous avons observé que les patients atteints de gliomes arborant une mutation de

IDH1/2 ne possèdent pas de mutation de PTEN, qui est pourtant fréquemment muté chez les cellules cancéreuses. De même, les patients atteints de gliomes présentant une mutation de PTEN ne possèdent pas de mutation de IDH1/2. Cette exclusion mutuelle suggère fortement que la mutation de PTEN ne conférerait aucun avantage aux cellules cancéreuses possédant déjà une mutation de IDH1/2. Ainsi, les mutations de IDH1/2 pourraient être suffisantes afin de stimuler l'activité de mTOR. Sachant que l'accumulation de 2HG résultant des mutations de IDH1/2 mène à l'inhibition des enzymes α -kétoglutarate dépendantes, l'activité de mTOR pourrait alors être régulée par une de ces enzymes. Cette observation initiale nous a donc mené à poser l'hypothèse que **l'inhibition d'une enzyme α -kétoglutarate dépendante par le 2HG généré par les formes mutées de IDH1/2 stimule l'activité de mTOR, contribuant ainsi à la carcinogénèse.**

Mon projet de maîtrise comporte deux objectifs principaux. Le premier de ces objectifs est de déterminer l'impact des mutations de IDH1/2 sur l'activité de mTOR. Afin de déterminer si les effets observés étaient causés par le 2HG, nous avons également déterminé l'impact de cet oncométabolite sur l'activité de mTOR.

Le deuxième objectif constitue quant à lui à élucider le mécanisme permettant aux formes mutées de IDH1/2 de moduler l'activité de mTOR. À cette fin, nous nous sommes intéressés à l'effet de la déplétion de différentes enzymes α -kétoglutarate dépendantes sur l'activité de mTOR. En effet, le 2HG inhibant ces enzymes, une telle approche nous a permis d'identifier les meilleurs candidats pour la régulation de mTOR par le 2HG. Par la suite, nous avons utilisé différentes approches afin de déterminer le mécanisme permettant à une enzyme α -kétoglutarate dépendante de moduler l'activité de mTOR.

Chapitre 2: The oncometabolite 2-hydroxyglutarate activates the mTOR signaling pathway

Ce manuscrit est en préparation pour soumission au cours de l'année 2015.

Contribution des auteurs

Mélissa Carbonneau a participé à l'élaboration du projet, a généré la majorité des résultats, a participé à l'analyse des résultats et a contribué à la rédaction de l'article.

Marie-Anne Germain a performé le crible de siRNA (Figure 2) de même que les traitements avec le 2HG et l'AGI (Figure 4) et a contribué à la rédaction de l'article.

Laurence M. Gagné a performé les expériences avec l'inhibiteur de PI3K (Figure supplémentaire 3) et a contribué à la détermination des niveaux de DEPTOR suite à la déplétion de KDM4A (Figure 4).

Marie-Eve Lalonde a performé l'expérience d'inhibition de KDM4A par le 2HG (Figure supplémentaire 2).

Alena Motorina a participé à la génération de réactifs.

Frédéric A. Mallette et Marc-Étienne Huot ont élaboré et supervisé le projet, analysé les résultats et rédigé l'article.

The oncometabolite 2-hydroxyglutarate activates the mTOR signaling pathway

Mélissa Carbonneau^{1,2}, Marie-Anne Germain^{2*}, Laurence M. Gagné^{3*}, Marie-Eve Lalonde^{1,2}, Alena Motorina^{1,2}, Marc-Étienne Huot^{3,4,§}, Frédérick A. Mallette^{1,2,5,§}.

1. Département de Biochimie et Médecine moléculaire, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7.

2. Chromatin Structure and Cellular Senescence Research Unit, Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre, Montréal, Québec, Canada H1T 2M4.

3. Centre de Recherche sur le Cancer de l'Université Laval; Départements de Biologie moléculaire, biochimie médicale et pathologie; Université Laval ; Québec (Québec), Canada G1V 0A6

4. CHU de Québec – Axe Oncologie (Hôtel-Dieu de Québec); Québec City, Québec, Canada G1R 3S3.

5. Département de Médecine, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7.

* These authors contributed equally to this work.

Keywords: KDM4A, JMJD2A, mTOR, DEPTOR, IDH1, IDH2, hydroxyglutarate, oncometabolite, Rictor, Raptor.

Running title: KDM4A links TCA cycle defects to mTOR.

The identification of cancer-associated mutations in the tricarboxylic acid (TCA) cycle enzymes isocitrate dehydrogenases 1 and 2 (IDH1/2) highlight the prevailing notion that aberrant metabolic function can contribute to tumorigenesis. IDH1/2 normally catalyze the oxidative decarboxylation of isocitrate into α -ketoglutarate (α KG). In gliomas and acute myeloid leukemia, IDH1/2 mutations confer gain-of-function leading to production of the oncometabolite R-2-hydroxyglutarate (2HG) from α KG [1, 2]. However the precise molecular basis of 2HG-stimulated oncogenesis remains unclear. Here we show that generation of 2HG by mutated IDH1/2 leads to the activation of the serine/threonine kinase mTOR. Due to the structural similarity between 2HG and α KG, 2HG acts as an inhibitor of α KG-dependent enzymes including the JUMONJI family of lysine demethylases [3, 4]. Using an siRNA screen, we determined that depletion of the JUMONJI family member KDM4A (also known as JMJD2A) is sufficient to stimulate mTOR signaling. Furthermore, KDM4A is shown to physically interact with mTOR complex 1 (mTORC1) and 2 (mTORC2) via binding to the DEP domain-containing mTOR-interacting protein (DEPTOR), a negative regulator of mTORC1/2. In addition, depletion of KDM4A resulted in decreased levels of DEPTOR. Our results provide a molecular mechanism for the oncogenic activity of mutant IDH1/2 and identify a novel link between TCA cycle defects and positive modulation of mTOR function. The non-canonical regulation of mTOR by KDM4A revealed here represents a potential therapeutic target whereby oncogenic mTOR activity could be directly inhibited downstream of the canonical PI3K/Akt/TSC1-2 pathway.

To elucidate the oncogenic properties of mutated IDH1/2, we analyzed The Cancer Genome Atlas (TCGA) and deduced that mutations in IDH1/2 and PTEN (Phosphatase and TENsin homologue, an important tumor suppressor frequently disrupted in many cancers) display strong mutual exclusivity in low-grade glioma ($p < 0.00001$) and glioblastoma multiforme (GBM) ($p = 0.005$) (Fig. 1a). On the other hand, as previously reported [5, 6], mutations in the tumor suppressor tp53 often co-occur with IDH1/2 mutations in low-grade glioma ($p < 0.0001$) and GBM ($p < 0.00001$) (Fig. 2.1a). Thus it appears that major cancer networks can be strongly influenced by IDH1/2 gene status. Moreover, mutual exclusion between IDH1/2 and PTEN mutations suggests that PTEN mutation does not confer a growth advantage to tumors

carrying IDH1/2 mutations, in turn implying that such mutations might mimic PTEN loss or inactivation. PTEN governs multiple cellular functions such as survival, growth and energy metabolism by suppressing the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt/mechanistic target of rapamycin (mTOR) pathway. Indeed the serine/threonine kinase mTOR is frequently activated in human cancers by mutation of upstream negative regulators such as PTEN or TSC2 (for a review see [7]). Oncogenic activation of mTOR stimulates critical processes required for cancer cell survival, proliferation, angiogenesis, and metastasis [7]. Even though no PTEN mutations were observed in IDH1/2-mutated gliomas, the mTOR pathway is nonetheless activated in these tumors as demonstrated by elevated phosphorylation of the mTOR substrate Akt on serine 473 [8].

We decided to elucidate the mechanism by which IDH1/2 mutations might stimulate oncogenic mTOR signaling, thereby obviating the need for PTEN inactivation in gliomas. We first evaluated regulation of the mTOR pathway by IDH1/2 mutations. Murine embryonic fibroblasts (MEFs) retrovirally transduced with cancer-associated IDH1^{R132H} or IDH2^{R172K}, but not with wild-type counterparts, exhibited increased mTORC1 and mTORC2 signaling as indicated by enhanced phosphorylation (i) of both S6 and Rictor, substrates of the mTORC1-dependant kinase p70S6K, and (ii) of the mTORC2 substrate Akt (Fig. 2.1b). The level of stimulation of mTORC1 correlated with intracellular levels of the oncometabolite R-2-hydroxyglutarate (2HG) produced by mutant IDH1 and IDH2 (Fig. 2.1c). Since mTOR controls cell size [9], we determined the physiological response to activation of mTOR signaling by mutant IDH1/2 by using FACS to compare cell size of MEFs expressing IDH1^{R132H}, IDH2^{R172K} or an empty vector. Cells expressing mutated IDH1/2 were significantly larger than control cells (Fig. 2.1d and Supplementary Fig. 2.1a) and the cell size increase correlated with intracellular levels of 2HG (Fig. 2.1c). Treatment of IDH2^{R172K}-expressing cells with rapamycin (mTORC1 inhibitor) mitigated the effect on cell size, consistent with the requirement of mTORC1 for this phenotype (Fig. 2.1e). In addition, treatment with rapamycin or Torin1 (mTORC1/2 inhibitor) abrogated S6 phosphorylation on serines 240/244 in IDH1/2 mutant-expressing cells, confirming the activation of mTORC1-dependent p70S6K by 2HG-producing mutants (Fig. 2.1f).

To evaluate whether 2HG per se is responsible for activation of mTORC1/2, we synthesized cell permeable 1-octyl-D-2-hydroxyglutarate (octyl-2HG) [10]. Treatment of cells

with octyl-2HG led to activation of mTORC1/2 as evaluated by accumulation of phosphorylated p70S6K, S6, Rictor and Akt in MEFs and HeLa cells (Fig. 2.1g and Supplementary Fig. 2.1b). Furthermore, treatment with octyl-2HG was sufficient to generate an increase in cell size (Fig. 2.1h), consistent with the activation of mTOR by the oncometabolite 2HG.

Previous studies clearly demonstrate that 2HG produced by mutated IDH1/2 inhibits the activity of α KG-dependent enzymes such as the JUMONJI family of lysine demethylases and TET family of 5-methylcytosine hydroxylases [3, 4]. To evaluate the possibility that one or more enzymes comprising these two families is/are responsible for regulation of mTORC1 activity, we performed a targeted siRNA screen in HeLa cells, employing S6 phosphorylation on serines 240 and 244 as functional readout of mTOR activity. Depletion of KDM4A potently stimulated phosphorylation of S6 (Fig. 2.2a). The KDM4 sub-family comprises four members (KDM4A, KDM4B, KDM4C, and KDM4D) which are Fe(II)- and α KG-dependent enzymes possessing a JmjC catalytic domain [11, 12]. KDM4A-C display similar structures including JmjN domain, tandem PHD and tandem tudor domain while KDM4D lacks PHD and tandem tudor domains. KDM4A-C catalyze demethylation of di- and tri-methylated H3K9 and H3K36, while KDM4D is specific for H3K9(me2/3) [12-15]. KDM4A also possesses a tandem tudor domain which can bind to both H3K4(me2/3) and H4K20(me2/3) [16, 17]. KDM4A, which modulates critical cellular processes including the DNA damage response [18], cellular senescence [19], transcription [14, 20] and DNA replication [21, 22], is profoundly inhibited by 2HG (Supplementary Fig. 2.2) [3]. Knockdown of KDM4A using three different shRNAs led to increased phosphorylation of mTORC1-dependent p70S6K substrates S6 and Rictor (Fig. 2.2b), thus validating our siRNA screening results. Moreover KDM4A-depleted cells were larger than cells treated with siGFP, and treatment with the mTORC1 inhibitor rapamycin abrogated this phenotype (Fig. 2.2c). We emphasize that the entire KDM4 family shares common substrates; nonetheless KDM4A was the sole family member to influence mTORC1 activity, as depletion of KDM4B-D had no impact on phosphorylation of S6 and Rictor (Fig. 2.2d).

To elucidate the molecular mechanism involved in the control of mTOR kinase activity by KDM4A, we evaluated whether the latter might modulate transcriptional levels of either PTEN/Akt/mTOR pathway regulators or mTORC1/2 complex components. Upon depletion of

KDM4A in HeLa cells, no significant changes in mRNA levels were observed for either PTEN or Tuberous sclerosis 1/2 (TSC1/2) (Fig. 2.3a). TSC1/2 is a GTPase-activating protein complex which maintains Rheb (Ras homolog enriched in brain) in an inactive form, thereby causing mTOR inhibition [23-25]. In addition, mRNA levels of Rheb, mTOR, DEPTOR, or the upstream activating kinase PDK1 were unaltered or very modestly changed following KDM4A depletion (Fig. 2.3a). Similar observations were made at the protein level for KDM4A-depleted cells, where expression of PTEN, TSC2, mTOR and Rictor remained constant (Supplementary 2.3a). Interestingly, KDM4A knockdown had no impact on phosphorylation of Akt at threonine 308, a site phosphorylated by PDK1 after PI3K activation, suggesting that activation of mTORC1 occurs downstream PDK1/Akt (Supplementary Fig. 2.3a). This was further confirmed by the fact that pharmacological PI3K inhibition using CAL-101 did not block activation of mTORC2 upon depletion of KDM4A, as observed by the increased phosphorylation of Akt^{S473} (Supplementary Fig. 2.3b). Furthermore, knockdown of KDM4A in rapamycin-treated cells still caused activation of mTORC2, implying mTORC1-independent modulation of mTORC2 by KDM4A (Supplementary Fig. 2.3b).

Since the control exerted by KDM4A on mTOR activity seems to occur downstream of PTEN-PDK1-Akt-TSC1/2, we investigated the possibility that KDM4A might directly interact with mTORC1/2 complexes. Consistent with this, KDM4A co-immunoprecipitated numerous members of mTORC1 and mTORC2 including mTOR, Raptor, Rictor, mSin1 and DEPTOR (Fig. 2.3b and Supplementary Fig. 2.4a-c). We then qualitatively compared the amount of mTORC1/2 components interacting with mTOR or KDM4A. Flag-tagged KDM4A modestly interacted with mSin1 and Raptor when compared to the amount co-immunoprecipitated with mTOR. On the other hand, both KDM4A and mTOR immunoprecipitated similar amounts of DEPTOR (Fig. 2.3c and Supplementary Fig. 2.4d), suggesting that DEPTOR might represent the major mTORC1/2 component interacting with KDM4A. We confirmed the interaction between DEPTOR and KDM4A in cells co-expressing the exogenous tagged proteins (Fig. 2.3d). Conversely, ectopic Flag-tagged DEPTOR co-immunoprecipitated endogenous KDM4A (Fig. 2.3e). Individual depletion of mTOR or mSin1 did not alter the binding of KDM4A and DEPTOR, supporting our hypothesis that DEPTOR is the major mTORC1/2 component interacting with KDM4A (Supplementary Fig. 2.5a-b). DEPTOR is an endogenous negative regulator of mTOR activity [26] and its stability is tightly regulated via mTOR by an

SCF(β TrCP) E3 ubiquitin ligase complex in response to growth signals [27-29]. We performed a fractionation assay to confirm that KDM4A and DEPTOR localize to the same sub-cellular compartments. While DEPTOR is mostly cytoplasmic, KDM4A was present in both the nucleus and cytoplasm (Supplementary Fig. 2.6a-b) [30]. We then sought to determine the impact of KDM4A on DEPTOR protein levels. Depletion of KDM4A led to a significant decrease in DEPTOR protein levels (Fig. 2.4a). Depletion of KDM4A destabilized DEPTOR protein after serum stimulation (Fig. 2.4b-c). Confirming that the inhibition of KDM4A reduces protein levels of DEPTOR, expression of the 2HG-producing IDH1^{R132H} mutant caused a diminution in DEPTOR levels (Fig. 2.4d). Treatment of the human fibrosarcoma cell line HT1080, bearing a heterozygous IDH1^{R132C} mutation, with the mutated IDH1-specific inhibitor AGI-5198 [31] caused a marked decrease in mTORC1/2 activity (Fig. 2.4e-f) showing that 2HG-mediated inhibition of KDM4A is indeed responsible for activation of mTOR. This suggests that a cancer therapeutic regimen designed to inhibit mutated IDH1/2 would be expected to reduce oncogenic mTOR activity.

To evaluate the impact of IDH mutations on activation of mTOR in central nervous system-derived cells, we retrovirally transduced immortalized normal human astrocytes (NHAs) with an empty vector, wild type IDH1, or IDH1^{R132H}. NHAs expressing mutant IDH1 displayed higher levels of p-Akt^{S473} (Fig. 2.4g) associated with increased accumulation of intracellular 2HG (Fig. 2.4h). In addition, treatment of NHAs with octyl-2HG led to the activation of mTORC1 and mTORC2, as indicated by increased p-S6^{S240/244} and p-Akt^{S473} respectively (Fig. 2.4i).

Amplification of gene copy number and mRNA expression of KDM4A has been reported in various cancer types, in which KDM4A can promote site-specific genomic amplification [22] or hinder p53 activation and senescence [19]. Interestingly, genomic loss of KDM4A and concomitant decrease in mRNA has been observed in multiple cancer types (Supplementary Fig. 2.7) [22], and specifically in bladder cancer where loss of KDM4A correlates with tumor progression [32]. Our results suggest that decreased expression of KDM4A could potentially contribute to mTOR activation in various cancer types, and that KDM4A might act as a context-dependent oncogene.

Recent evidence demonstrates that mTORC1 controls mitochondrial activity [33] and stimulates metabolism of glutamine [34], an amino acid catabolized into α KG, suggesting that

mTOR modulates the TCA cycle. Here we show for the first time that defects in the TCA cycle can lead to aberrant activation of mTOR kinase. Indeed our data provide strong evidence that KDM4A directly interacts with DEPTOR, and that 2HG-mediated inhibition of KDM4A in IDH1/2-mutated cells impacts DEPTOR stability thus stimulating mTOR signaling (Fig. 4j). It has been suggested that IDH1/2 mutations may cause cell differentiation defects by impairing histone demethylation [10]. The novel PTEN/PI3K-independent mode of mTORC1/2 activation by 2HG revealed here may provide an additional molecular mechanism to explain the oncogenic activity of IDH1/2 mutation in gliomas, and suggests a potential therapeutic avenue involving negative modulation of mTORC1/2.

METHODS

Cell culture

293T, HeLa, p53^{-/-} murine embryo fibroblasts (MEFs), normal human astrocytes immortalized by hTERT (NHA-hTERT), HT1080 and 293E were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone), 1% Sodium pyruvate (Gibco) and 1% penicillin/streptomycin (Gibco).

Plasmids and Transfections

Cells were transfected with 10µg of DNA using 30µg of linear polyethylenimine (PEI). The following vectors were used: pCDNA3.1 Flag-eYFP, pLPC Flag-KDM4A, pCMV-Sport6-Flag-mTOR, pRK5 Myc-mTOR, pMSCV HA-DEPTOR, pRK5 Myc-Raptor, pRK5 Myc-Rictor and pRK5 Flag-DEPTOR.

Lentiviral and retroviral infections

Lentiviral particles were generated by transfecting 293T cells using 5µg of shRNA plasmid, 3,75µg of psPAX2 packaging plasmid and 1,25µg pMD2.G envelope plasmid. Media was changed 24 hours after transfection and lentiviral particles were harvested 24 hours later. Viral supernatant was filtered through 0.45 µm filters and supplemented with 8 µg/ml polybrene and 10% FBS. Viruses were titrated using limiting dilution in HeLa cells and the same MOI was used for each condition. The following plasmids were used: pLKO.1-sh_Control, pLKO.1-sh_KDM4A#3 (RHS3979-201745071, Dharmacon), pLKO.1-sh_KDM4A#5 (RHS3979-201745073, Dharmacon), pLKO.1-sh_KDM4A#7 (RHS3979-201745075, Dharmacon), pLKO.1-sh_mTOR#53 (TRCN0000195453, Sigma), pLKO.1-sh_mTOR#84

(TRCN0000039784, Sigma), pLKO.1-sh_mSin1#1 (13483, Addgene) and pLKO.1-sh_mSin1#2 (13484, Addgene).

Retroviruses were produced by transfecting packaging cells (Phoenix) with 10 μ g of DNA using 30 μ g of PEI. Media was changed 24 hours later and viral supernatant harvested at 48 and 56 hours post-transfection. Viral supernatants were filtered through 0.45 μ m filters and supplemented with 8 μ g/ml polybrene and 10% FBS. Media was changed 16 hours after infection. Retroviral plasmids pLPCX IDH1^{WT} Flag, pLPCX IDH1^{R132H} Flag, pLPCX IDH2^{WT} Flag and pLPCX IDH2^{R172K} Flag are described in [35]. The pLXSN IDH1^{WT} Flag and pLXSN IDH1^{R132H} Flag were generated by PCR of the IDH1 genes (forward primer with EcoRI site : 5'-TAGAATTCATGTCCAAAAAATCAGTGG-3', reverse primer with XhoI site and Flag tag : 5'-ACCTCGAGTTACTTGTTCATCGTCATCCTTGTAATCCATAAGTTTGGCCTG-3'). PCR products were inserted into the EcoRI- and XhoI-linearized pLXSN vector.

FACS-cell size determination

Cells were trypsinized and resuspended in PBS containing 2% FBS. Forward-scatter measurement (FSC) intensity was measured using BD FACSCalibur (BD Biosciences) and analyzed with BD CellQuest Pro software (BD Biosciences).

Cell lysis, immunoblots and antibodies

Cells were lysed in 10mM Tris (pH 7.4), 120mM NaCl, 0.5% Triton with protease inhibitor mix (Complete, Roche) and phosphatase inhibitors (PhosphoStop, Roche), and sonicated for 3x10 seconds. After centrifugation at 13,000 rpm for 10 minutes, proteins were separated on SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose or PVDF membranes (Bio-Rad). Primary antibodies used were anti-Flag (M2, Sigma, 1:5000), anti-HA.11 (16B12, Covance, 1:1000), anti-Myc (9E10, Sigma, 1:1000), anti- α -Tubulin (B-5-1-2, Sigma, 1:10000), anti-KDM4A (NB110-40585, Novus Biologicals, 1:1000), anti-mTOR (2972, Cell Signaling, 1:1000) (7C10, Cell Signaling, 1:1000), anti-DEPTOR (ABS222, Millipore, 1:1000), anti-DEPTOR (D9F5, Cell Signaling, 1:500), anti-DEPTOR (NBP1-49674, Novus Biologicals, 1:1000), anti-G β L (PA5-17442, Thermo Scientific, 1:1000), anti-Raptor (24C12, Cell Signaling, 1:1000), anti-phospho-Raptor S792 (2083, Cell Signaling, 1:1000), anti-PRAS40 (PA5-17184, Thermo Scientific, 1:1000), anti-Rictor (53A2, Cell Signaling, 1:1000), anti-phospho-RictorT1135 (D30A3, Cell Signaling, 1:1000), anti-mSin1 (07-2276, Millipore, 1:1000), anti-Protor2 (D19A5, Cell Signaling, 1:1000), anti-PTEN (A2B1, Santa Cruz, 1:1000), anti-TSC2 (T.309-0

Thermo Scientific, 1:1000), anti-p70S6K (9202, Cell Signaling, 1:1000), anti-phospho-p70S6KT389 (108D2, Cell Signaling, 1:1000), anti-S6 (54D2, Cell Signaling, 1:1000), anti-phospho-S6S240/244 (5364 and 2215, Cell Signaling, 1:1000), anti-Akt PH domain (05-591, Millipore, 1:1000), anti-phospho-AktS473 (9271, Cell Signaling, 1:1000) (D9E, Cell Signaling, 1:1000), anti-phospho-AktT308 (C31E5E, Cell Signaling, 1:1000), anti-actin (D6A8, Cell Signaling, 1:2000) and anti-GAPDH (D16H11, Cell Signaling, 1:2000).

Immunoprecipitations

Cells were lysed in 1ml of lysis buffer (0.3% CHAPS, 50mM Hepes, 2mM EDTA with protease inhibitor mix and phosphatase inhibitors (Roche)) and sonicated three times for 10 seconds each. After centrifugation at 13,000rpm for 10 minutes, the supernatant was incubated for 2 hours at 4°C with 20µl of Flag M2 agarose beads (Sigma). Immunoprecipitates were washed three times with lysis buffer containing 150mM NaCl and twice with TBS before elution in laemmli buffer.

Protein stability assay

For half-life measurements, HeLa cells were starved for 24h and pre-treated with 100µg/ml cycloheximide and 40µg/ml chloramphenicol 1h prior to serum addition (10%). Cells were harvested at indicated time periods and whole cell lysates blotted. Protein levels were normalized to tubulin and quantified using ImageJ.

Metabolite extraction and quantification of 2HG

Quantitation of citric acid cycle (CAC) organic acid intermediates was carried out at the Goodman Cancer Research Center metabolomics core facility (McGill University, Montreal, QC, Canada). Following cellular extraction and keto-acid reduction, GC/MS data were collected and analysed as described in detail [36] except that 4 µl of the deuterated CAC standard mix was added due to the high level of 2-hydroxyglutaric acid in mutant IDH1/2-expressing cells. Resulting levels of CAC intermediates were normalized against cell number.

Synthesis of 1-octyl-D-2-hydroxyglutarate

Synthesis of 1-octyl-D-2-hydroxyglutarate was performed as previously described [10]. Briefly, commercial R(-)-tetrahydro-5-oxofuran-2-carboxylic acid (910 mg, 7 mmol) was dissolved in water (1ml), cooled to 0 °C, and treated with 1 N KOH (14.7 ml, 14.7 mmol). After stirring, the solution was desiccated under reduced pressure, co-evaporated with EtOH, and dried. The white salt obtained was partially dissolved in trifluoroacetic anhydride (50 ml)

and the solution evaporated under reduced pressure. Anhydrous THF (45 ml) was then used to dry and dissolve the residue and octanol (2.3 ml, 14.7mmol) was added to the resulting solution. After stirring overnight, water was added to quench the reaction and the mixture extracted with EtOAc. The extracts were combined, dried over MgSO₄, concentrated, and purified by flash chromatography eluting with Hexanes-EtOAc 3:1 to 1:1 giving 1-octyl-D-2-hydroxyglutarate (70 mg, 7 %) as an oil. ¹H NMR (CD₃OD) δ: 4.19 (m, 1H), 4.15 (m, 2H), 2.51-2.36 (m, 2H), 2.12-2.04 (m, 1H), 1.94-1.85 (m, 1H), 1.70-1.63 (m, 2H), 1.40-1.31 (m, 10H), 0.90 (t, 3H, J = 6.8Hz); MS (APCI neg) 259.05 [M-H]⁻.

siRNA screen targeting αKG-dependent oxygenases

HeLa cells were transfected using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) using reverse transfection protocol supplied by the manufacturer. Briefly, 20 nM siRNA duplexes and 10 μl RNAiMAX lipofectamine (Invitrogen) were diluted in 1 ml OPTI-MEM (Invitrogen) in 6mm plates and incubated for 15 minutes prior to adding 600,000 cells per plate. Three days following transfection, cells were lysed in 10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, pH 7.6 with protease inhibitor mix and phosphatase inhibitors (Roche), sonicated 3 times for 10 seconds, then centrifuged for 10 min at 10,000 RPM. Supernatants were then analyzed by Western blotting for total S6 or phospho-S6^{S240/244}, and quantification of band intensity was performed using ImageJ. All siRNAs were purchased from ThermoScientific (Dharmacon). For a complete list of siRNAs, see Supplementary table I.

Immunofluorescence

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 5 min at room temperature and permeabilized with 1% Triton X-100 in PBS for 5 min at room temperature. Fluorescent visualization of KDM4A was performed using pAb anti-KDM4A antibody (1:100, NB110-40585; Novus Biologicals) coupled with an Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) secondary antibody. Polymerized actin was visualized using CFTM568 phalloidin (catalog no. 00044-300U; Biotium). DNA was stained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Immunofluorescent images were captured using a 60x lens (1.42 NA, splan APO) mounted on an FV1000 confocal laser scanning microscope driven by FluoView software (Olympus). Image acquisition was performed at room temperature, the brightness/contrast tool in FluoView software (Olympus) was used to process images, and montages were made using Photoshop CS6 (Adobe).

Cell fractionation

Harvested cells were suspended in cold extraction buffer (10mM Hepes (pH 7,4), 5mM MgCl₂, 320mM sucrose and 1% Triton X-100), agitated for 10 seconds, and incubated on ice for 10 minutes. Cells were centrifuged at 2,000g and the supernatant (cytoplasmic fraction) collected while the pellet (nuclear fraction) was washed 2 times with 10mM Hepes (pH 7,4) containing 5mM MgCl₂ and 320mM sucrose.

Quantitative real-time PCR

Total RNA was isolated using Trizol (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. The High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit was used with random primers (Applied Biosystems) to reverse transcribe 2µg of total RNA in a final volume of 20µL. GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), TBP (TATA binding protein), HPRT1 (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase) and ACTB (Beta-actin) were used as endogenous controls and their gene expression levels determined using pre-validated Taqman Gene Expression Assays (Applied Biosystems). qPCR reactions were performed in 384 well plates using 1.5 µl of cDNA samples (5-25 ng), 5µl of the TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0.5 µl of the TaqMan Gene Expression Assay (20X) and 3 µl of water in a final volume of 10 µl. The assays used to determine target gene expression levels were designed using the Universal Probe Library from Roche (www.universalprobelibrary.com). qPCR reactions for target genes were performed in 384 well plate using 1.5 µl of cDNA samples (5-25 ng), 5 µl of the TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 2 µM of each primer, and 1 µM of UPL probe in a final volume of 10 µl. Amplification levels were detected using the ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) programmed to run at 95°C for 3 minutes before starting 40 cycles of 5 sec at 95°C and 30sec at 60°C. Reactions were run in triplicate and the quantification performed using average Cts values. The $\Delta\Delta$ CT method was used to determine relative quantification of target genes.

Acknowledgements

The authors thank (i) Drs. Albert Lai, Nada Jabado, Mathieu Laplante and Philippe P. Roux for sharing reagents; (ii) Drs. Elliot Drobetsky, Ivan Topisirovic, Florence Couteau, Gerardo Ferbeyre and El Bachir Affar for providing reagents, fruitful discussions, and critical reading

of the manuscript; (iii) Mathieu Neault for artwork; (iv) the organic synthesis service of the Centre de Recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Québec (CRCHUQ, Québec, Canada) for synthesis of 1-octyl-D-2-hydroxyglutarate; (v) Raphaëlle Lambert and the Genomics core facility of the Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC, Montréal, Canada); and (vi) Drs Russell G. Jones and Daina Avizonis (Rosalind and Morris Goodman Cancer Research Centre Metabolomics Core Facility; supported by the Canada Foundation of Innovation, The Dr. John R. and Clara M. Fraser Memorial Trust, Terry Fox Foundation Team Grant #116128, and McGill University) for metabolite measurements. This study was supported by grants from the Fondation de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, the Cole Foundation, and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR, MOP-133442), to F.A.M, and from the CIHR (MOP-286437) to M.-E.H. A.M. is recipient of Ph.D. studentships from the Cole Foundation and the Fonds de Recherche du Québec - Santé (FRQS). M.-E.L. received a post-doctoral fellowship from the CIHR. M.-E.H. and F.A.M. are Junior 1 Research Scholars of the FRQS.

Author contributions

M.C., M.-E.H. and F.A.M. designed the study. M.C. performed most of the experiments, M.-A.G. performed the siRNA screen and treatments with 2HG and AGI-5198. L.M.G. performed the experiments with the PI(3)K inhibitor, and determined DEPTOR levels after KDM4A depletion. M.-E.L. performed the experiment on 2HG-mediated inhibition of KDM4A. A.M. generated reagents and tools. M.C., M.-A.G, M.-E.H. and F.A.M wrote the paper. All authors discussed the results and commented on the manuscript at all stages.

Author information

The authors declare no competing financial interests. Correspondence and requests for materials should be addressed to F.A.M or M.-E.H.

References

1. Dang, L., et al., *Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate*. *Nature*, 2009. 462(7274): p. 739-44.
2. Ward, P.S., et al., *The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate*. *Cancer Cell*, 2010. 17(3): p. 225-34.
3. Chowdhury, R., et al., *The oncometabolite 2-hydroxyglutarate inhibits histone lysine demethylases*. *EMBO Rep*, 2011. 12(5): p. 463-9.
4. Xu, W., et al., *Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases*. *Cancer Cell*, 2011. 19(1): p. 17-30.
5. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Genetic profile of astrocytic and oligodendroglial gliomas*. *Brain Tumor Pathol*, 2011. 28(3): p. 177-83.
6. Liu, X.Y., et al., *Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations*. *Acta Neuropathol*, 2012. 124(5): p. 615-25.
7. Laplante, M. and D.M. Sabatini, *mTOR signaling in growth control and disease*. *Cell*, 2012. 149(2): p. 274-93.
8. Pollack, I.F., et al., *IDH1 mutations are common in malignant gliomas arising in adolescents: a report from the Children's Oncology Group*. *Childs Nerv Syst*, 2011. 27(1): p. 87-94.
9. Fingar, D.C., et al., *Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E*. *Genes Dev*, 2002. 16(12): p. 1472-87.
10. Lu, C., et al., *IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation*. *Nature*, 2012. 483(7390): p. 474-8.
11. Tsukada, Y., et al., *Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins*. *Nature*, 2006. 439(7078): p. 811-6.
12. Whetstine, J.R., et al., *Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases*. *Cell*, 2006. 125(3): p. 467-81.
13. Cloos, P.A., et al., *The putative oncogene GASC1 demethylates tri- and dimethylated lysine 9 on histone H3*. *Nature*, 2006. 442(7100): p. 307-11.

14. Klose, R.J., et al., *The transcriptional repressor JHDM3A demethylates trimethyl histone H3 lysine 9 and lysine 36*. *Nature*, 2006. 442(7100): p. 312-6.
15. Shin, S. and R. Janknecht, *Diversity within the JMJD2 histone demethylase family*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. 353(4): p. 973-7.
16. Huang, Y., et al., *Recognition of histone H3 lysine-4 methylation by the double tudor domain of JMJD2A*. *Science*, 2006. 312(5774): p. 748-51.
17. Lee, J., et al., *Distinct binding modes specify the recognition of methylated histones H3K4 and H4K20 by JMJD2A-tudor*. *Nat Struct Mol Biol*, 2008. 15(1): p. 109-11.
18. Mallette, F.A., et al., *RNF8- and RNF168-dependent degradation of KDM4A/JMJD2A triggers 53BP1 recruitment to DNA damage sites*. *EMBO J*, 2012. 31(8): p. 1865-78.
19. Mallette, F.A. and S. Richard, *JMJD2A Promotes Cellular Transformation by Blocking Cellular Senescence through Transcriptional Repression of the Tumor Suppressor CHD5*. *Cell Rep*, 2012. 2(5): p. 1233-43.
20. Zhang, D., H.G. Yoon, and J. Wong, *JMJD2A is a novel N-CoR-interacting protein and is involved in repression of the human transcription factor achaete scute-like homologue 2 (ASCL2/Hash2)*. *Mol Cell Biol*, 2005. 25(15): p. 6404-14.
21. Black, J.C., et al., *Conserved antagonism between JMJD2A/KDM4A and HP1gamma during cell cycle progression*. *Mol Cell*, 2010. 40(5): p. 736-48.
22. Black, J.C., et al., *KDM4A Lysine Demethylase Induces Site-Specific Copy Gain and Rereplication of Regions Amplified in Tumors*. *Cell*, 2013. 154(3): p. 541-55.
23. Garami, A., et al., *Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2*. *Mol Cell*, 2003. 11(6): p. 1457-66.
24. Inoki, K., et al., *Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling*. *Genes Dev*, 2003. 17(15): p. 1829-34.
25. Tee, A.R., et al., *Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb*. *Curr Biol*, 2003. 13(15): p. 1259-68.
26. Peterson, T.R., et al., *DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival*. *Cell*, 2009. 137(5): p. 873-86.

27. Duan, S., et al., *mTOR generates an auto-amplification loop by triggering the betaTrCP- and CK1alpha-dependent degradation of DEPTOR*. Mol Cell, 2011. 44(2): p. 317-24.
28. Gao, D., et al., *mTOR drives its own activation via SCF(betaTrCP)-dependent degradation of the mTOR inhibitor DEPTOR*. Mol Cell, 2011. 44(2): p. 290-303.
29. Zhao, Y., X. Xiong, and Y. Sun, *DEPTOR, an mTOR inhibitor, is a physiological substrate of SCF(betaTrCP) E3 ubiquitin ligase and regulates survival and autophagy*. Mol Cell, 2011. 44(2): p. 304-16.
30. Van Rechem, C., et al., *Lysine Demethylase KDM4A Associates with Translation Machinery and Regulates Protein Synthesis*. Cancer Discov, 2015.
31. Rohle, D., et al., *An inhibitor of mutant IDH1 delays growth and promotes differentiation of glioma cells*. Science, 2013. 340(6132): p. 626-30.
32. Kauffman, E.C., et al., *Role of androgen receptor and associated lysine-demethylase coregulators, LSD1 and JMJD2A, in localized and advanced human bladder cancer*. Mol Carcinog, 2011. 50(12): p. 931-44.
33. Morita, M., et al., *mTORC1 controls mitochondrial activity and biogenesis through 4E-BP-dependent translational regulation*. Cell Metab, 2013. 18(5): p. 698-711.
34. Csibi, A., et al., *The mTORC1 pathway stimulates glutamine metabolism and cell proliferation by repressing SIRT4*. Cell, 2013. 153(4): p. 840-54.
35. Li, S., et al., *Overexpression of isocitrate dehydrogenase mutant proteins renders glioma cells more sensitive to radiation*. Neuro Oncol, 2013. 15(1): p. 57-68.
36. Mamer, O., et al., *The complete targeted profile of the organic acid intermediates of the citric acid cycle using a single stable isotope dilution analysis, sodium borodeuteride reduction and selected ion monitoring GC/MS*. Metabolomics, 2013. 9: p. 1019-1030.

FIGURES

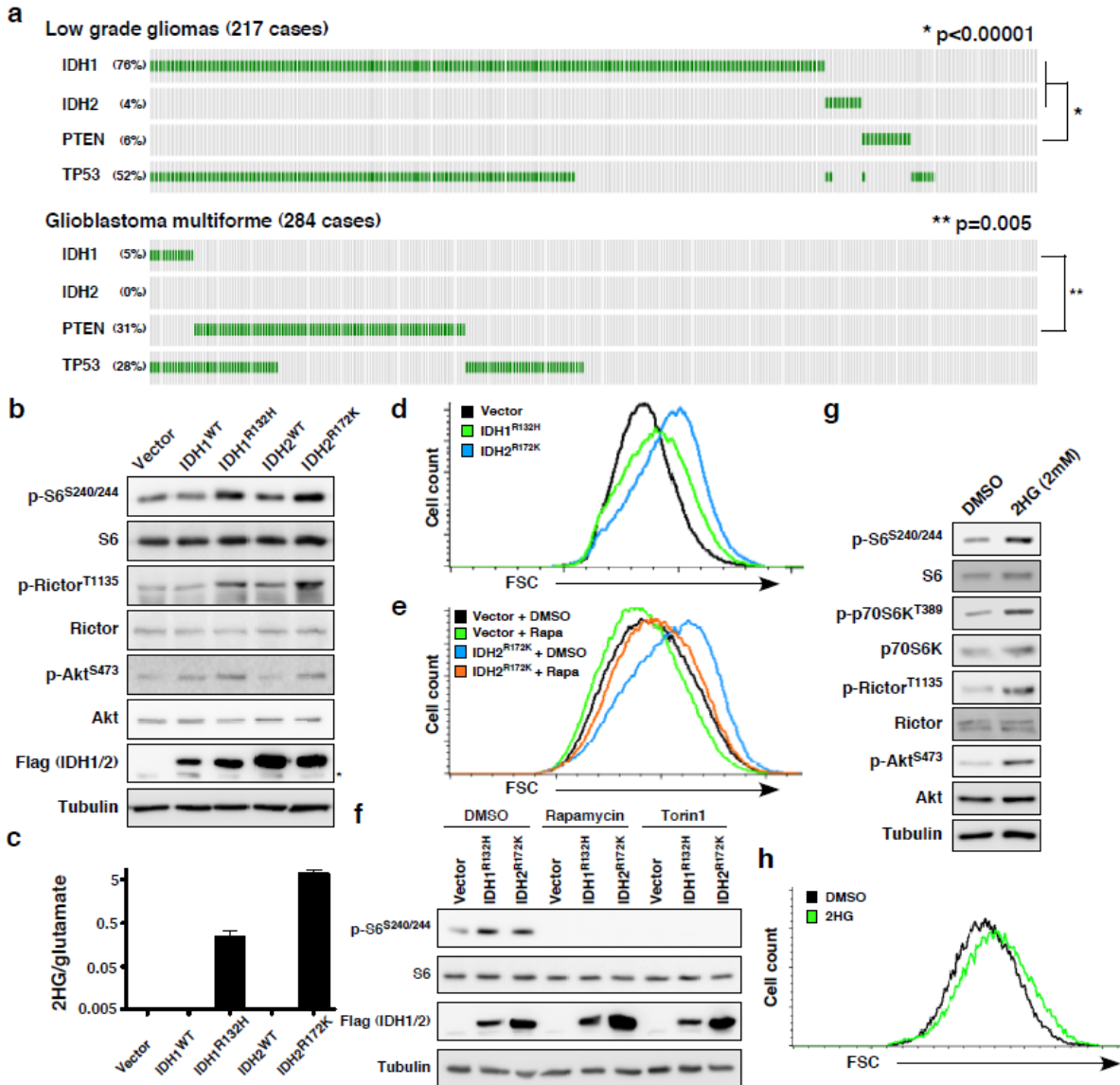


Figure 2.1. Activation of mTOR signaling by 2HG-producing IDH1/2 gain-of-function mutations.

a, *IDH1/2* and *PTEN* mutations are mutually exclusive in low grade gliomas and glioblastomas. Data were obtained from The Cancer Genome Atlas (TCGA). Each vertical lane represents one patient; green lines depict the presence of a mutation. **b**, mTOR pathway activation in MEFs *p53*^{-/-} cells expressing wt vs mutant IDH. Flag-tagged IDH was retrovirally transduced into MEFs *p53*^{-/-} cells, and whole cell lysates were blotted at 9 days post-selection.

Asterisk denotes a non-specific band recognized by the antibody. **c**, Intracellular accumulation of 2HG upon IDH1/2 mutant expression as in b. 2HG levels were normalized against glutamate levels. **d**, Increased cell size associated with mutated *IDH1/2* expression. FSC measurement in FACS analysis demonstrates the shift in cell size in MEFs $p53^{-/-}$ cells expressing IDH1^{R123H} (green line) or IDH2^{R172K} (blue line) compared to empty vector-infected cells (black line). **e**, Inhibition of mTORC1 rescues the increased cell size in IDH2^{R172K} mutant cells. MEFs $p53^{-/-}$ cells expressing IDH2^{R172K} or empty vector were treated with 25nM rapamycin for 16 hours before FACS analysis. **f**, Rapamycin or Torin1 treatment prevents mTORC1 activation in cells expressing IDH1/2 mutants. MEFs $p53^{-/-}$ cells expressing IDH1/2 mutants were treated with 100nM rapamycin or 250nM Torin1 for 16 hours and whole cell lysates blotted for markers of mTORC1 activation. **g**, 2HG stimulates the mTOR pathway. $p53^{-/-}$ MEFs were treated with 2mM of octyl-2HG for 4 hours, and whole cell extracts analysed by Western blot. **h**, Octyl-2HG treatment increases cell size in $p53^{-/-}$ MEFs. MEF cells were treated with 1mM octyl-2HG for 8 hours before FCS by FACS.

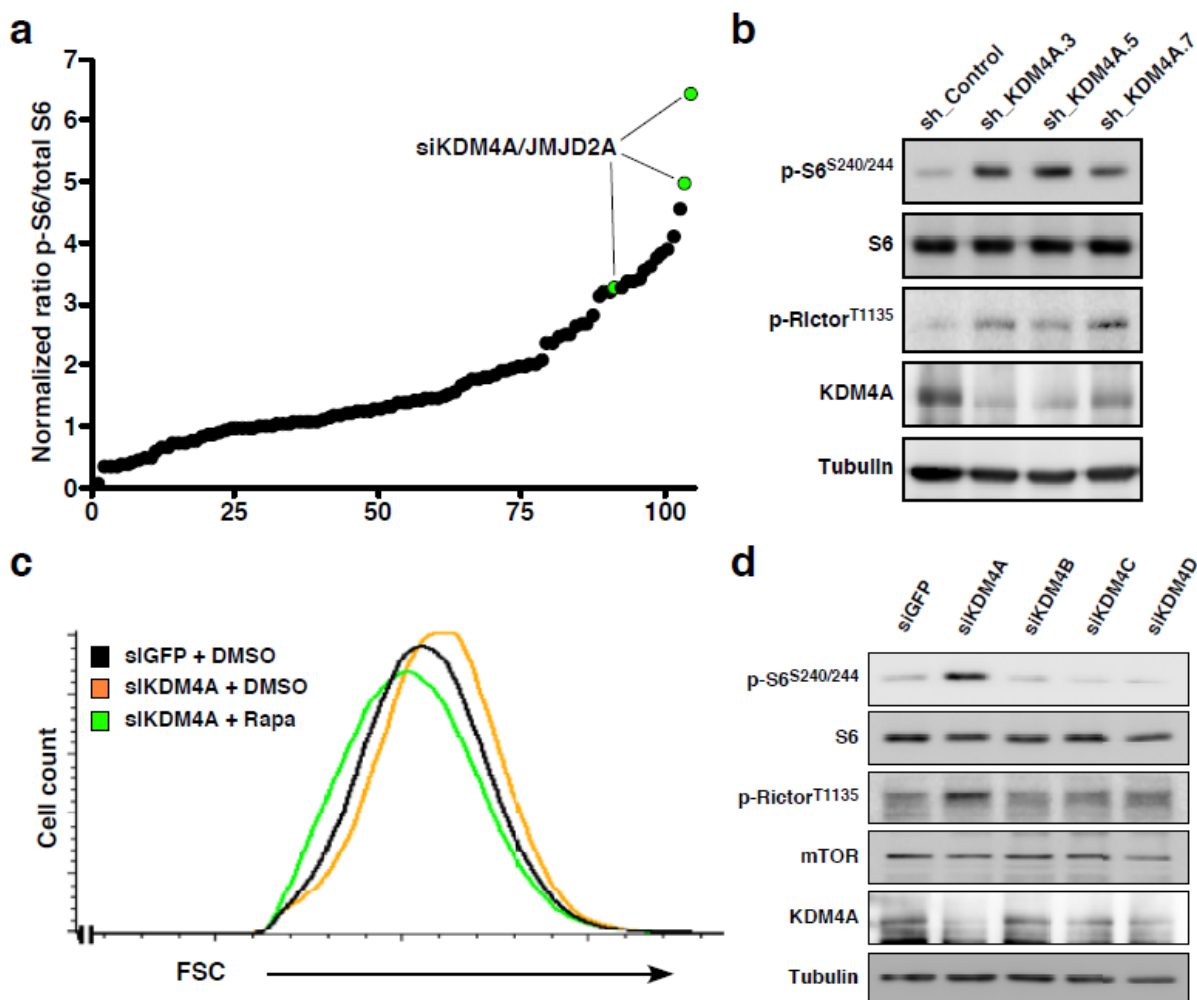


Figure 2.2. Targeted-siRNA screen reveals KDM4A as an α -KG-dependent enzyme modulating mTOR activity.

a, siRNA screen of α KG-dependent enzymes for the involvement in mTOR signalling in HeLa cells. Experiments were performed in triplicate and results of all experiments plotted. Levels of phosphorylated S6 on serines 240/244 were normalized to total S6 protein. **b**, KDM4A knockdown increases mTORC1 signalling. Depletion of KDM4A by lentiviral infection in HeLa cells using 3 different shRNAs. Whole cell lysates were blotted for mTORC1 activation. **c**, KDM4A depletion increases cell size in an mTORC1-dependent manner. p53^{-/-} MEFs were treated with siKDM4A and, where indicated, with DMSO or 25nM rapamycin, for 16 hours before FCS measurements by FACS. **d**, KDM4A is the only KDM4 family member

implicated in mTOR signalling. HeLa cells were treated with siRNAs targeting the KDM4 family members (KDM4A-D) for 72h, and lysates blotted for mTOR signalling markers.

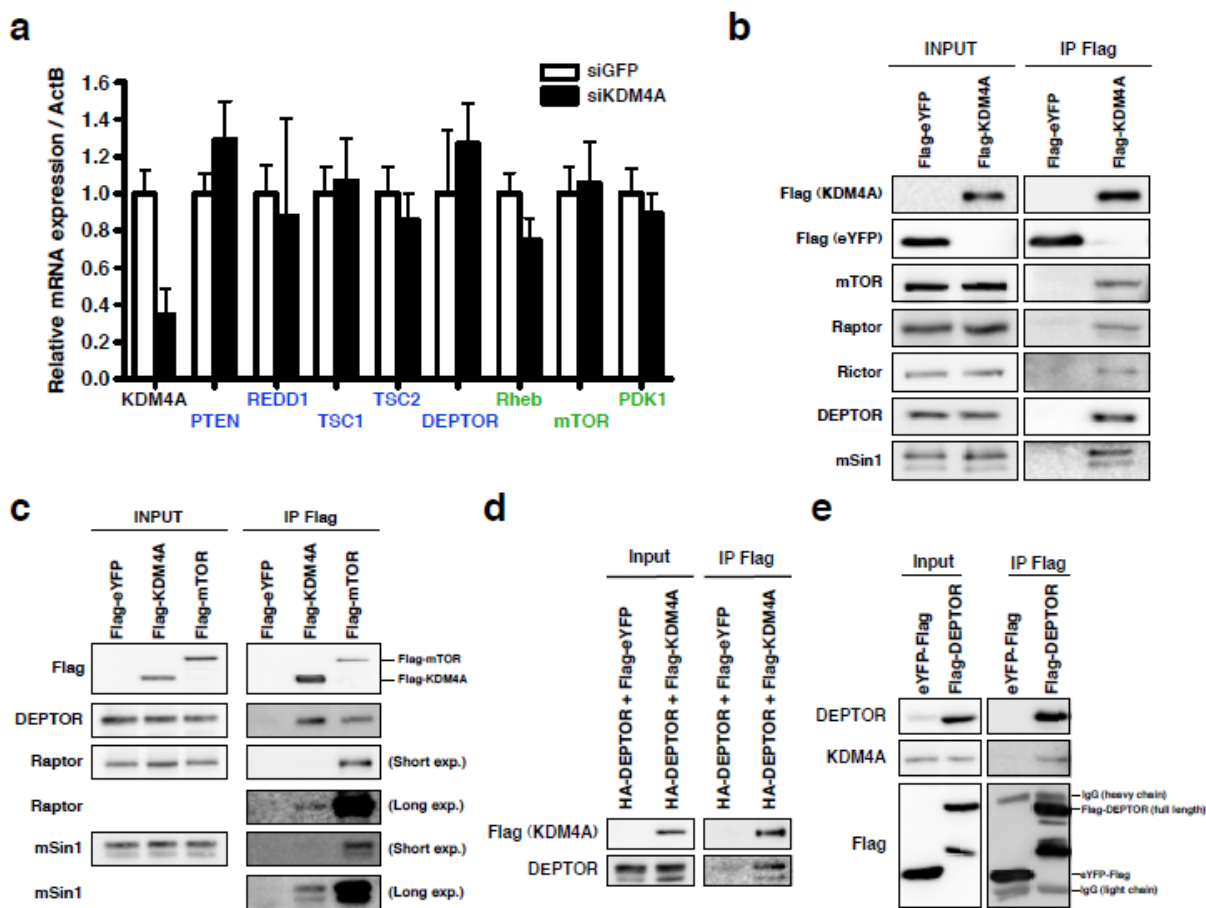


Figure 2.3. KDM4A interacts with the mTORC1/2 complex.

a, Relative mRNA levels of negative (blue) and positive (green) regulators of the PTEN/Akt/mTOR pathway following KDM4A depletion. Quantifications of mRNAs by RT-qPCR were normalized against β -actin (ActB) mRNA. **b**, Co-immunoprecipitation of endogenous mTORC1/2 complex members with Flag-KDM4A in 293T transfected cells. **c**, Comparison of mTORC1/2-associated proteins with Flag-tagged mTOR or KDM4A. 293T cells were transfected with Flag-eYFP, Flag-KDM4A or Flag-mTOR, and protein lysates were subjected to anti-Flag immunoprecipitation. **d**, Co-immunoprecipitation of Flag-KDM4A and HA-DEPTOR in 293T cells. **e**, Endogenous KDM4A co-immunoprecipitates with Flag-DEPTOR.

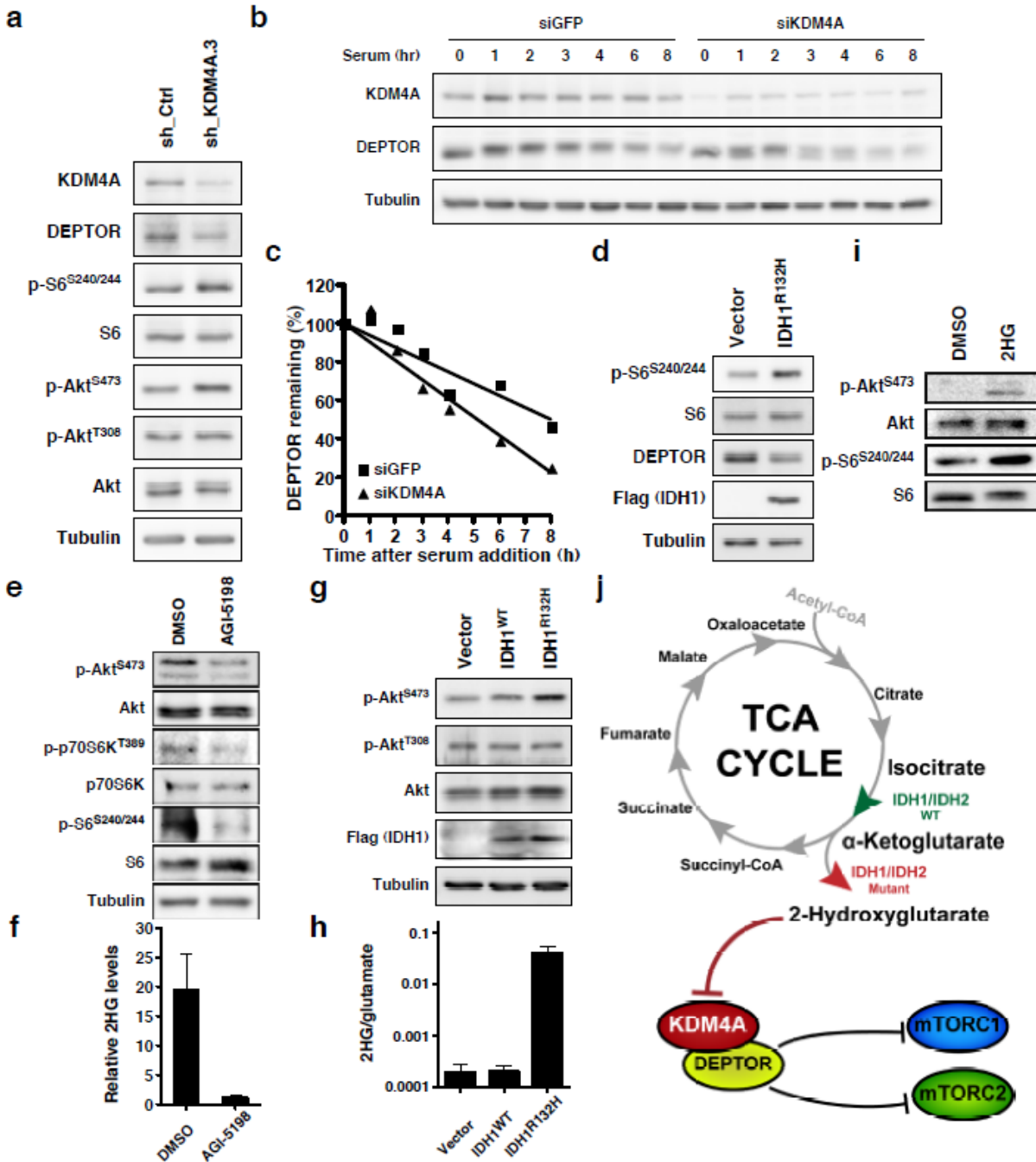
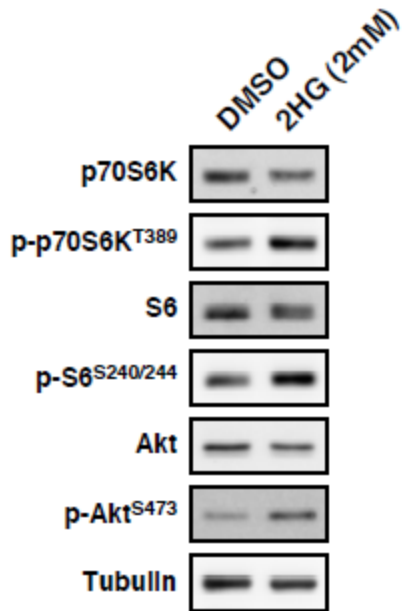


Figure 2.4. KDM4A stabilizes DEPTOR, and functional implication of IDH1/2 mutations in central neuron system-derived cells.

a, KDM4A depletion reduces DEPTOR levels. 293E cells were transduced with lentivirus expressing sh_KDM4A.3 or sh_Control (Ctrl), and whole cell lysates blotted for markers of mTOR activation and DEPTOR levels. **b**, KDM4A depletion decreases DEPTOR stability.

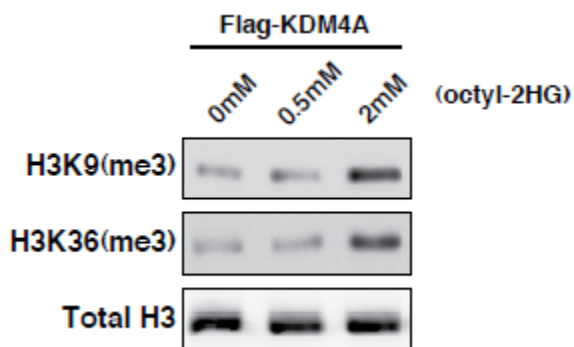
KDM4A was depleted in HeLa cells using siRNA. Cells were pre-treated with cycloheximide and chloramphenicol 1h prior to serum addition and whole cell lysates blotted. **c**, Quantification of DEPTOR protein levels normalized to tubulin as shown in **b**. **d**, IDH1^{R132H} expression diminishes DEPTOR levels. Flag-IDH1^{R132H} was introduced in p53^{-/-} MEFs by retroviral transduction and whole cell lysates blotted for markers of mTOR activation and DEPTOR levels. **e**, Inhibition of endogenous mutated IDH1^{R132C} decreases mTOR activity. IDH1^{R132C/WT} heterozygous HT1080 cells were treated for 3 days with 7.5 μ M AGI-5198, a specific inhibitor of mutated IDH1. **f**, AGI-5198-mediated inhibition of IDH1^{R132C} decreases 2HG intracellular levels. HT1080 cells were treated with 3 μ M AGI-5198 twice every day for 5 days, followed by determination of relative 2HG levels. **g**, Expression of mutant IDH1 in NHA-hTERT increases mTOR signalling. IDH1^{WT}-Flag or IDH1^{R132H} genes were introduced in astrocytes through retroviral infection and cell lysates blotted for mTORC2 activation. **h**, IDH1^{R132H} overexpression increases 2HG production in astrocytes. Intracellular 2HG levels were normalized to glutamate. **i**, Treatment of NHA-hTERT with 2HG activates mTOR signalling. Cells were treated for 8 hours with 1 mM octyl-2HG. The experiment shown is a representative of triplicates. **j**, Simplified schematic model for mTOR activation following KDM4A inhibition by *IDH1/2* gain-of-function mutations.

SUPPLEMENTARY FIGURES



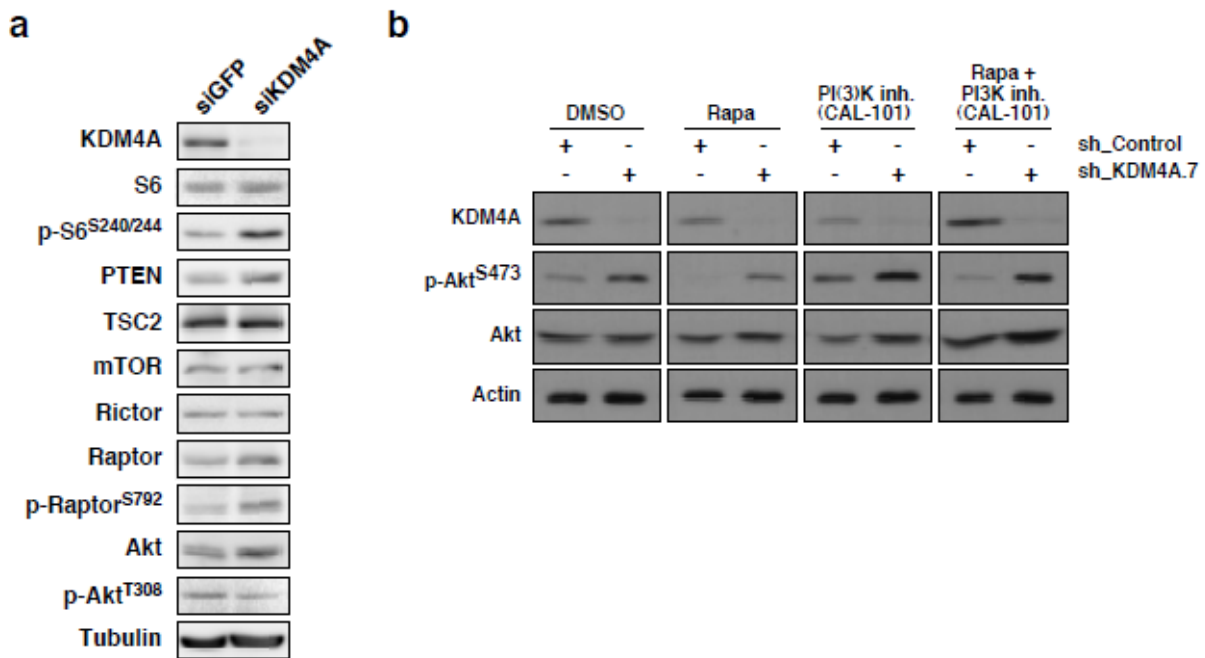
Supplementary Figure 2.1. 2HG stimulates mTOR kinase in HeLa cells.

HeLa were stimulated with 2mM octyl-2HG for 4 hours, and whole cell extracts analysed by Western blot.



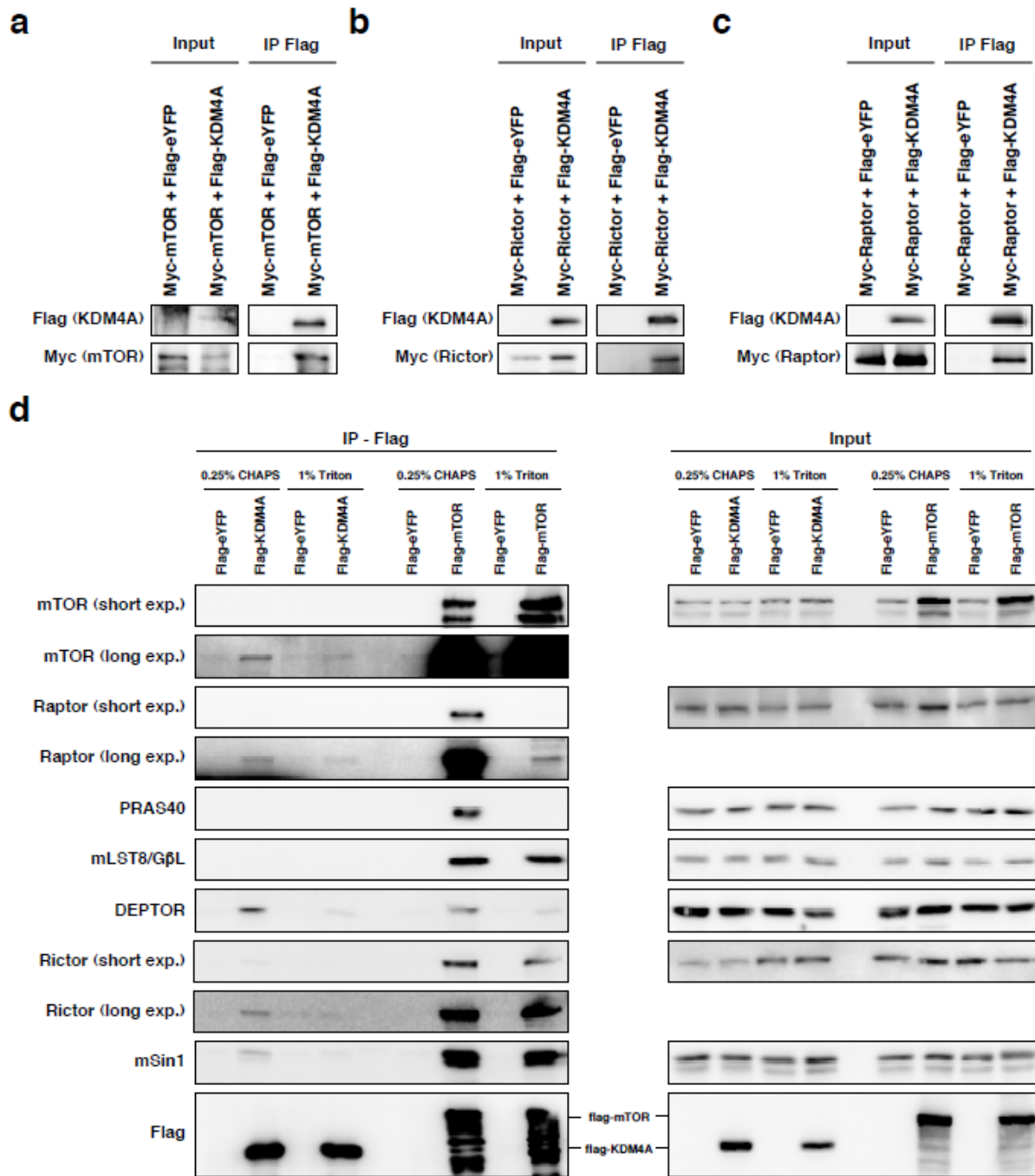
Supplementary Figure 2.2. 2HG inhibits the KDM4A lysine demethylase.

HeLa transfected with Flag-KDM4A were treated with increasing amounts of octyl-2HG, and whole cell lysates immunoblotted against demethylation substrates of KDM4A, H3K9(me3) and H3K36(me3).



Supplementary Figure 2.3. Protein levels of numerous regulators of mTOR signalling are not modulated by KDM4A.

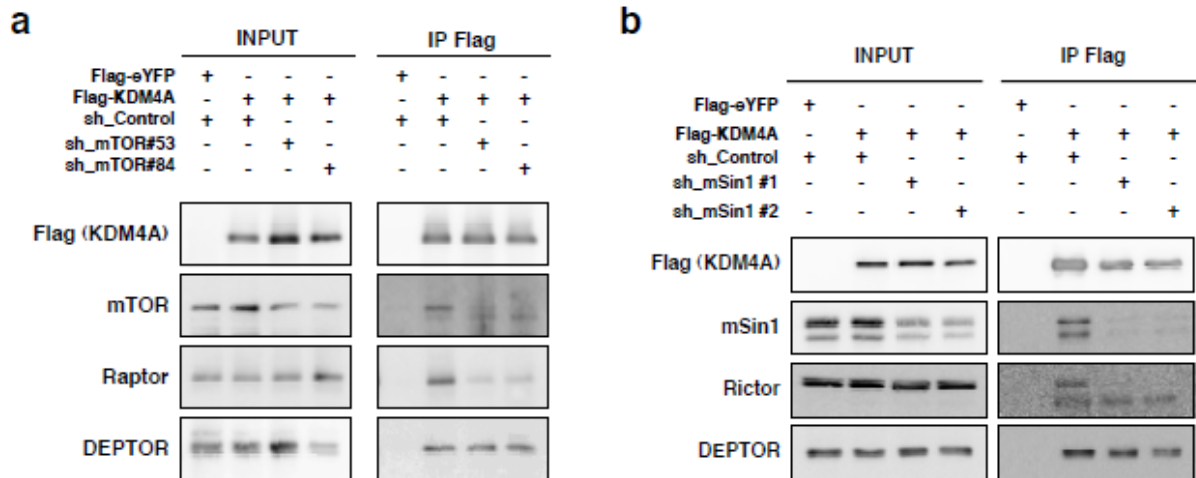
a, KDM4A was depleted by siRNA transfection in HeLa cells and whole cell lysates were blotted. **b**, HeLa cells infected with a sh_Control or sh_KDM4A.7 were serum-starved for 24 hours, then pre-treated or not with 20 nM rapamycin, 1µM of the PI(3)K inhibitor CAL-101 or both for 3 hours, and then stimulated with serum for 30 minutes.



Supplementary Figure 2.4. Co-Immunoprecipitation of KDM4A with mTORC1/2 complexes.

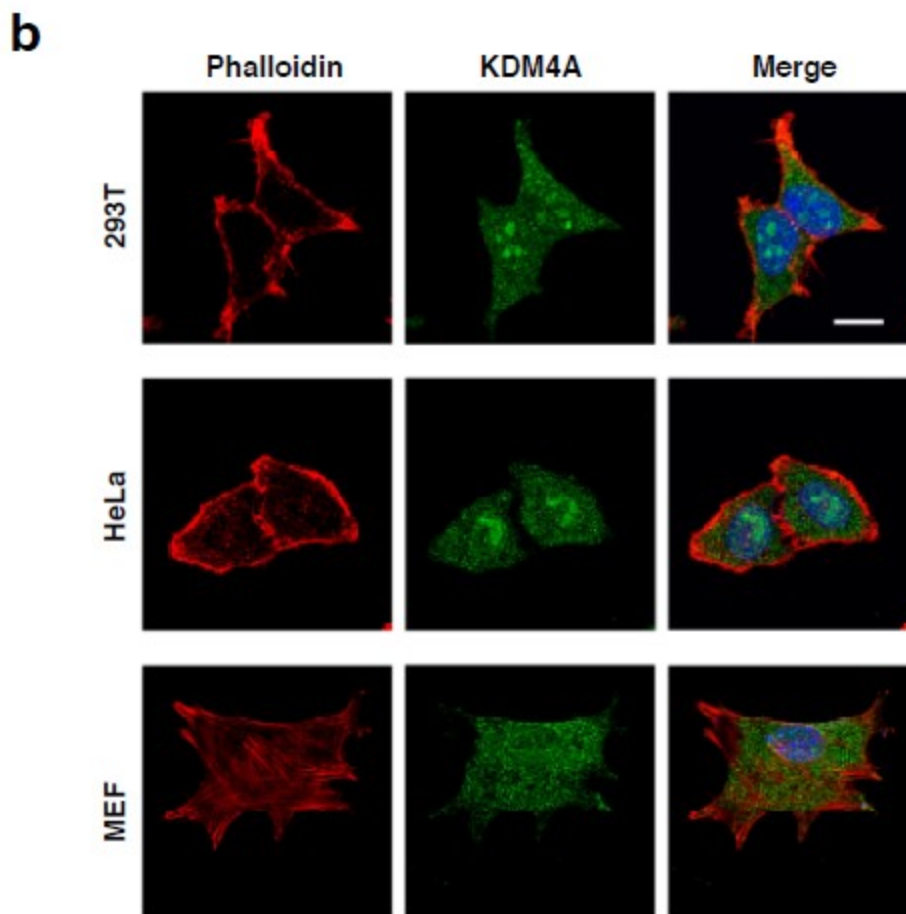
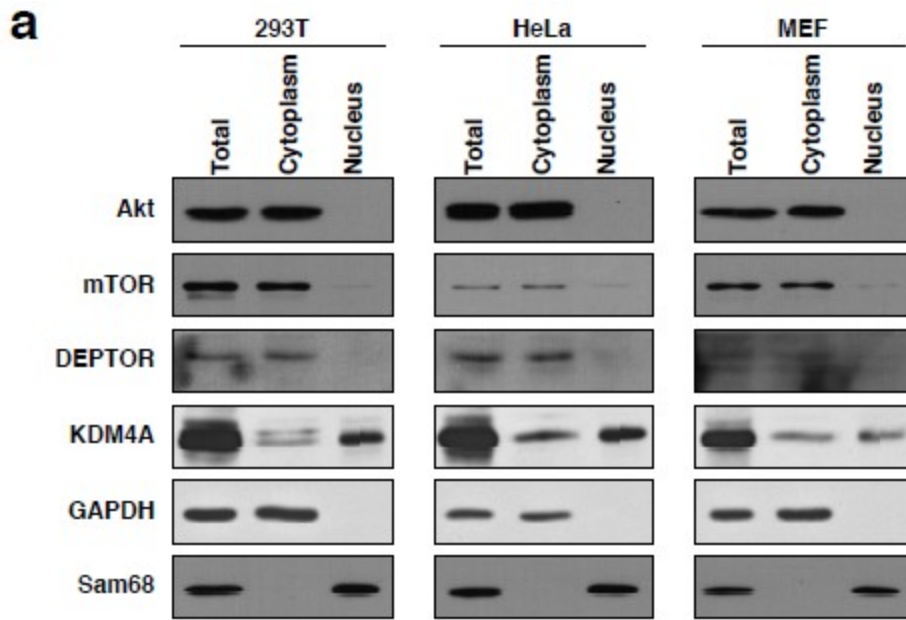
Co-expression of Flag-KDM4A with Myc-mTOR (a), Myc-Rictor (b) or Myc-Raptor (c) in 293T cells followed by Flag immunoprecipitation. d, Detergent-sensitive association between

DEPTOR and KDM4A. Expression of Flag-tagged mTOR or KDM4A in 293T cells followed by Flag immunoprecipitation using CHAPS or triton-based lysis buffer.



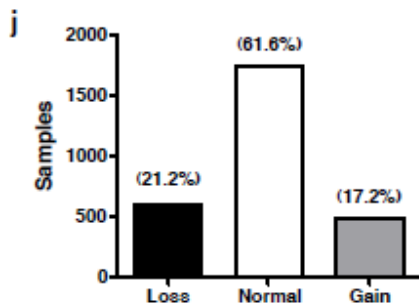
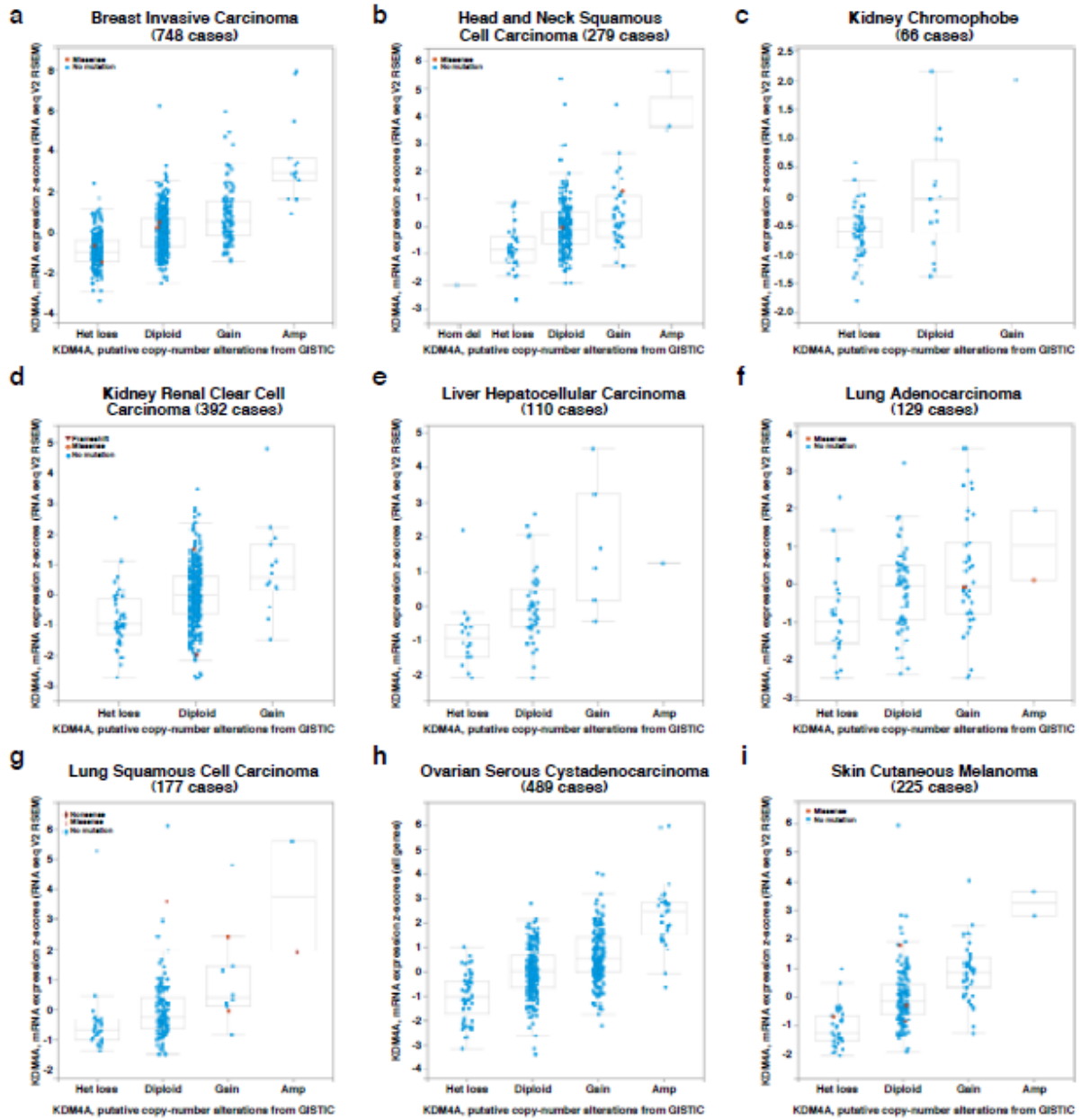
Supplementary Figure 2.5. Interaction between DEPTOR and KDM4A does not require mTOR or mSin1.

a, KDM4A-DEPTOR interaction is independent of mTOR. Depletion of mTOR by lentiviral infection of two different shRNAs in 293T cells transfected with Flag tagged KDM4A, followed by Flag immunoprecipitation. **b**, KDM4A-DEPTOR interaction is independent of mSin1. Depletion of mSin1 by lentiviral infection in 293T cells transfected and immunoprecipitated as in (a).



Supplementary Figure 2.6. KDM4A localized to both cytoplasm and nucleus.

a, Cell fractionation of 293T, HeLa, and MEFs followed by immunoblots against KDM4A, mTOR and DEPTOR. **b**, Indirect immunofluorescence against KDM4A in 293T, HeLa and MEFs showing a nuclear and cytoplasmic distribution using confocal microscopy.



Supplementary Figure 2.7. Frequent genomic loss and decreased mRNA levels of KDM4A in various types of cancer.

Analysis of mRNA expression levels and gene copy number of KDM4A in breast invasive carcinoma (a), head and neck squamous cell carcinoma (b), kidney chromophobe (c), kidney renal clear cell carcinoma (d), liver hepatocellular carcinoma (e), lung adenocarcinoma (f), lung squamous cell carcinoma (g), ovarian serous cystadenocarcinoma (h) and skin cutaneous melanoma (i). j, Loss (GISTIC annotation -2 and -1), normal (GISTIC annotation 0) and gain (GISTIC annotation +1 and +2) of copy number of KDM4A gene in 2812 cancer samples from TCGA and analysed with cBioPortal for Cancer Genomics.

Supplementary Table I. List of all siRNA Smart pools used in Fig. 2.2a.

#	Gene Symbol	Pool Catalog Number ⁺	GENE ID	Gene Accession	GI Number
Ctrl	siGFP	n/a	n/a	n/a	n/a
1	KDM2A/JHDM1A/FBXL11	M-012458-00	22992	NM_012308	16306579
2	KDM2B/JHDM1B/FBXL10	M-014930-01	84678	NM_001005366	54112379
3	JHDM1C/FBXL19	M-031874-01	54620	NM_001099784	157168348
4	KDM3A/JMJD1A	M-017301-01	55818	NM_018433	156602657
5	KDM3B/JMJD1B	M-020378-01	51780	NM_016604	54873608
6	JMJD1C	M-012686-01	221037	NM_004241	68342035
7	KDM4A/JMJD2A	M-004292-01	9682	NM_014663	98986458
8	KDM4B/JMJD2B	M-004290-01	23030	NM_015015	45504379
9	KDM4C/JMJD2C	M-004293-01	23081	NM_015061	109255246
10	KDM4D/JMJD2D	M-020709-00	55693	NM_018039	39653316
11	KDM4E/Loc390245/JMJD2E	M-029951-01	390245	XM_372429	113422553
12	KDM5A/JARID1A	M-003297-03	5927	NM_001042603	110618243
13	KDM5B/JARID1B	M-009899-01	10765	NM_006618	57242795
14	KDM5C/JARID1C	M-010097-01	8242	NM_004187	109255242
15	KDM5D/JARID1D	M-010820-01	8284	NM_004653	56243542
16	KDM6A/UTX	M-014140-01	7403	NM_021140	10863942
17	KDM6B/JMJD3	M-023013-01	23135	NM_001080424	122937250
18	UTY	M-017344-00	7404	NM_007125	33188430
19	KDM7A/JHDM1D/KIAA1718	M-025357-01	80853	NM_030647	90093354
20	KDM8/JMJD5	M-003983-02	79831	NM_024773	13376122
21	JMJD4	M-014238-00	65094	NM_023007	12711669
22	JMJD6/PTDSR	M-010363-03	23210	NM_015167	125988388
23	JMJD8/loc3391123	M-022873-01	339123	NM_001005920	56090145
24	JARID2	M-009244-01	3720	NM_004973	11863151
25	PHF2	M-012912-01	5253	NM_005392	117190341
26	PHF8	M-004291-00	23133	NM_015107	32698699
27	HR	M-011872-01	55806	NM_018411	70906481
28	NO66/c14orf169	M-014397-01	79697	NM_024644	106879205
29	MINA/NO52	M-016031-01	84864	NM_153182	110227620
30	HIF1AN	M-004073-02	55662	NM_017902	148596935
31	HSPBAP1	M-004287-01	79663	NM_024610	142383186
32	FTO	M-004159-01	79068	NM_001080432	122937262
33	LSD1/AOF1	M-008121-01	221656	NM_153042	116256450
34	LSD2/AOF2	M-009223-01	23028	NM_015013	58761545
35	TET2	SASI_Hs02_00328772; SASI_Hs02_00328773; SASI_Hs02_00328774; SASI_Hs02_00328775.	54790	NM_001127208	187761317
36	TET3	SASI_Hs02_00364816; SASI_Hs02_00364817; SASI_Hs02_00364818; SASI_Hs02_00364819.	200424	NM_144993	149944516

* All siRNAs were obtained from ThermoFisher/Dharmacon, except for TET2 and TET3 which were from Sigma-Aldrich.

Chapitre 3: Discussion

1. Exclusion mutuelle et co-occurrence des mutations de IDH1/2 et de différents suppresseurs tumoraux

Les mutations de PTEN et IDH1/2 sont mutuellement exclusives chez les gliomes de bas grade et les glioblastomes multiformes (GBM) (Figure 2.1a). D'ailleurs, la fréquence des mutations de PTEN est plus élevée chez les glioblastomes primaires comparativement aux glioblastomes secondaires tandis que l'inverse est plutôt observé pour les mutations de IDH1/2 (Ohgaki, 2009, Williams, 2013). En effet, les mutations de IDH1/2 sont retrouvées dans seulement 5% des glioblastomes primaires alors qu'elles sont présentes chez 83% des glioblastomes secondaires (Schaap et al., 2013). Puisque les données du TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) utilisées ne distinguent pas les GBM primaires des GBM secondaires, il est possible que les divergences des mutations privilégiées chez ces deux sous-types de GBM soient à l'origine de l'exclusion mutuelle observée. Néanmoins, cette exclusion mutuelle suggère une redondance au niveau des effets engendrés. En effet, bien que différentes mutations soient privilégiées en fonction des types de tumeurs, les cellules cancéreuses doivent ultimement acquérir des caractéristiques similaires. Ainsi, le fait que les GBM présentant une mutation de IDH1/2 n'acquièrent pas de mutations de PTEN laisse supposer que cette dernière ne conférerait aucun avantage aux cellules dans lesquelles IDH1/2 est déjà muté.

Le fait que les mutations de IDH1/2 soient majoritairement retrouvées chez les GBM secondaires suggère que d'autres mutations doivent préalablement être acquises afin de protéger les cellules cancéreuses du stress métabolique engendré par les mutations de IDH1/2. Les mutations de IDH1/2 étant fréquemment associées aux mutations de p53, il pourrait être intéressant de vérifier si l'inactivation de ce suppresseur tumoral est requise afin que le stress métabolique causé par les mutations de IDH1/2 puisse être toléré par la cellule (Figure 2.1a) (Ohgaki and Kleihues, 2011). Il serait également intéressant d'utiliser les données du TCGA afin de vérifier si d'autres mutations semblent généralement associées ou exclusives aux mutations de IDH1/2. La nécessité de l'inactivation des candidats ainsi identifiés à la tolérance

au stress métabolique généré par les mutations de IDH1/2 pourrait alors être évaluée. Pour ce faire, ces différents candidats pourraient être déplétés préalablement à l'infection des formes mutées de IDH1/2 afin que l'apoptose et la sénescence puissent par la suite être évaluées.

2. Régulation de mTOR par le 2-hydroxyglutarate

Nous avons démontré que le 2HG stimule l'activité de mTOR (Figure 2.1g). En revanche, un article publié récemment indique plutôt que le 2HG entraîne l'inhibition de mTOR (Fu et al., 2015). Comme nous avons constaté que les mutations de IDH1/2 et PTEN étaient mutuellement exclusives, nous avons utilisé des cellules chez lesquelles PTEN n'était pas muté. Au contraire, les expériences ayant mené à l'identification du 2HG comme inhibiteur de mTOR ont été réalisées dans des U87, dans lesquelles PTEN est tronqué. En effet, l'exon 3 de PTEN est perdu dans les U87, ce qui mène à la délétion de 15 acides aminés au niveau de la protéine (Furnari et al., 1997). Il serait donc possible que les mutations de PTEN modulent l'effet du 2HG sur l'activité de mTOR. Dans une telle éventualité, il ne serait pas surprenant que les mutations de IDH1/2 et PTEN soient mutuellement exclusives puisque la présence de ces deux mutations mènerait à l'inhibition de mTOR.

Un autre aspect permettant d'expliquer la divergence de nos résultats avec ceux publiés récemment réside dans les conditions de culture. En effet, les expériences ayant mené à l'identification du 2HG comme inhibiteur de mTOR ont été réalisées en majeure partie dans du milieu ne contenant pas de glucose (Fu et al., 2015). Au contraire, toutes nos expériences ont été réalisées dans du milieu contenant du glucose. Ainsi, la présence de glucose pourrait moduler l'effet du 2HG sur l'activité de mTOR.

3. Survie cellulaire et mutations de IDH1/2

Nous avons démontré que les formes mutées de IDH1/2 activaient mTORC2 (Figure 2.1b). mTORC2 favorisant la survie cellulaire, il est possible que l'activation de ce complexe soit nécessaire à la survie des cellules possédant une mutation de IDH1/2. L'activation de mTORC2 par les formes mutées de IDH1/2 pourrait donc constituer un mécanisme permettant aux cellules de survivre malgré le stress métabolique imposé par la mutation de IDH1/2. Afin de déterminer si tel est effectivement le cas, il serait possible de vérifier les niveaux

d'apoptose en présence d'un inhibiteur de mTORC2 tel Torin1. Alternativement, il serait également possible de dépléter Rictor, empêchant ainsi la formation de complexes mTORC2. Dans les deux cas, l'apoptose pourrait être évaluée grâce aux niveaux de caspase 3 et Parp clivés ainsi que via la quantification d'annexine V par cytométrie de flux.

4. Régulation de la voie mTOR par les oxygénases α -kétoglutarate dépendantes

Nous avons démontré que KDM4A constituait un régulateur négatif de mTORC1 (Figure 2.2). Le crible réalisé afin d'identifier les oxygénases α -kétoglutarate dépendantes modulant l'activité de mTORC1 laisse suggérer que d'autres oxygénases pourraient également être impliquées dans la régulation de ce complexe (Figure 2.2a). Comme le 2HG généré par les formes mutées de IDH1/2 permet l'inhibition de l'ensemble de ces oxygénases, il est possible que l'inhibition de plusieurs oxygénases α -kétoglutarate-dépendantes, en plus de KDM4A, contribuent à la modulation de mTORC1 observée. La validation d'autres candidats par déplétion, seuls ou en différentes combinaisons, permettra de déterminer s'ils agissent en synergie avec KDM4A afin de moduler mTORC1. En plus de démontrer une nouvelle fonction de KDM4A dans la régulation de mTORC1, nos résultats suggèrent une contribution potentiellement plus large de la famille de déméthylases JUMONJI sur l'activité de mTOR.

Les différents membres de la famille KDM4 possédant des substrats communs tels que H3K9(me2/3) et H3K36(me2/3), la possibilité qu'il y ait également redondance fonctionnelle au niveau de la régulation de mTOR a été envisagée. Contrairement à la déplétion de KDM4A, la déplétion de KDM4B/C/D n'a aucun effet sur l'activité de mTORC1 (Figure 2.2d). En revanche, il aurait pu être intéressant de vérifier la contribution des différents membres de la famille KDM4 à la régulation de mTORC2. En effet, il est possible que certaines JUMONJIs soient impliquées dans la régulation d'un seul des complexes mTOR.

Les JUMONJIs étant des déméthylases de lysines, il pourrait également être intéressant de vérifier la contribution de différentes méthyltransférases à la régulation de l'activité de mTORC1 en utilisant une approche similaire. Advenant l'éventualité où la régulation de mTOR par les déméthylases de lysines reposerait sur leur capacité à déméthyle des lysines, la

déplétion de méthyltransférases pourrait engendrer des effets opposés à la déplétion de déméthylases, soit l'inhibition de mTOR. Au contraire, la déplétion de méthyltransférases pourrait entraîner l'activation de mTOR si la régulation de cette kinase repose sur un équilibre entre la méthylation et la déméthylation. Afin de vérifier ces hypothèses, une librairie de siRNA dirigés contre différentes méthyltransférases pourrait être utilisée. Il serait par la suite possible de vérifier l'impact de ces différentes déplétions sur l'activation de mTORC1 (p-p70S6K1^{T389}, p-4E-BP1^{S65}, p-S6^{S240/244}) et mTORC2 (p-AKT^{S473}).

Le crible permettant l'identification d'oxygénases α -kétoglutarate dépendantes impliquées dans la régulation de mTORC1 fut réalisé en utilisant un anticorps dirigé contre S6 phosphorylé au niveau des sérines 240/244 comme marqueur fonctionnel de l'activité de mTORC1. Or, il est possible que les oxygénases α -kétoglutarate dépendantes modulant l'activité de mTORC2 soient différentes de celles régulant mTORC1. C'est pourquoi nous proposons d'effectuer un crible à l'aide de la même librairie de siRNA, mais en utilisant plutôt un anticorps dirigé contre AKT phosphorylé au niveau de la sérine 473 comme marqueur fonctionnel de l'activité de mTORC2. Il serait également intéressant de vérifier si la déplétion des différentes oxygénases α -kétoglutarate dépendantes entraîne une réponse physiologique via la régulation de mTORC2. Pour ce faire, il serait possible d'évaluer les niveaux de caspase 3 clivée ou encore de Parp clivé suite à la déplétion des différentes oxygénases α -kétoglutarate dépendantes puisque mTORC2 est impliqué dans la régulation de la survie cellulaire.

5. Régulation transcriptionnelle de gènes impliqués dans la régulation de la voie mTOR par KDM4A

KDM4A est une déméthylase de lysine impliquée dans la régulation transcriptionnelle de différents gènes. Par conséquent, la modulation des niveaux de transcription de gènes impliqués dans la régulation de mTORC1 aurait pu constituer un mode de régulation permettant à KDM4A de moduler l'activité de ce complexe. Afin de déterminer si tel était le cas, les niveaux d'ARNm et de protéines de différents gènes impliqués dans la régulation de mTORC1 en présence et en absence de KDM4A ont été comparés (Figure 2.3a et Supplementary Figure 2.3a). Bien que quelques variations minimales aient été observées suite à la déplétion de KDM4A, elles ne permettent pas d'expliquer l'activation de mTOR puisqu'au

contraire, de telles variations auraient plutôt pour effet d'inhiber mTOR. Par exemple, les niveaux de phosphorylation de la sérine 792 de Raptor augmentent légèrement (Supplementary Figure 2.3a). Or, cette phosphorylation est réalisée par l'AMPK et a pour effet d'inhiber mTORC1. Le même type de raisonnement s'applique à la légère augmentation des niveaux d'ARNm de PTEN (Figure 2.3a). PTEN étant un régulateur négatif de la voie mTOR, l'augmentation de ses niveaux aurait pour effet d'inhiber mTORC1 alors qu'une activation de mTORC1 est observée lorsque KDM4A est déplété.

Toutefois, seuls les niveaux d'ARNm et protéiques d'une partie des protéines impliquées dans la régulation de mTOR ont été évalués. Les protéines étudiées font principalement partie de la voie PI3K/AKT alors que quelques unes sont impliquées dans la régulation de mTOR par l'AMPK. Le fait que la phosphorylation d'AKT au niveau de la thréonine 308 ne varie pas en absence de KDM4A indique que la régulation de mTORC1 n'a pas lieu en amont d'AKT au niveau de la voie PI3K/AKT. Il pourrait être intéressant de vérifier si KDM4A permet la régulation transcriptionnelle de protéines impliquées dans d'autres voies de signalisation régulant mTOR comme la voie Ras/ERK de même que la régulation de mTORC1 par les acides aminés. En effet, il serait pertinent de vérifier si les niveaux d'ARNm et de protéine des différents constituants de ces voies de signalisation varient en absence de KDM4A. Ainsi, pour la voie Ras/ERK, il serait possible d'observer les niveaux de Ras, Raf, MEK, ERK et RSK. En ce qui concerne la régulation de mTORC1 par les acides aminés, les niveaux de RagA/B/C/D, LAMTOR1/2/3/4/5 et des différentes protéines constituant Gator1/2 pourraient être évalués.

6. Interaction entre les complexes mTOR et KDM4A

Nous avons identifié une interaction entre KDM4A et les complexes mTOR qui semble reposer principalement sur DEPTOR (Figure 2.3, Supplementary Figures 2.4d, 2.5a,b). Cependant, il est possible que KDM4A engage plusieurs modes de liaisons avec mTORC1/2 impliquant l'interaction via d'autres membres des complexes mTOR. Il serait intéressant d'explorer cette possibilité en immunoprécipitant KDM4A dans des cellules ayant préalablement été déplétées de différents membres des complexes mTOR. De plus, afin de déterminer si ces interactions sont directes et indépendantes de modifications post-

traductionnelles, des essais « pull down » *in vitro* avec des protéines recombinantes pourraient être réalisés.

6.1. Potentielle interaction entre les complexes mTOR et d'autres protéines associées aux processus de méthylation et déméthylation

Récemment, une analyse par spectrométrie de masse a permis d'identifier une interaction potentielle entre Raptor et HP1 γ (Kim et al., 2015). Il existe trois isoformes de HP1, soit HP1 α HP1 β et HP1 γ . Ces trois isoformes lient les lysines 9 méthylées des histones H3 grâce à leur chromodomaine, se localisant ainsi au niveau de l'hétérochromatine (Bannister et al., 2001, Lachner et al., 2001, Nielsen et al., 2002, Nakayama et al., 2001, Nielsen et al., 2001). La méthylation de H3K9 est catalysée par la méthyltransférase SUV39H1 qui est en mesure d'interagir avec HP1, cette interaction étant essentielle au recrutement de HP1 à la chromatine (Rea et al., 2000, Stewart et al., 2005). KDM4A permettant la déméthylation de H3K9(me2/3), sa surexpression bloque le recrutement de HP1 à l'hétérochromatine (Klose et al., 2006). Ainsi, sachant que KDM4A interagit avec les complexes mTOR, il pourrait être intéressant de valider l'interaction entre ces complexes et HP1 par immunoprécipitation.

Le fait qu'une déméthylase soit impliquée dans la régulation de mTOR laisse supposer que des méthyltransférases pourraient également jouer un rôle au niveau de la régulation de mTOR. En effet, dans l'éventualité où l'interaction entre KDM4A et DEPTOR reposerait sur une lysine méthylée, la méthylation de cette dernière pourrait également constituer un mécanisme de régulation de mTOR. Ainsi, si la déplétion d'une méthyltransférase affecte l'activité de mTOR, il serait intéressant de réaliser une immunoprécipitation afin de vérifier s'il y a interaction entre cette méthyltransférase et les complexes mTOR.

7. Localisation de KDM4A et des différentes protéines constituant les complexes mTOR

7.1. Localisation cytoplasmique de KDM4A

Étant une déméthylase de lysines d'histones, KDM4A est principalement connue comme étant une protéine nucléaire alors qu'au contraire DEPTOR est plutôt connu pour sa localisation cytoplasmique puisqu'il est retrouvé au sein des complexes mTOR. Or, KDM4A est également retrouvée dans le cytoplasme où il régule notamment la synthèse protéique en s'associant avec différentes protéines impliquées dans l'initiation de la traduction (Van Rechem et al., 2015a, Kim et al., 2014). Les mécanismes de régulation de la localisation de KDM4A ne sont pas encore bien définis. Cependant, il a été rapporté que la déplétion du domaine JMKN ou des domaines tudor et PHD de cette déméthylase résultait en la localisation nucléaire et cytoplasmique de KDM4A, suggérant ainsi que ces domaines seraient responsables de l'accumulation nucléaire de KDM4A (Klose et al., 2006).

Afin de s'assurer que les interactions observées par immunoprécipitation pouvaient réellement avoir lieu dans un contexte physiologique et n'étaient pas seulement des artefacts résultant de la lyse cellulaire, la localisation de KDM4A et DEPTOR a été étudiée (Supplementary Figure 2.6a,b). Ainsi, on observe que DEPTOR est bel et bien retrouvé dans le cytoplasme. De plus, bien que KDM4A soit localisé en majeure partie dans le noyau, une fraction importante de cette déméthylase est retrouvée dans le cytoplasme, suggérant donc que KDM4A pourrait interagir avec DEPTOR au niveau des complexes mTOR dans le cytoplasme. Afin d'appuyer cette hypothèse, il serait possible de vérifier si KDM4A et les complexes mTOR co-localisent dans le cytoplasme par immunofluorescence. Alternativement, une immunoprécipitation sur la fraction cytoplasmique pourrait être réalisée. Il pourrait également être intéressant de vérifier si la localisation de KDM4A peut être modulée en fonction de différentes conditions. Par exemple, la localisation de KDM4A en présence et en absence de sérum pourrait être comparée par immunofluorescence ou encore par fractionnement.

La localisation cytoplasmique de KDM4A permet de soulever un point extrêmement important, soit les fonctions cytoplasmiques de cette déméthylase. En effet, comme la majorité des déméthylases de lysines, KDM4A est principalement étudiée pour son rôle auprès des histones. Or, nous avons démontré que cette déméthylase est impliquée dans la régulation de la voie mTOR, l'une des voies oncogéniques les plus fréquemment suractivées chez les cellules cancéreuses. Étant localisée dans le cytoplasme, il est fort probable que KDM4A soit également impliquée dans d'autres processus cytoplasmiques comme c'est le cas pour la synthèse protéique (Van Rechem et al., 2015a, Kim et al., 2014). On peut également s'interroger sur les potentielles fonctions cytoplasmiques d'autres déméthylases de lysines ou même de méthyltransférases. En effet, l'identification de nouveaux interactants et/ou substrats cytoplasmiques de déméthylases de lysines pourrait mener à la mise en évidence de nouveaux processus cellulaires régulés par les déméthylases de lysines.

7.2. Localisation nucléaire des complexes mTOR

En ce qui concerne les différents membres des complexes mTOR, ils ne localisent pas exclusivement au cytoplasme. En effet, une faible fraction de mTOR, mLST8, Rictor et mSin1 sont retrouvés dans le noyau alors que Raptor est aussi abondant dans le noyau que dans le cytoplasme (Rosner and Hengstschlager, 2008, Bachmann et al., 2006, Kim and Chen, 2000, Zhang et al., 2002, Yadav et al., 2013, Rosner and Hengstschlager, 2012, Rosner and Hengstschlager, 2011). Les différents membres de mTORC2 sont en mesure d'interagir dans le noyau, entraînant ainsi la formation de complexes mTORC2 nucléaires (Rosner and Hengstschlager, 2008). Au contraire, malgré les grandes quantités de Raptor localisant au noyau, l'interaction nucléaire entre mTOR et Raptor est très peu abondante, suggérant ainsi que mTORC1 serait principalement cytoplasmique (Rosner and Hengstschlager, 2008).

7.2.1. Localisation nucléaire de DEPTOR

La localisation de DEPTOR ne serait pas uniquement cytoplasmique. En effet, dépendamment des anticorps utilisés, les résultats obtenus par fractionnement diffèrent. Ainsi, les anticorps dirigés contre DEPTOR de *Cell Signaling* (D9F5, NBP1-49674) et de *Novus* (NBP1-49674) permettent la détection cytoplasmique de DEPTOR tel que montré dans la figure supplémentaire 2.6 alors que l'anticorps dirigé contre DEPTOR de *Millipore* (ABS222)

détecte plutôt la fraction nucléaire de DEPTOR. Afin de s'assurer que les différents anticorps utilisés reconnaissent bel et bien DEPTOR, ils ont été utilisés afin de réaliser des immunobuvardages de type Western sur des lysats cellulaires de 293T surexprimant DEPTOR (Figure 3.1). Alors que DEPTOR possède un poids moléculaire de 48kDa, la surexpression de Flag-DEPTOR entraîne la détection d'une bande additionnelle légèrement sous les 37kDa. Cette bande pourrait correspondre à un variant d'épissage répertorié chez lequel les acides aminés 42-142 sont manquants et dont le poids prédit serait de 34kDa (Simpson et al., 2000). Cependant, ce variant d'épissage n'a jamais été validé. Il serait donc intéressant de vérifier si la bande observée sous 37kDa correspond effectivement à un variant d'épissage de DEPTOR par spectrométrie de masse.

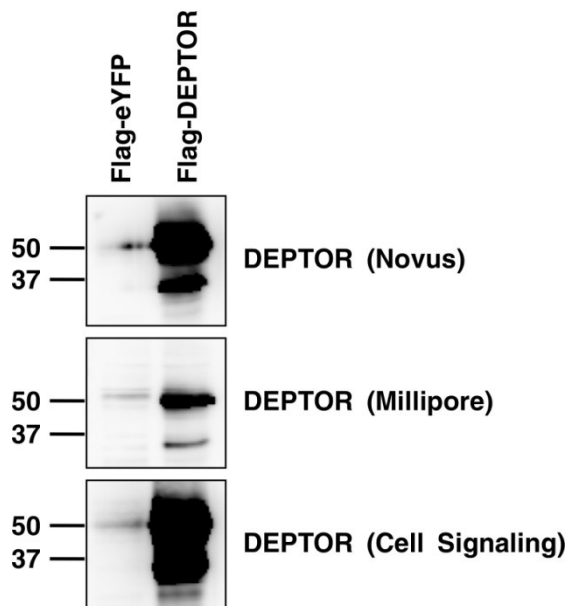


Figure 3.1. Reconnaissance de DEPTOR par différents anticorps

Des 293T ont été transfectées afin de surexprimer Flag-DEPTOR ou Flag-eYFP. Des immunobuvardages de type Western ont par la suite été réalisés à l'aide de différents anticorps reconnaissant DEPTOR.

La localisation nucléaire de DEPTOR suggère que l'interaction entre ce dernier et KDM4A pourrait également avoir lieu dans le noyau. Afin de vérifier cette hypothèse, il suffirait de réaliser un immunoprécipitation sur un extrait nucléaire ou encore de vérifier si KDM4A et DEPTOR co-localisent par immunofluorescence. DEPTOR étant régulé par la

présence de sérum, il serait également intéressant de vérifier si sa localisation varie en fonction de la quantité de sérum présente. À cette fin, des expériences d'immunofluorescences ou encore de fractionnement pourraient être réalisés.

7.2.1.1. Interaction entre DEPTOR et H3

Par immunoprécipitation, une interaction entre DEPTOR et l'histone H3 a pu être identifiée (Figure 3.2). Cette interaction semble reposer à la fois sur les domaines DEP et le domaine PDZ, puisque ces différents domaines sont en mesure de co-immunoprécipiter H3. Afin de s'assurer que l'interaction observée est réelle, il serait possible de réaliser une immunoprécipitation endogène de DEPTOR sur un extrait nucléaire. Cette immunoprécipitation pourrait être réalisée avec et sans sonication pour vérifier si les histones co-immunoprécipitées sont associées à la chromatine ou libres. Des essais « pull down » *in vitro* pourraient également être effectués afin de déterminer s'il s'agit d'une interaction directe et indépendante de modifications post-traductionnelles. Il serait d'ailleurs intéressant de vérifier si différentes marques d'histones H3 sont enrichies lorsque DEPTOR est immunoprécipité. Pour vérifier si tel est le cas, des immunobuvardages de type Western contre différentes modifications post-traductionnelles des histones pourraient être réalisés. KDM4A liant et déméthylant différentes marques de méthylation retrouvées au niveau de H3, il serait possible que l'interaction entre DEPTOR et H3 repose sur KDM4A. La déplétion de KDM4A permettrait de vérifier cette hypothèse.

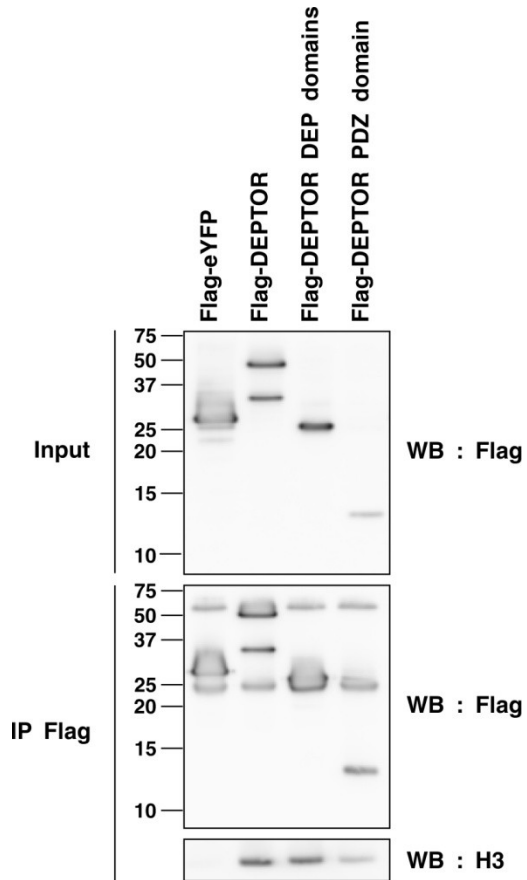


Figure 3.2. Interaction entre DEPTOR et H3

Transfection de 293T avec Flag-DEPTOR, Flag-DEPTOR DEP domains (38-223), Flag-DEPTOR PDZ domain (324-409) ou encore Flag-eYFP suivie d'une immunoprécipitation Flag et d'immunobuvardages de type Western.

La co-immunoprécipitation de H3 avec DEPTOR suggère que ce dernier pourrait posséder des fonctions inconnues à ce jour au niveau de la chromatine. mTOR est recruté à la chromatine où il interagit avec divers facteurs de transcription dont YY1 et MAF1, modulant ainsi la transcription de certains gènes (Cunningham et al., 2007, Kantidakis et al., 2010). mTOR lie également les régions d'initiation de la transcription de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme, l'ubiquitination, l'assemblage du complexe d'ARN polymérase III et le métabolisme du tryptophane (Chaveroux et al., 2013). Les régions d'initiation de la transcription de gènes impliqués dans les voies de régulation de mTORC1 PI3K/AKT et Wnt sont également liées par mTOR (Chaveroux et al., 2013). Il pourrait donc être intéressant de

vérifier si DEPTOR localise aux mêmes endroits que mTOR au niveau de la chromatine par ChIP.

8. Mode d'interaction entre KDM4A et DEPTOR

KDM4A étant capable de lier des lysines méthylées sur les histones H3 et H4 grâce à son domaine tudor, il est également possible que son interaction avec DEPTOR repose sur une lysine méthylée retrouvée chez ce dernier. Il serait également possible que KDM4A déméthyle une lysine retrouvée chez DEPTOR. Bien qu'aucun évènement de méthylation n'ait été rapporté au niveau de DEPTOR à ce jour, ce dernier comporte néanmoins un total de 26 lysines (Figure 3.3).

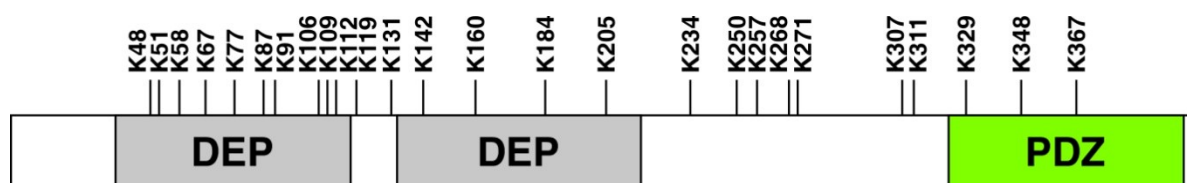


Figure 3.3. Lysines de DEPTOR

DEPTOR comporte 26 lysines dont 14 sont localisés au niveau des domaines DEP et 3 au niveau du domaine PDZ.

L'interaction entre KDM4A et différentes lysines méthylées retrouvées au niveau des histones est déjà bien établie. En effet, KDM4A est en mesure de déméthyliser H3K9(me2/3) et H3K36(me2/3), mais également de lier H3K4(me2/3) et H4K20(me2/3) grâce à son domaine tudor (Kim et al., 2006, Huang et al., 2006). Afin de déterminer si certaines lysines retrouvées au niveau de DEPTOR pourraient présenter des similitudes avec ces lysines d'histones, nous avons aligné ces séquences (Figure 3.4). Cependant, il ne semble pas y avoir de consensus entre les séquences reconnues par KDM4A. C'est ce qu'on peut constater en alignant les séquences de H3K9 et H3K36, qui sont tous deux déméthylés par KDM4A, ou encore en alignant les séquences de H3K4 et H4K20 qui lient quand à eux le domaine tudor de KDM4A (Figure 3.5). Il serait donc possible de vérifier la méthylation de DEPTOR en utilisant un anticorps pan-méthyl lysine suite à l'immunoprécipitation de DEPTOR. La spectrométrie de masse permettrait par la suite l'identification des sites de méthylation retrouvés sur DEPTOR.

Le même type d'approche pourrait être utilisé afin de déterminer si les autres membres des complexes mTOR sont méthylés.

La méthylation constituant un processus dynamique, il serait également intéressant de vérifier si la méthylation de DEPTOR varie selon les conditions utilisées. En présence de sérum, DEPTOR est dégradé afin que mTOR puisse être activé (Peterson et al., 2009). Les sites méthylés sur DEPTOR en présence et en absence de sérum pourraient donc être comparés par spectrométrie de masse.

Afin de vérifier la contribution des JUMONJIs à la déméthylation de DEPTOR, il serait possible de vérifier si les sites méthylés identifiés varient en présence d'inhibiteurs de JUMONJIs. KDM4A constituant un candidat potentiel pour la déméthylation de DEPTOR, il serait également intéressant de vérifier si la surexpression ou la déplétion de cette déméthylase entraîne des variations de la méthylation de DEPTOR par spectrométrie de masse. Afin de valider si KDM4A déméthyle directement DEPTOR, des essais de déméthylation *in vitro* pourraient par la suite être réalisés sur des peptides de DEPTOR contenant des lysines méthylées préalablement identifiés par spectrométrie de masse.

H3K9 K Q T A R K S T G G K
 DEPTOR K48 R L H E E K V I K D R
 DEPTOR K51 E E K V I K D R R H H
 DEPTOR K58 R R H H L K T Y P N C
 DEPTOR K67 N C F V A K E L I D W
 DEPTOR K77 W L I E H K E A S D R
 DEPTOR K87 R E T A I K L M Q K L
 DEPTOR K91 I K L M Q K L A D R G
 DEPTOR K106 V C D E H K E F K D V
 DEPTOR K109 E H K E F K D V K L F
 DEPTOR K112 E F K D V K L F Y R F
 DEPTOR K119 F Y R F R K D D G T F
 DEPTOR K131 L D N E V K A F M R G
 DEPTOR K142 Q R L Y E K L M S P E
 DEPTOR K160 E E E G V K Y E R T F
 DEPTOR K184 E A T T R K E A E Q L
 DEPTOR K205 Q H V S N K H P F V D
 DEPTOR K234 E L L N E K S P S S Q
 DEPTOR K250 P F C L R K Q S H D N
 DEPTOR K257 S H D N R K S T S F M
 DEPTOR K268 S V S P S K E I K I V
 DEPTOR K271 P S K E I K I V S A V
 DEPTOR K307 V L C N P K S V L K R
 DEPTOR K311 P K S V L K R P V T S
 DEPTOR K329 A P Y A R K T F T I V
 DEPTOR K348 V V R G S K P C H I Q
 DEPTOR K367 A A A G M K V C Q F V

H3K36 A T G G V K K P H R Y
 DEPTOR K48 R L H E E K V I K D R
 DEPTOR K51 E E K V I K D R R H H
 DEPTOR K58 R R H H L K T Y P N C
 DEPTOR K67 N C F V A K E L I D W
 DEPTOR K77 W L I E H K E A S D R
 DEPTOR K87 R E T A I K L M Q K L
 DEPTOR K91 I K L M Q K L A D R G
 DEPTOR K106 V C D E H K E F K D V
 DEPTOR K109 E H K E F K D V K L F
 DEPTOR K112 E F K D V K L F Y R F
 DEPTOR K119 F Y R F R K D D G T F
 DEPTOR K131 L D N E V K A F M R G
 DEPTOR K142 Q R L Y E K L M S P E
 DEPTOR K160 E E E G V K Y E R T F
 DEPTOR K184 E A T T R K E A E Q L
 DEPTOR K205 Q H V S N K H P F V D
 DEPTOR K234 E L L N E K S P S S Q
 DEPTOR K250 P F C L R K Q S H D N
 DEPTOR K257 S H D N R K S T S F M
 DEPTOR K268 S V S P S K E I K I V
 DEPTOR K271 P S K E I K I V S A V
 DEPTOR K307 V L C N P K S V L K R
 DEPTOR K311 P K S V L K R P V T S
 DEPTOR K329 A P Y A R K T F T I V
 DEPTOR K348 V V R G S K P C H I Q
 DEPTOR K367 A A A G M K V C Q F V

	H4K20	A	K	R	H	R	K	V	L	R	D	N		H3K4	A	R	T	K	Q	T	A	R	K	
DEPTOR K48	R	L	H	E	E	K	V	I	K	D	R		DEPTOR K48	R	L	H	E	E	K	V	I	K	D	R
DEPTOR K51	E	E	K	V	I	K	D	R	R	H	H		DEPTOR K51	E	E	K	V	I	K	D	R	R	H	H
DEPTOR K58	R	R	H	H	L	K	T	Y	P	N	C		DEPTOR K58	R	R	H	H	L	K	T	Y	P	N	C
DEPTOR K67	N	C	F	V	A	K	E	L	I	D	W		DEPTOR K67	N	C	F	V	A	K	E	L	I	D	W
DEPTOR K77	W	L	I	E	H	K	E	A	S	D	R		DEPTOR K77	W	L	I	E	H	K	E	A	S	D	R
DEPTOR K87	R	E	T	A	I	K	L	M	Q	K	L		DEPTOR K87	R	E	T	A	I	K	L	M	Q	K	L
DEPTOR K91	I	K	L	M	Q	K	L	A	D	R	G		DEPTOR K91	I	K	L	M	Q	K	L	A	D	R	G
DEPTOR K106	V	C	D	E	H	K	E	F	K	D	V		DEPTOR K106	V	C	D	E	H	K	E	F	K	D	V
DEPTOR K109	E	H	K	E	F	K	D	V	K	L	F		DEPTOR K109	E	H	K	E	F	K	D	V	K	L	F
DEPTOR K112	E	F	K	D	V	K	L	F	Y	R	F		DEPTOR K112	E	F	K	D	V	K	L	F	Y	R	F
DEPTOR K119	F	Y	R	F	R	K	D	D	G	T	F		DEPTOR K119	F	Y	R	F	R	K	D	D	G	T	F
DEPTOR K131	L	D	N	E	V	K	A	F	M	R	G		DEPTOR K131	L	D	N	E	V	K	A	F	M	R	G
DEPTOR K142	Q	R	L	Y	E	K	L	M	S	P	E		DEPTOR K142	Q	R	L	Y	E	K	L	M	S	P	E
DEPTOR K160	E	E	E	G	V	K	Y	E	R	T	F		DEPTOR K160	E	E	E	G	V	K	Y	E	R	T	F
DEPTOR K184	E	A	T	T	R	K	E	A	E	Q	L		DEPTOR K184	E	A	T	T	R	K	E	A	E	Q	L
DEPTOR K205	Q	H	V	S	N	K	H	P	F	V	D		DEPTOR K205	Q	H	V	S	N	K	H	P	F	V	D
DEPTOR K234	E	L	L	N	E	K	S	P	S	S	Q		DEPTOR K234	E	L	L	N	E	K	S	P	S	S	Q
DEPTOR K250	P	F	C	L	R	K	Q	S	H	D	N		DEPTOR K250	P	F	C	L	R	K	Q	S	H	D	N
DEPTOR K257	S	H	D	N	R	K	S	T	S	F	M		DEPTOR K257	S	H	D	N	R	K	S	T	S	F	M
DEPTOR K268	S	V	S	P	S	K	E	I	K	I	V		DEPTOR K268	S	V	S	P	S	K	E	I	K	I	V
DEPTOR K271	P	S	K	E	I	K	I	V	S	A	V		DEPTOR K271	P	S	K	E	I	K	I	V	S	A	V
DEPTOR K307	V	L	C	N	P	K	S	V	L	K	R		DEPTOR K307	V	L	C	N	P	K	S	V	L	K	R
DEPTOR K311	P	K	S	V	L	K	R	P	V	T	S		DEPTOR K311	P	K	S	V	L	K	R	P	V	T	S
DEPTOR K329	A	P	Y	A	R	K	T	F	T	I	V		DEPTOR K329	A	P	Y	A	R	K	T	F	T	I	V
DEPTOR K348	V	V	R	G	S	K	P	C	H	I	Q		DEPTOR K348	V	V	R	G	S	K	P	C	H	I	Q
DEPTOR K367	A	A	A	G	M	K	V	C	Q	F	V		DEPTOR K367	A	A	A	G	M	K	V	C	Q	F	V

Figure 3.4. Alignement de séquences entre les lysines de DEPTOR et les substrats connus de KDM4A

Les acides aminés en rouge sont identiques alors que ceux en vert possèdent des caractéristiques de charge et/ou d'hydrophobicité similaires. H3K9 et H3K36 sont des lysines déméthylées par KDM4A alors que H4K20 et H3K4 sont des lysines liées par KDM4A grâce à son domaine tudor. DEPTOR comporte quant à lui 26 lysines.

H3K9 K Q T A R K S T G G K
 H3K36 A T G G V K K P H R Y

 H3K4 A R T K Q T A R K
 H4K20 A K R H R K V L R D N

Figure 3.5. Alignement des lysines déméthylées et liées par KDM4A

Les acides aminés en rouge sont identiques alors que ceux en vert possèdent des caractéristiques de charge et/ou d'hydrophobicité similaires. Il ne semble pas y avoir de séquence consensus pour les lysines déméthylées par KDM4A ni pour les lysines liées par le domaine tudor de cette déméthylase.

9. Stabilisation de DEPTOR par KDM4A

L'expression des formes mutées de IDH1/2 et la déplétion de KDM4A activent mTOR grâce à la déstabilisation de DEPTOR (Figure 2.4b-d). Suite à l'activation de mTOR, DEPTOR est phosphorylé par mTOR, puis par CK1 (Gao et al., 2011, Duan et al., 2011). Ces phosphorylations permettent par la suite à β -TrCP d'ubiquitiner DEPTOR, entraînant par le fait même sa dégradation protéolytique (Gao et al., 2011, Duan et al., 2011, Zhao et al., 2011). KDM4A pourrait donc être en mesure de réguler l'une de ces étapes, régulant ainsi la stabilité de DEPTOR. Le fait que KDM4A soit en mesure de co-immunoprécipiter β -TrCP suggère que cette déméthylase pourrait être en mesure de réguler l'activité E3 ligase de β -TrCP (Figure 3.6). Il pourrait donc être intéressant de vérifier les niveaux d'ubiquitination de DEPTOR lorsque KDM4A est surexprimé à l'aide d'une immunoprécipitation contre l'ubiquitine. Cette approche permettrait également de vérifier la contribution de l'activité catalytique et du domaine tudor de KDM4A puisque différents mutants de KDM4A pourraient être utilisés. En effet, la contribution de l'activité catalytique de KDM4A pourrait être évaluée grâce à un mutant catalytiquement inactif KDM4A^{H188A} (Klose et al., 2006). Pour vérifier la contribution du domaine tudor, les mutants D945R et D939R, qui affectent respectivement l'interaction avec H3K4(me3) et H4K20(me3), pourraient être utilisés (Lee et al., 2008). En revanche, il est possible que les résidus impliqués dans la reconnaissance de DEPTOR par KDM4A soient différent de ceux impliqués dans la reconnaissance des histones et que ces mutants n'aient par

conséquent aucun effet. Une délétion complète du domaine tudor pourrait alors être réalisée afin de vérifier les effets engendrés sur la stabilité de DEPTOR. Cependant, une telle délétion pourrait affecter la structure et/ou la stabilité de KDM4A, ce qui pourrait influencer les résultats obtenus. C'est pourquoi il serait préférable de vérifier préalablement si KDM4A^{D945R} et KDM4A^{D939R} affectent les niveaux d'ubiquitination de DEPTOR.

La contribution du domaine tudor de KDM4A nécessiterait pour sa part la délétion complète du domaine tudor puisque les acides aminés permettant l'interaction entre le domaine tudor de KDM4A et les histones varient. En effet, alors que la mutation de l'acide aspartique 945 en arginine résulte en la perte d'interaction entre KDM4A et H3K4(me3), la mutation de l'acide aspartique 939 en arginine entraîne pour sa part la perte d'interaction entre KDM4A et H4K20(me3). Il pourrait néanmoins être intéressant de vérifier si l'un de ces deux mutants affecte les niveaux d'ubiquitination de DEPTOR puisqu'ils ont l'avantage d'altérer beaucoup moins la structure de KDM4A que la délétion d'un domaine complet, évitant ainsi que les résultats observés ne soient uniquement dus à un changement de structure.

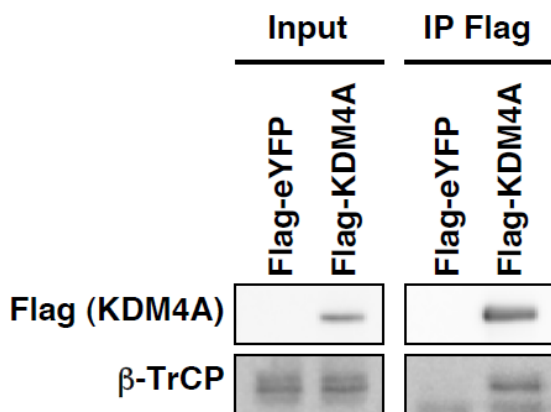


Figure 3.6. Interaction entre KDM4A et β -TrCP

Transfection de 293T avec Flag-eYFP ou Flag-KDM4A suivie d'une immunoprécipitation Flag et d'immunobuvardages de type Western.

KDM4A pourrait également moduler l'interaction entre DEPTOR et β -TrCP. KDM4A stabilisant DEPTOR, il serait possible de vérifier par immunoprécipitation si KDM4A est en mesure de perturber l'interaction entre DEPTOR et β -TrCP. Encore une fois, il serait également possible d'utiliser KDM4A^{H188A} afin de vérifier la contribution de l'activité

catalytique de KDM4A et différents mutants du domaine tudor afin de vérifier la contribution de ce dernier.

La phosphorylation de DEPTOR étant préalable à sa dégradation, KDM4A pourrait également être impliqué dans la régulation de ce processus. Il serait donc possible de vérifier par immunobuvardage de type Western si la déplétion ou la surexpression de KDM4A permet de moduler la phosphorylation de DEPTOR. L'utilisation de KDM4A^{H188A} ou de mutants du domaine tudor pourrait encore une fois fournir des indices quant au mécanisme de régulation.

Chapitre 4 : Conclusion

La récurrence des mutations de IDH1/2 chez différents types de cancers dont les gliomes n'ayant été mise en évidence que récemment, les mécanismes oncogéniques régulés par ces mutations sont encore mal définis. Ainsi, la caractérisation de ces divers mécanismes revêt une importance particulière pour la mise au point de thérapies plus adaptées et mieux ciblées. C'est pourquoi ce projet de recherche visait à mieux caractériser les effets découlant de mutations de IDH1/2.

Nos travaux ont permis l'identification d'un nouveau mécanisme oncogénique régulé par les formes mutées de IDH1/2. En effet, ces mutations sont en mesure d'activer mTOR grâce à la production de 2HG, un oncométabolite permettant l'inhibition de KDM4A. Cette déméthylase étant impliquée dans la stabilisation de DEPTOR, ce dernier est déstabilisé chez les cellules possédant une mutation de IDH1/2, entraînant par conséquent l'activation de mTOR. Ces travaux n'ont donc pas servi uniquement à l'identification d'un nouveau mécanisme oncogénique régulé par les formes mutées de IDH1/2, mais également à la mise en évidence d'un nouveau mode de régulation de mTOR faisant intervenir les défauts du métabolisme observé chez les cellules cancéreuses de même que des oxygénases α -kétoglutarate dépendantes.

Les résultats générés dans le cadre de ce projet de recherche permettent une meilleure compréhension des mécanismes affectés par les mutations de IDH1/2, favorisant ainsi le développement de nouvelles avenues thérapeutiques pour les gliomes et l'utilisation de thérapies mieux adaptées. En effet, sachant que l'activation de mTOR a lieu en aval de PI3K chez les gliomes possédant une mutation de IDH1/2, la pertinence de l'utilisation d'inhibiteurs de PI3K pourrait être remise en question dans ces cas. L'identification d'un nouveau mécanisme de régulation de mTOR permet également d'élargir l'impact thérapeutique pouvant découler de ce projet de recherche puisque de nouvelles thérapies pour l'ensemble des tumeurs chez lesquelles mTOR est constitutivement activé pourraient être développées.

Bibliographie

- ABRAMS, C. S., ZHANG, J., DOWNES, C. P., TANG, X., ZHAO, W. & RITTENHOUSE, S. E. 1996. Phosphopleckstrin inhibits gbetagamma-activable platelet phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase. *J Biol Chem*, 271, 25192-7.
- ACHOURI, Y., NOEL, G., VERTOMMEN, D., RIDER, M. H., VEIGA-DA-CUNHA, M. & VAN SCHAFTINGEN, E. 2004. Identification of a dehydrogenase acting on D-2-hydroxyglutarate. *Biochem J*, 381, 35-42.
- ALESSI, D. R., JAMES, S. R., DOWNES, C. P., HOLMES, A. B., GAFFNEY, P. R., REESE, C. B. & COHEN, P. 1997. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balph. *Curr Biol*, 7, 261-9.
- AMARY, M. F., BACSI, K., MAGGIANI, F., DAMATO, S., HALAI, D., BERISHA, F., POLLOCK, R., O'DONNELL, P., GRIGORIADIS, A., DISS, T., ESKANDARPOUR, M., PRESNEAU, N., HOGENDOORN, P. C., FUTREAL, A., TIRABOSCO, R. & FLANAGAN, A. M. 2011. IDH1 and IDH2 mutations are frequent events in central chondrosarcoma and central and periosteal chondromas but not in other mesenchymal tumours. *J Pathol*, 224, 334-43.
- AMATO, R., D'ANTONA, L., PORCIATTI, G., AGOSTI, V., MENNITI, M., RINALDO, C., COSTA, N., BELLACCHIO, E., MATTAROCCHI, S., FUIANO, G., SODDU, S., PAGGI, M. G., LANG, F. & PERROTTI, N. 2009. Sgk1 activates MDM2-dependent p53 degradation and affects cell proliferation, survival, and differentiation. *J Mol Med (Berl)*, 87, 1221-39.
- AMIT, S., HATZUBAI, A., BIRMAN, Y., ANDERSEN, J. S., BEN-SHUSHAN, E., MANN, M., BEN-NERIAH, Y. & ALKALAY, I. 2002. Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev*, 16, 1066-76.
- ANASTAS, J. N. & MOON, R. T. 2013. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer*, 13, 11-26.
- ANDRADE, M. A. & BORK, P. 1995. HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nat Genet*, 11, 115-6.
- APFELD, J., O'CONNOR, G., MCDONAGH, T., DISTEFANO, P. S. & CURTIS, R. 2004. The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in *C. elegans*. *Genes Dev*, 18, 3004-9.
- BACHMANN, R. A., KIM, J. H., WU, A. L., PARK, I. H. & CHEN, J. 2006. A nuclear transport signal in mammalian target of rapamycin is critical for its cytoplasmic signaling to S6 kinase 1. *J Biol Chem*, 281, 7357-63.
- BAGCHI, A., PAPAZOGLU, C., WU, Y., CAPURSO, D., BRODT, M., FRANCIS, D., BREDEL, M., VOGEL, H. & MILLS, A. A. 2007. CHD5 is a tumor suppressor at human 1p36. *Cell*, 128, 459-75.
- BALSS, J., MEYER, J., MUELLER, W., KORSHUNOV, A., HARTMANN, C. & VON DEIMLING, A. 2008. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol*, 116, 597-602.

- BANERJEE, P., AHMAD, M. F., GROVE, J. R., KOZLOSZY, C., PRICE, D. J. & AVRUCH, J. 1990. Molecular structure of a major insulin/mitogen-activated 70-kDa S6 protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 8550-4.
- BANNISTER, A. J., ZEGERMAN, P., PARTRIDGE, J. F., MISKA, E. A., THOMAS, J. O., ALLSHIRE, R. C. & KOUZARIDES, T. 2001. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*, 410, 120-4.
- 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. & SABATINI, D. M. 2013. A Tumor suppressor complex with GAP activity for the Rag GTPases that signal amino acid sufficiency to mTORC1. *Science*, 340, 1100-6.
- BAR-PELED, L., SCHWEITZER, L. D., ZONCU, R. & SABATINI, D. M. 2012. Ragulator is a GEF for the rag GTPases that signal amino acid levels to mTORC1. *Cell*, 150, 1196-208.
- BAUCHART-THEVRET, C., CUI, L., WU, G. & BURRIN, D. G. 2010. Arginine-induced stimulation of protein synthesis and survival in IPEC-J2 cells is mediated by mTOR but not nitric oxide. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 299, E899-909.
- BAYSAL, B. E., WILLETT-BROZICK, J. E., LAWRENCE, E. C., DROVDLIC, C. M., SAVUL, S. A., MCLEOD, D. R., YEE, H. A., BRACKMANN, D. E., SLATTERY, W. H., 3RD, MYERS, E. N., FERRELL, R. E. & RUBINSTEIN, W. S. 2002. Prevalence of SDHB, SDHC, and SDHD germline mutations in clinic patients with head and neck paragangliomas. *J Med Genet*, 39, 178-83.
- BEN-SAHRA, I., HOWELL, J. J., ASARA, J. M. & MANNING, B. D. 2013. Stimulation of de novo pyrimidine synthesis by growth signaling through mTOR and S6K1. *Science*, 339, 1323-8.
- BENVENUTO, G., LI, S., BROWN, S. J., BRAVERMAN, R., VASS, W. C., CHEADLE, J. P., HALLEY, D. J., SAMPSON, J. R., WIENECKE, R. & DECLUE, J. E. 2000. The tuberous sclerosis-1 (TSC1) gene product hamartin suppresses cell growth and augments the expression of the TSC2 product tuberin by inhibiting its ubiquitination. *Oncogene*, 19, 6306-16.
- BERKEL, H. J., TURBAT-HERRERA, E. A., SHI, R. & DE BENEDETTI, A. 2001. Expression of the translation initiation factor eIF4E in the polyp-cancer sequence in the colon. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 10, 663-6.
- BIENZ, M. 2006. The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain. *Trends Biochem Sci*, 31, 35-40.
- BLACK, J. C., ALLEN, A., VAN RECHEM, C., FORBES, E., LONGWORTH, M., TSCHOP, K., RINEHART, C., QUITON, J., WALSH, R., SMALLWOOD, A., DYSON, N. J. & WHETSTINE, J. R. 2010. Conserved antagonism between JMJD2A/KDM4A and HP1gamma during cell cycle progression. *Mol Cell*, 40, 736-48.
- BLACK, J. C., MANNING, A. L., VAN RECHEM, C., KIM, J., LADD, B., CHO, J., PINEDA, C. M., MURPHY, N., DANIELS, D. L., MONTAGNA, C., LEWIS, P. W., GLASS, K., ALLIS, C. D., DYSON, N. J., GETZ, G. & WHETSTINE, J. R. 2013. KDM4A lysine demethylase induces site-specific copy gain and rereplication of regions amplified in tumors. *Cell*, 154, 541-55.
- BLEEKER, F. E., LAMBA, S., LEENSTRA, S., TROOST, D., HULSEBOS, T., VANDERTOP, W. P., FRATTINI, M., MOLINARI, F., KNOWLES, M., CERRATO,

- A., RODOLFO, M., SCARPA, A., FELICIONI, L., BUTTITTA, F., MALATESTA, S., MARCHETTI, A. & BARDELLI, A. 2009. IDH1 mutations at residue p.R132 (IDH1(R132)) occur frequently in high-grade gliomas but not in other solid tumors. *Hum Mutat*, 30, 7-11.
- BLENIS, J. 1993. Signal transduction via the MAP kinases: proceed at your own RSK. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 5889-92.
- BONFILS, G., JAQUENOUD, M., BONTRON, S., OSTROWICZ, C., UNGERMANN, C. & DE VIRGILIO, C. 2012. Leucyl-tRNA synthetase controls TORC1 via the EGO complex. *Mol Cell*, 46, 105-10.
- BORGER, D. R., TANABE, K. K., FAN, K. C., LOPEZ, H. U., FANTIN, V. R., STRALEY, K. S., SCHENKEIN, D. P., HEZEL, A. F., ANCUKIEWICZ, M., LIEBMAN, H. M., KWAK, E. L., CLARK, J. W., RYAN, D. P., DESHPANDE, V., DIAS-SANTAGATA, D., ELLISEN, L. W., ZHU, A. X. & IAFRATE, A. J. 2012. Frequent mutation of isocitrate dehydrogenase (IDH)1 and IDH2 in cholangiocarcinoma identified through broad-based tumor genotyping. *Oncologist*, 17, 72-9.
- BOSOTTI, R., ISACCHI, A. & SONNHAMMER, E. L. 2000. FAT: a novel domain in PIK-related kinases. *Trends Biochem Sci*, 25, 225-7.
- BOTUYAN, M. V., LEE, J., WARD, I. M., KIM, J. E., THOMPSON, J. R., CHEN, J. & MER, G. 2006. Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair. *Cell*, 127, 1361-73.
- BROWN, E. J., ALBERS, M. W., SHIN, T. B., ICHIKAWA, K., KEITH, C. T., LANE, W. S. & SCHREIBER, S. L. 1994. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature*, 369, 756-8.
- BRUNET, A., BONNI, A., ZIGMOND, M. J., LIN, M. Z., JUO, P., HU, L. S., ANDERSON, M. J., ARDEN, K. C., BLENIS, J. & GREENBERG, M. E. 1999. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*, 96, 857-68.
- BRUNET, A., PARK, J., TRAN, H., HU, L. S., HEMMINGS, B. A. & GREENBERG, M. E. 2001. Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a). *Mol Cell Biol*, 21, 952-65.
- BUTTGEREIT, F. & BRAND, M. D. 1995. A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells. *Biochem J*, 312 (Pt 1), 163-7.
- CAI, S. L., TEE, A. R., SHORT, J. D., BERGERON, J. M., KIM, J., SHEN, J., GUO, R., JOHNSON, C. L., KIGUCHI, K. & WALKER, C. L. 2006. Activity of TSC2 is inhibited by AKT-mediated phosphorylation and membrane partitioning. *J Cell Biol*, 173, 279-89.
- CARLING, D. 2004. The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control. *Trends Biochem Sci*, 29, 18-24.
- CARRIERE, A., CARGNELLO, M., JULIEN, L. A., GAO, H., BONNEIL, E., THIBAUT, P. & ROUX, P. P. 2008. Oncogenic MAPK signaling stimulates mTORC1 activity by promoting RSK-mediated raptor phosphorylation. *Curr Biol*, 18, 1269-77.
- CARRIERE, A., ROMEO, Y., ACOSTA-JAQUEZ, H. A., MOREAU, J., BONNEIL, E., THIBAUT, P., FINGAR, D. C. & ROUX, P. P. 2011. ERK1/2 phosphorylate Raptor to promote Ras-dependent activation of mTOR complex 1 (mTORC1). *J Biol Chem*, 286, 567-77.

- CHALMERS, R. A., LAWSON, A. M., WATTS, R. W., TAVILL, A. S., KAMERLING, J. P., HEY, E. & OGILVIE, D. 1980. D-2-hydroxyglutaric aciduria: case report and biochemical studies. *J Inherit Metab Dis*, 3, 11-5.
- CHAN, E. Y., KIR, S. & TOOZE, S. A. 2007. siRNA screening of the kinome identifies ULK1 as a multidomain modulator of autophagy. *J Biol Chem*, 282, 25464-74.
- CHAN, E. Y., LONGATTI, A., MCKNIGHT, N. C. & TOOZE, S. A. 2009. Kinase-inactivated ULK proteins inhibit autophagy via their conserved C-terminal domains using an Atg13-independent mechanism. *Mol Cell Biol*, 29, 157-71.
- CHANG, K. H., KING, O. N., TUMBER, A., WOON, E. C., HEIGHTMAN, T. D., MCDONOUGH, M. A., SCHOFIELD, C. J. & ROSE, N. R. 2011. Inhibition of histone demethylases by 4-carboxy-2,2'-bipyridyl compounds. *ChemMedChem*, 6, 759-64.
- CHAUVIN, C., KOKA, V., NOUSCHI, A., MIEULET, V., HOAREAU-AVEILLA, C., DREAZEN, A., CAGNARD, N., CARPENTIER, W., KISS, T., MEYUHAS, O. & PENDE, M. 2014. Ribosomal protein S6 kinase activity controls the ribosome biogenesis transcriptional program. *Oncogene*, 33, 474-83.
- CHAUVEROUX, C., EICHNER, L. J., DUFOUR, C. R., SHATNAWI, A., KHOUTORSKY, A., BOURQUE, G., SONENBERG, N. & GIGUERE, V. 2013. Molecular and genetic crosstalks between mTOR and ERRA α are key determinants of rapamycin-induced nonalcoholic fatty liver. *Cell Metab*, 17, 586-98.
- CHEN, B., ZHANG, W., GAO, J., CHEN, H., JIANG, L., LIU, D., CAO, Y., ZHAO, S., QIU, Z., ZENG, J., ZHANG, S. & LI, W. 2014. Downregulation of ribosomal protein S6 inhibits the growth of non-small cell lung cancer by inducing cell cycle arrest, rather than apoptosis. *Cancer Lett*, 354, 378-89.
- CHEN, J., ZHENG, X. F., BROWN, E. J. & SCHREIBER, S. L. 1995. Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 4947-51.
- CHEUNG, P. C., SALT, I. P., DAVIES, S. P., HARDIE, D. G. & CARLING, D. 2000. Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. *Biochem J*, 346 Pt 3, 659-69.
- CHIN, R. M., FU, X., PAI, M. Y., VERGNES, L., HWANG, H., DENG, G., DIEP, S., LOMENICK, B., MELI, V. S., MONSALVE, G. C., HU, E., WHELAN, S. A., WANG, J. X., JUNG, G., SOLIS, G. M., FAZLOLLAHI, F., KAWEETEERAWAT, C., QUACH, A., NILI, M., KRALL, A. S., GODWIN, H. A., CHANG, H. R., FAULL, K. F., GUO, F., JIANG, M., TRAUGER, S. A., SAGHATELIAN, A., BRAAS, D., CHRISTOFK, H. R., CLARKE, C. F., TEITELL, M. A., PETRASCHECK, M., REUE, K., JUNG, M. E., FRAND, A. R. & HUANG, J. 2014. The metabolite alpha-ketoglutarate extends lifespan by inhibiting ATP synthase and TOR. *Nature*, 510, 397-401.
- CHOE, Y., JUNG, H., KHANG, I. & KIM, K. 2003. Selective roles of protein kinase C isoforms on cell motility of GT1 immortalized hypothalamic neurones. *J Neuroendocrinol*, 15, 508-15.
- CHOO, A. Y. & BLENIS, J. 2009. Not all substrates are treated equally: implications for mTOR, rapamycin-resistance and cancer therapy. *Cell Cycle*, 8, 567-72.

- CHOO, A. Y., YOON, S. O., KIM, S. G., ROUX, P. P. & BLENIS, J. 2008. Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 17414-9.
- CHOWDHURY, R., YEOH, K. K., TIAN, Y. M., HILLRINGHAUS, L., BAGG, E. A., ROSE, N. R., LEUNG, I. K., LI, X. S., WOON, E. C., YANG, M., MCDONOUGH, M. A., KING, O. N., CLIFTON, I. J., KLOSE, R. J., CLARIDGE, T. D., RATCLIFFE, P. J., SCHOFIELD, C. J. & KAWAMURA, A. 2011. The oncometabolite 2-hydroxyglutarate inhibits histone lysine demethylases. *EMBO Rep*, 12, 463-9.
- CLOOS, P. A., CHRISTENSEN, J., AGGER, K., MAIOLICA, A., RAPPSSILBER, J., ANTAL, T., HANSEN, K. H. & HELIN, K. 2006. The putative oncogene GASC1 demethylates tri- and dimethylated lysine 9 on histone H3. *Nature*, 442, 307-11.
- COOK, D., FRY, M. J., HUGHES, K., SUMATHIPALA, R., WOODGETT, J. R. & DALE, T. C. 1996. Wntless inactivates glycogen synthase kinase-3 via an intracellular signalling pathway which involves a protein kinase C. *Embo j*, 15, 4526-36.
- CREW, J. P., FUGGLE, S., BICKNELL, R., CRANSTON, D. W., DE BENEDETTI, A. & HARRIS, A. L. 2000. Eukaryotic initiation factor-4E in superficial and muscle invasive bladder cancer and its correlation with vascular endothelial growth factor expression and tumour progression. *Br J Cancer*, 82, 161-6.
- CREWS, C. M. & ERIKSON, R. L. 1992. Purification of a murine protein-tyrosine/threonine kinase that phosphorylates and activates the Erk-1 gene product: relationship to the fission yeast *byr1* gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 8205-9.
- CULJKOVIC, B. & BORDEN, K. L. 2009. Understanding and Targeting the Eukaryotic Translation Initiation Factor eIF4E in Head and Neck Cancer. *J Oncol*, 2009, 981679.
- CUNNINGHAM, J. T., RODGERS, J. T., ARLOW, D. H., VAZQUEZ, F., MOOTHA, V. K. & PUIGSERVER, P. 2007. mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. *Nature*, 450, 736-40.
- DANG, L., JIN, S. & SU, S. M. 2010. IDH mutations in glioma and acute myeloid leukemia. *Trends Mol Med*, 16, 387-97.
- DANG, L., WHITE, D. W., GROSS, S., BENNETT, B. D., BITTINGER, M. A., DRIGGERS, E. M., FANTIN, V. R., JANG, H. G., JIN, S., KEENAN, M. C., MARKS, K. M., PRINS, R. M., WARD, P. S., YEN, K. E., LIAU, L. M., RABINOWITZ, J. D., CANTLEY, L. C., THOMPSON, C. B., VANDER HEIDEN, M. G. & SU, S. M. 2009. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*, 462, 739-44.
- DE BENEDETTI, A. & HARRIS, A. L. 1999. eIF4E expression in tumors: its possible role in progression of malignancies. *Int J Biochem Cell Biol*, 31, 59-72.
- DE STANCHINA, E., QUERIDO, E., NARITA, M., DAVULURI, R. V., PANDOLFI, P. P., FERBEYRE, G. & LOWE, S. W. 2004. PML is a direct p53 target that modulates p53 effector functions. *Mol Cell*, 13, 523-35.
- DEGENHARDT, K., MATHEW, R., BEAUDOIN, B., BRAY, K., ANDERSON, D., CHEN, G., MUKHERJEE, C., SHI, Y., GELINAS, C., FAN, Y., NELSON, D. A., JIN, S. & WHITE, E. 2006. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell*, 10, 51-64.
- DENG, J. & SZYF, M. 1998. Multiple isoforms of DNA methyltransferase are encoded by the vertebrate cytosine DNA methyltransferase gene. *J Biol Chem*, 273, 22869-72.

- DER, C. J., KRONTIRIS, T. G. & COOPER, G. M. 1982. Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79, 3637-40.
- DEVIREDDY, L. R., TEODORO, J. G., RICHARD, F. A. & GREEN, M. R. 2001. Induction of apoptosis by a secreted lipocalin that is transcriptionally regulated by IL-3 deprivation. *Science*, 293, 829-34.
- DHAYALAN, A., RAJAVELU, A., RATHER, P., TAMAS, R., JURKOWSKA, R. Z., RAGOZIN, S. & JELTSCH, A. 2010. The Dnmt3a PWWP domain reads histone 3 lysine 36 trimethylation and guides DNA methylation. *J Biol Chem*, 285, 26114-20.
- DHILLON, A. S., HAGAN, S., RATH, O. & KOLCH, W. 2007. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*, 26, 3279-90.
- DIBBLE, C. C., ASARA, J. M. & MANNING, B. D. 2009. Characterization of Rictor phosphorylation sites reveals direct regulation of mTOR complex 2 by S6K1. *Mol Cell Biol*, 29, 5657-70.
- DIBBLE, C. C., ELIS, W., MENON, S., QIN, W., KLEKOTA, J., ASARA, J. M., FINAN, P. M., KWIATKOWSKI, D. J., MURPHY, L. O. & MANNING, B. D. 2012. TBC1D7 is a third subunit of the TSC1-TSC2 complex upstream of mTORC1. *Mol Cell*, 47, 535-46.
- DILLING, M. B., DIAS, P., SHAPIRO, D. N., GERMAIN, G. S., JOHNSON, R. K. & HOUGHTON, P. J. 1994. Rapamycin selectively inhibits the growth of childhood rhabdomyosarcoma cells through inhibition of signaling via the type I insulin-like growth factor receptor. *Cancer Res*, 54, 903-7.
- DING, V. W., CHEN, R. H. & MCCORMICK, F. 2000. Differential regulation of glycogen synthase kinase 3beta by insulin and Wnt signaling. *J Biol Chem*, 275, 32475-81.
- DORRELLO, N. V., PESCHIAROLI, A., GUARDAVACCARO, D., COLBURN, N. H., SHERMAN, N. E. & PAGANO, M. 2006. S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science*, 314, 467-71.
- DUAN, S., SKAAR, J. R., KUCHAY, S., TOSCHI, A., KANAREK, N., BEN-NERIAH, Y. & PAGANO, M. 2011. mTOR generates an auto-amplification loop by triggering the betaTrCP- and CK1alpha-dependent degradation of DEPTOR. *Mol Cell*, 44, 317-24.
- DURAN, M., KAMERLING, J. P., BAKKER, H. D., VAN GENNIP, A. H. & WADMAN, S. K. 1980. L-2-Hydroxyglutaric aciduria: an inborn error of metabolism? *J Inherit Metab Dis*, 3, 109-12.
- DURAN, R. V., OPPLIGER, W., ROBITAILLE, A. M., HEISERICH, L., SKENDAJ, R., GOTTLIEB, E. & HALL, M. N. 2012. Glutaminolysis activates Rag-mTORC1 signaling. *Mol Cell*, 47, 349-58.
- DUVEL, K., YECIES, J. L., MENON, S., RAMAN, P., LIPOVSKY, A. I., SOUZA, A. L., TRIANTAFELLOW, E., MA, Q., GORSKI, R., CLEAVER, S., VANDER HEIDEN, M. G., MACKEIGAN, J. P., FINAN, P. M., CLISH, C. B., MURPHY, L. O. & MANNING, B. D. 2010. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell*, 39, 171-83.
- EGAN, D. F., SHACKELFORD, D. B., MIHAYLOVA, M. M., GELINO, S., KOHNZ, R. A., MAIR, W., VASQUEZ, D. S., JOSHI, A., GWINN, D. M., TAYLOR, R., ASARA, J. M., FITZPATRICK, J., DILLIN, A., VIOLLET, B., KUNDU, M., HANSEN, M. & SHAW, R. J. 2011. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science*, 331, 456-61.

- EL-DEIRY, W. S., TOKINO, T., VELCULESCU, V. E., LEVY, D. B., PARSONS, R., TRENT, J. M., LIN, D., MERCER, W. E., KINZLER, K. W. & VOGELSTEIN, B. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 75, 817-25.
- ELLISEN, L. W., RAMSAYER, K. D., JOHANNESSEN, C. M., YANG, A., BEPPU, H., MINDA, K., OLINER, J. D., MCKEON, F. & HABER, D. A. 2002. REDD1, a developmentally regulated transcriptional target of p63 and p53, links p63 to regulation of reactive oxygen species. *Mol Cell*, 10, 995-1005.
- EPSTEIN, A. C., GLEADLE, J. M., MCNEILL, L. A., HEWITSON, K. S., O'ROURKE, J., MOLE, D. R., MUKHERJI, M., METZEN, E., WILSON, M. I., DHANDA, A., TIAN, Y. M., MASSON, N., HAMILTON, D. L., JAAKKOLA, P., BARSTEAD, R., HODGKIN, J., MAXWELL, P. H., PUGH, C. W., SCHOFIELD, C. J. & RATCLIFFE, P. J. 2001. C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*, 107, 43-54.
- FELDMAN, M. E., APSEL, B., UOTILA, A., LOEWITH, R., KNIGHT, Z. A., RUGGERO, D. & SHOKAT, K. M. 2009. Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biol*, 7, e38.
- FENG, Z., ZHANG, H., LEVINE, A. J. & JIN, S. 2005. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 8204-9.
- FERBEYRE, G., DE STANCHINA, E., QUERIDO, E., BAPTISTE, N., PRIVES, C. & LOWE, S. W. 2000. PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev*, 14, 2015-27.
- FIGUEROA, M. E., ABDEL-WAHAB, O., LU, C., WARD, P. S., PATEL, J., SHIH, A., LI, Y., BHAGWAT, N., VASANTHAKUMAR, A., FERNANDEZ, H. F., TALLMAN, M. S., SUN, Z., WOLNIAK, K., PEETERS, J. K., LIU, W., CHOE, S. E., FANTIN, V. R., PAIETTA, E., LOWENBERG, B., LICHT, J. D., GODLEY, L. A., DELWEL, R., VALK, P. J., THOMPSON, C. B., LEVINE, R. L. & MELNICK, A. 2010. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell*, 18, 553-67.
- FODOR, B. D., KUBICEK, S., YONEZAWA, M., O'SULLIVAN, R. J., SENGUPTA, R., PEREZ-BURGOS, L., OPRAVIL, S., MECHTLER, K., SCHOTTA, G. & JENUWEIN, T. 2006. Jmjd2b antagonizes H3K9 trimethylation at pericentric heterochromatin in mammalian cells. *Genes Dev*, 20, 1557-62.
- FORSYTHE, J. A., JIANG, B. H., IYER, N. V., AGANI, F., LEUNG, S. W., KOOS, R. D. & SEMENZA, G. L. 1996. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*, 16, 4604-13.
- FOURNIER, D. B., CHISAMORE, M., LURAIN, J. R., RADEMAKER, A. W., JORDAN, V. C. & TONETTI, D. A. 2001. Protein kinase C alpha expression is inversely related to ER status in endometrial carcinoma: possible role in AP-1-mediated proliferation of ER-negative endometrial cancer. *Gynecol Oncol*, 81, 366-72.
- FRIAS, M. A., THOREEN, C. C., JAFFE, J. D., SCHRODER, W., SCULLEY, T., CARR, S. A. & SABATINI, D. M. 2006. mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Curr Biol*, 16, 1865-70.
- FU, X., CHIN, R. M., VERGNES, L., HWANG, H., DENG, G., XING, Y., PAI, M. Y., LI, S., TA, L., FAZLOLLAHI, F., CHEN, C., PRINS, R. M., TEITELL, M. A., NATHANSON, D. A., LAI, A., FAULL, K. F., JIANG, M., CLARKE, S. G., CLOUGHESY, T. F., GRAEBER, T. G., BRAAS, D., CHRISTOFK, H. R., JUNG, M.

- E., REUE, K. & HUANG, J. 2015. 2-Hydroxyglutarate Inhibits ATP Synthase and mTOR Signaling. *Cell Metab*, 22, 508-15.
- FURNARI, F. B., LIN, H., HUANG, H. S. & CAVENEE, W. K. 1997. Growth suppression of glioma cells by PTEN requires a functional phosphatase catalytic domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 12479-84.
- GANLEY, I. G., LAM DU, H., WANG, J., DING, X., CHEN, S. & JIANG, X. 2009. ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem*, 284, 12297-305.
- GAO, D., INUZUKA, H., TAN, M. K., FUKUSHIMA, H., LOCASALE, J. W., LIU, P., WAN, L., ZHAI, B., CHIN, Y. R., SHAIK, S., LYSSIOS, C. A., GYGI, S. P., TOKER, A., CANTLEY, L. C., ASARA, J. M., HARPER, J. W. & WEI, W. 2011. mTOR drives its own activation via SCF(betaTrCP)-dependent degradation of the mTOR inhibitor DEPTOR. *Mol Cell*, 44, 290-303.
- GAUDET, F., TALBOT, D., LEONHARDT, H. & JAENISCH, R. 1998. A short DNA methyltransferase isoform restores methylation in vivo. *J Biol Chem*, 273, 32725-9.
- GEOERGER, B., KERR, K., TANG, C. B., FUNG, K. M., POWELL, B., SUTTON, L. N., PHILLIPS, P. C. & JANSS, A. J. 2001. Antitumor activity of the rapamycin analog CCI-779 in human primitive neuroectodermal tumor/medulloblastoma models as single agent and in combination chemotherapy. *Cancer Res*, 61, 1527-32.
- GILLEY, J., COFFER, P. J. & HAM, J. 2003. FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons. *J Cell Biol*, 162, 613-22.
- GIMM, O., ARMANIOS, M., DZIEMA, H., NEUMANN, H. P. & ENG, C. 2000. Somatic and occult germ-line mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in nonfamilial pheochromocytoma. *Cancer Res*, 60, 6822-5.
- GINGRAS, A. C., GYGI, S. P., RAUGHT, B., POLAKIEWICZ, R. D., ABRAHAM, R. T., HOEKSTRA, M. F., AEBERSOLD, R. & SONENBERG, N. 1999a. Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev*, 13, 1422-37.
- GINGRAS, A. C., RAUGHT, B. & SONENBERG, N. 1999b. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem*, 68, 913-63.
- GIRI, D. & ITTMANN, M. 1999. Inactivation of the PTEN tumor suppressor gene is associated with increased angiogenesis in clinically localized prostate carcinoma. *Hum Pathol*, 30, 419-24.
- GRASSIAN, A. R., PARKER, S. J., DAVIDSON, S. M., DIVAKARUNI, A. S., GREEN, C. R., ZHANG, X., SLOCUM, K. L., PU, M., LIN, F., VICKERS, C., JOUD-CALDWELL, C., CHUNG, F., YIN, H., HANDLY, E. D., STRAUB, C., GROWNEY, J. D., VANDER HEIDEN, M. G., MURPHY, A. N., PAGLIARINI, R. & METALLO, C. M. 2014. IDH1 mutations alter citric acid cycle metabolism and increase dependence on oxidative mitochondrial metabolism. *Cancer Res*, 74, 3317-31.
- GREWE, M., GANSAUGE, F., SCHMID, R. M., ADLER, G. & SEUFFERLEIN, T. 1999. Regulation of cell growth and cyclin D1 expression by the constitutively active FRAP-p70s6K pathway in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res*, 59, 3581-7.
- GRUNWALD, V., DEGRAFFENRIED, L., RUSSEL, D., FRIEDRICH, W. E., RAY, R. B. & HIDALGO, M. 2002. Inhibitors of mTOR reverse doxorubicin resistance conferred by PTEN status in prostate cancer cells. *Cancer Res*, 62, 6141-5.

- GULHATI, P., BOWEN, K. A., LIU, J., STEVENS, P. D., RYCHAHOU, P. G., CHEN, M., LEE, E. Y., WEISS, H. L., O'CONNOR, K. L., GAO, T. & EVERS, B. M. 2011. mTORC1 and mTORC2 regulate EMT, motility, and metastasis of colorectal cancer via RhoA and Rac1 signaling pathways. *Cancer Res*, 71, 3246-56.
- GUO, D., PRINS, R. M., DANG, J., KUGA, D., IWANAMI, A., SOTO, H., LIN, K. Y., HUANG, T. T., AKHAVAN, D., HOCK, M. B., ZHU, S., KOFMAN, A. A., BENSINGER, S. J., YONG, W. H., VINTERS, H. V., HORVATH, S., WATSON, A. D., KUHN, J. G., ROBINS, H. I., MEHTA, M. P., WEN, P. Y., DEANGELIS, L. M., PRADOS, M. D., MELLINGHOFF, I. K., CLOUGHESY, T. F. & MISCHER, P. S. 2009. EGFR signaling through an Akt-SREBP-1-dependent, rapamycin-resistant pathway sensitizes glioblastomas to antilipogenic therapy. *Sci Signal*, 2, ra82.
- GUO, D., REINITZ, F., YOUSSEF, M., HONG, C., NATHANSON, D., AKHAVAN, D., KUGA, D., AMZAJERDI, A. N., SOTO, H., ZHU, S., BABIC, I., TANAKA, K., DANG, J., IWANAMI, A., GINI, B., DEJESUS, J., LISIERO, D. D., HUANG, T. T., PRINS, R. M., WEN, P. Y., ROBINS, H. I., PRADOS, M. D., DEANGELIS, L. M., MELLINGHOFF, I. K., MEHTA, M. P., JAMES, C. D., CHAKRAVARTI, A., CLOUGHESY, T. F., TONTONOZ, P. & MISCHER, P. S. 2011. An LXR agonist promotes glioblastoma cell death through inhibition of an EGFR/AKT/SREBP-1/LDLR-dependent pathway. *Cancer Discov*, 1, 442-56.
- GWINN, D. M., SHACKELFORD, D. B., EGAN, D. F., MIHAYLOVA, M. M., MERY, A., VASQUEZ, D. S., TURK, B. E. & SHAW, R. J. 2008. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*, 30, 214-26.
- HAGIWARA, A., CORNU, M., CYBULSKI, N., POLAK, P., BETZ, C., TRAPANI, F., TERRACCIANO, L., HEIM, M. H., RUEGG, M. A. & HALL, M. N. 2012. Hepatic mTORC2 activates glycolysis and lipogenesis through Akt, glucokinase, and SREBP1c. *Cell Metab*, 15, 725-38.
- HAMADA, S., KIM, T. D., SUZUKI, T., ITOH, Y., TSUMOTO, H., NAKAGAWA, H., JANKNECHT, R. & MIYATA, N. 2009. Synthesis and activity of N-oxalylglycine and its derivatives as Jumonji C-domain-containing histone lysine demethylase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 19, 2852-5.
- HAMADA, S., SUZUKI, T., MINO, K., KOSEKI, K., OEHME, F., FLAMME, I., OZASA, H., ITOH, Y., OGASAWARA, D., KOMAARASHI, H., KATO, A., TSUMOTO, H., NAKAGAWA, H., HASEGAWA, M., SASAKI, R., MIZUKAMI, T. & MIYATA, N. 2010. Design, synthesis, enzyme-inhibitory activity, and effect on human cancer cells of a novel series of jumonji domain-containing protein 2 histone demethylase inhibitors. *J Med Chem*, 53, 5629-38.
- HAN, J. M., JEONG, S. J., PARK, M. C., KIM, G., KWON, N. H., KIM, H. K., HA, S. H., RYU, S. H. & KIM, S. 2012. Leucyl-tRNA synthetase is an intracellular leucine sensor for the mTORC1-signaling pathway. *Cell*, 149, 410-24.
- HANAHAHAN, D. & WEINBERG, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- HANAHAHAN, D. & WEINBERG, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- HANDE, K. R. 1998. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur J Cancer*, 34, 1514-21.

- HARA, K., MARUKI, Y., LONG, X., YOSHINO, K., OSHIRO, N., HIDAYAT, S., TOKUNAGA, C., AVRUCH, J. & YONEZAWA, K. 2002. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell*, 110, 177-89.
- HARA, K., YONEZAWA, K., WENG, Q. P., KOZLOWSKI, M. T., BELHAM, C. & AVRUCH, J. 1998. Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *J Biol Chem*, 273, 14484-94.
- HART, M., CONCORDET, J. P., LASSOT, I., ALBERT, I., DEL LOS SANTOS, R., DURAND, H., PERRET, C., RUBINFELD, B., MARGOTTIN, F., BENAROUS, R. & POLAKIS, P. 1999. The F-box protein beta-TrCP associates with phosphorylated beta-catenin and regulates its activity in the cell. *Curr Biol*, 9, 207-10.
- HARTMANN, C., MEYER, J., BALSS, J., CAPPER, D., MUELLER, W., CHRISTIANS, A., FELSBURG, J., WOLTER, M., MAWRIN, C., WICK, W., WELLER, M., HEROLD-MENDE, C., UNTERBERG, A., JEUKEN, J. W., WESSELING, P., REIFENBERGER, G. & VON DEIMLING, A. 2009. Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathol*, 118, 469-74.
- HAWLEY, S. A., DAVISON, M., WOODS, A., DAVIES, S. P., BERI, R. K., CARLING, D. & HARDIE, D. G. 1996. Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 271, 27879-87.
- HE, Y. F., LI, B. Z., LI, Z., LIU, P., WANG, Y., TANG, Q., DING, J., JIA, Y., CHEN, Z., LI, L., SUN, Y., LI, X., DAI, Q., SONG, C. X., ZHANG, K., HE, C. & XU, G. L. 2011. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science*, 333, 1303-7.
- HEITMAN, J., MOVVA, N. R. & HALL, M. N. 1991. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science*, 253, 905-9.
- HENDERSON, N. S. 1968. Intracellular location and genetic control of isozymes of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase and malate dehydrogenase. *Ann N Y Acad Sci*, 151, 429-40.
- HOLMGREN, A. & LU, J. 2010. Thioredoxin and thioredoxin reductase: current research with special reference to human disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 396, 120-4.
- HOLZ, M. K., BALLIF, B. A., GYGI, S. P. & BLENIS, J. 2005. mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell*, 123, 569-80.
- HOSOKAWA, N., HARA, T., KAIZUKA, T., KISHI, C., TAKAMURA, A., MIURA, Y., IEMURA, S., NATSUME, T., TAKEHANA, K., YAMADA, N., GUAN, J. L., OSHIRO, N. & MIZUSHIMA, N. 2009a. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell*, 20, 1981-91.
- HOSOKAWA, N., SASAKI, T., IEMURA, S., NATSUME, T., HARA, T. & MIZUSHIMA, N. 2009b. Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13. *Autophagy*, 5, 973-9.
- HSIEH, A. C., LIU, Y., EDLIND, M. P., INGOLIA, N. T., JANES, M. R., SHER, A., SHI, E. Y., STUMPF, C. R., CHRISTENSEN, C., BONHAM, M. J., WANG, S., REN, P., MARTIN, M., JESSEN, K., FELDMAN, M. E., WEISSMAN, J. S., SHOKAT, K. M.,

- ROMMEL, C. & RUGGERO, D. 2012. The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis. *Nature*, 485, 55-61.
- HSU, W., ZENG, L. & COSTANTINI, F. 1999. Identification of a domain of Axin that binds to the serine/threonine protein phosphatase 2A and a self-binding domain. *J Biol Chem*, 274, 3439-45.
- HU, M. C., LEE, D. F., XIA, W., GOLFMAN, L. S., OU-YANG, F., YANG, J. Y., ZOU, Y., BAO, S., HANADA, N., SASO, H., KOBAYASHI, R. & HUNG, M. C. 2004. I κ B kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. *Cell*, 117, 225-37.
- HUANG, J., DIBBLE, C. C., MATSUZAKI, M. & MANNING, B. D. 2008. The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2. *Mol Cell Biol*, 28, 4104-15.
- HUANG, L. E., GU, J., SCHAU, M. & BUNN, H. F. 1998. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 7987-92.
- HUANG, Y., FANG, J., BEDFORD, M. T., ZHANG, Y. & XU, R. M. 2006. Recognition of histone H3 lysine-4 methylation by the double tudor domain of JMJD2A. *Science*, 312, 748-51.
- IKEDA, S., KISHIDA, S., YAMAMOTO, H., MURAI, H., KOYAMA, S. & KIKUCHI, A. 1998. Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3 β and β -catenin and promotes GSK-3 β -dependent phosphorylation of β -catenin. *Embo j*, 17, 1371-84.
- INOKI, K., LI, Y., XU, T. & GUAN, K. L. 2003a. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev*, 17, 1829-34.
- INOKI, K., LI, Y., ZHU, T., WU, J. & GUAN, K. L. 2002. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol*, 4, 648-57.
- INOKI, K., OUYANG, H., ZHU, T., LINDVALL, C., WANG, Y., ZHANG, X., YANG, Q., BENNETT, C., HARADA, Y., STANKUNAS, K., WANG, C. Y., HE, X., MACDOUGALD, O. A., YOU, M., WILLIAMS, B. O. & GUAN, K. L. 2006. TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell*, 126, 955-68.
- INOKI, K., ZHU, T. & GUAN, K. L. 2003b. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*, 115, 577-90.
- ITO, S., D'ALESSIO, A. C., TARANOVA, O. V., HONG, K., SOWERS, L. C. & ZHANG, Y. 2010. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*, 466, 1129-33.
- ITO, S., SHEN, L., DAI, Q., WU, S. C., COLLINS, L. B., SWENBERG, J. A., HE, C. & ZHANG, Y. 2011. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science*, 333, 1300-3.
- JACINTO, E., LOEWITH, R., SCHMIDT, A., LIN, S., RUEGG, M. A., HALL, A. & HALL, M. N. 2004. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol*, 6, 1122-8.
- JENNINGS, G. T., SECHI, S., STEVENSON, P. M., TUCKEY, R. C., PARMELEE, D. & MCALISTER-HENN, L. 1994. Cytosolic NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase. Isolation of rat cDNA and study of tissue-specific and developmental expression of mRNA. *J Biol Chem*, 269, 23128-34.

- JIANG, B. H., RUE, E., WANG, G. L., ROE, R. & SEMENZA, G. L. 1996. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, 271, 17771-8.
- JIN, G., REITMAN, Z. J., DUNCAN, C. G., SPASOJEVIC, I., GOODEN, D. M., RASHEED, B. A., YANG, R., LOPEZ, G. Y., HE, Y., MCLENDON, R. E., BIGNER, D. D. & YAN, H. 2013. Disruption of wild-type IDH1 suppresses D-2-hydroxyglutarate production in IDH1-mutated gliomas. *Cancer Res*, 73, 496-501.
- JOSHI, A. A. & STRUHL, K. 2005. Eaf3 chromodomain interaction with methylated H3-K36 links histone deacetylation to Pol II elongation. *Mol Cell*, 20, 971-8.
- JULIEN, L. A., CARRIERE, A., MOREAU, J. & ROUX, P. P. 2010. mTORC1-activated S6K1 phosphorylates Rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling. *Mol Cell Biol*, 30, 908-21.
- JUNG, C. H., JUN, C. B., RO, S. H., KIM, Y. M., OTTO, N. M., CAO, J., KUNDU, M. & KIM, D. H. 2009. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell*, 20, 1992-2003.
- KANDOTH, C., MCLELLAN, M. D., VANDIN, F., YE, K., NIU, B., LU, C., XIE, M., ZHANG, Q., MCMICHAEL, J. F., WYCZALKOWSKI, M. A., LEISERSON, M. D., MILLER, C. A., WELCH, J. S., WALTER, M. J., WENDL, M. C., LEY, T. J., WILSON, R. K., RAPHAEL, B. J. & DING, L. 2013. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*, 502, 333-9.
- KANG, M. R., KIM, M. S., OH, J. E., KIM, Y. R., SONG, S. Y., SEO, S. I., LEE, J. Y., YOO, N. J. & LEE, S. H. 2009. Mutational analysis of IDH1 codon 132 in glioblastomas and other common cancers. *Int J Cancer*, 125, 353-5.
- KANNAN, K., KAMINSKI, N., REHAVI, G., JAKOB-HIRSCH, J., AMARIGLIO, N. & GIVOL, D. 2001. DNA microarray analysis of genes involved in p53 mediated apoptosis: activation of Apaf-1. *Oncogene*, 20, 3449-55.
- KANTIDAKIS, T., RAMSBOTTOM, B. A., BIRCH, J. L., DOWDING, S. N. & WHITE, R. J. 2010. mTOR associates with TFIIC, is found at tRNA and 5S rRNA genes, and targets their repressor Maf1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 11823-8.
- KARANTZA-WADSWORTH, V., PATEL, S., KRAVCHUK, O., CHEN, G., MATHEW, R., JIN, S. & WHITE, E. 2007. Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes Dev*, 21, 1621-35.
- KATAOKA, N., YONG, J., KIM, V. N., VELAZQUEZ, F., PERKINSON, R. A., WANG, F. & DREYFUSS, G. 2000. Pre-mRNA splicing imprints mRNA in the nucleus with a novel RNA-binding protein that persists in the cytoplasm. *Mol Cell*, 6, 673-82.
- KATIYAR, S., LIU, E., KNUTZEN, C. A., LANG, E. S., LOMBARDO, C. R., SANKAR, S., TOTH, J. I., PETROSKI, M. D., RONAI, Z. & CHIANG, G. G. 2009. REDD1, an inhibitor of mTOR signalling, is regulated by the CUL4A-DDB1 ubiquitin ligase. *EMBO Rep*, 10, 866-72.
- KATOH, M. & KATOH, M. 2004. Identification and characterization of JMJD2 family genes in silico. *Int J Oncol*, 24, 1623-8.
- KEOGH, M. C., KURDISTANI, S. K., MORRIS, S. A., AHN, S. H., PODOLNY, V., COLLINS, S. R., SCHULDINER, M., CHIN, K., PUNNA, T., THOMPSON, N. J., BOONE, C., EMILI, A., WEISSMAN, J. S., HUGHES, T. R., STRAHL, B. D., GRUNSTEIN, M., GREENBLATT, J. F., BURATOWSKI, S. & KROGAN, N. J.

2005. Cotranscriptional set2 methylation of histone H3 lysine 36 recruits a repressive Rpd3 complex. *Cell*, 123, 593-605.
- KIARIS, H. & SPANDIDOS, D. 1995. Mutations of ras genes in human tumors (review). *Int J Oncol*, 7, 413-21.
- KIM, D. H., SARBASSOV, D. D., ALI, S. M., KING, J. E., LATEK, R. R., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P. & SABATINI, D. M. 2002. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*, 110, 163-75.
- KIM, D. H., SARBASSOV, D. D., ALI, S. M., LATEK, R. R., GUNTUR, K. V., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P. & SABATINI, D. M. 2003. GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol Cell*, 11, 895-904.
- KIM, E., GORAKSHA-HICKS, P., LI, L., NEUFELD, T. P. & GUAN, K. L. 2008. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat Cell Biol*, 10, 935-45.
- KIM, H., CHOI, J. D., KIM, B. G., KANG, H. C. & LEE, J. S. 2015. Interactome Analysis Reveals that Heterochromatin Protein 1gamma (HP1gamma) is Associated with the DNA Damage Response Pathway. *Cancer Res Treat*.
- KIM, J., DANIEL, J., ESPEJO, A., LAKE, A., KRISHNA, M., XIA, L., ZHANG, Y. & BEDFORD, M. T. 2006. Tudor, MBT and chromo domains gauge the degree of lysine methylation. *EMBO Rep*, 7, 397-403.
- KIM, J. & GUAN, K. L. 2011. Regulation of the autophagy initiating kinase ULK1 by nutrients: roles of mTORC1 and AMPK. *Cell Cycle*, 10, 1337-8.
- KIM, J., KUNDU, M., VIOLLET, B. & GUAN, K. L. 2011. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*, 13, 132-41.
- KIM, J. E. & CHEN, J. 2000. Cytoplasmic-nuclear shuttling of FKBP12-rapamycin-associated protein is involved in rapamycin-sensitive signaling and translation initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 14340-5.
- KIM, T. D., FUCHS, J. R., SCHWARTZ, E., ABDELHAMID, D., ETTER, J., BERRY, W. L., LI, C., IHNAT, M. A., LI, P. K. & JANKNECHT, R. 2014. Pro-growth role of the JMJD2C histone demethylase in HCT-116 colon cancer cells and identification of curcuminoids as JMJD2 inhibitors. *Am J Transl Res*, 6, 236-47.
- KIM, V. N., YONG, J., KATAOKA, N., ABEL, L., DIEM, M. D. & DREYFUSS, G. 2001. The Y14 protein communicates to the cytoplasm the position of exon-exon junctions. *Embo j*, 20, 2062-8.
- KING, O. N., LI, X. S., SAKURAI, M., KAWAMURA, A., ROSE, N. R., NG, S. S., QUINN, A. M., RAI, G., MOTT, B. T., BESWICK, P., KLOSE, R. J., OPPERMAN, U., JADHAV, A., HEIGHTMAN, T. D., MALONEY, D. J., SCHOFIELD, C. J. & SIMEONOV, A. 2010. Quantitative high-throughput screening identifies 8-hydroxyquinolines as cell-active histone demethylase inhibitors. *PLoS One*, 5, e15535.
- KIPP, B. R., VOSS, J. S., KERR, S. E., BARR FRITCHER, E. G., GRAHAM, R. P., ZHANG, L., HIGHSMITH, W. E., ZHANG, J., ROBERTS, L. R., GORES, G. J. & HALLING, K. C. 2012. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cholangiocarcinoma. *Hum Pathol*, 43, 1552-8.
- KITAGAWA, M., HATAKEYAMA, S., SHIRANE, M., MATSUMOTO, M., ISHIDA, N., HATTORI, K., NAKAMICHI, I., KIKUCHI, A., NAKAYAMA, K. & NAKAYAMA,

- K. 1999. An F-box protein, FWD1, mediates ubiquitin-dependent proteolysis of beta-catenin. *Embo j*, 18, 2401-10.
- KLOSE, R. J., YAMANE, K., BAE, Y., ZHANG, D., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P., WONG, J. & ZHANG, Y. 2006. The transcriptional repressor JHDM3A demethylates trimethyl histone H3 lysine 9 and lysine 36. *Nature*, 442, 312-6.
- KOEHLER, A. & VAN NOORDEN, C. J. 2003. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate and the higher incidence of pollution-induced liver cancer in female flounder. *Environ Toxicol Chem*, 22, 2703-10.
- KOIVUNEN, P., LEE, S., DUNCAN, C. G., LOPEZ, G., LU, G., RAMKISSOON, S., LOSMAN, J. A., JOENSUU, P., BERGMANN, U., GROSS, S., TRAVINS, J., WEISS, S., LOOPER, R., LIGON, K. L., VERHAAK, R. G., YAN, H. & KAELIN, W. G., JR. 2012. Transformation by the (R)-enantiomer of 2-hydroxyglutarate linked to EGLN activation. *Nature*, 483, 484-8.
- KOOISTRA, S. M. & HELIN, K. 2012. Molecular mechanisms and potential functions of histone demethylases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13, 297-311.
- KOREN, R., BEN MEIR, D., LANGZAM, L., DEKEL, Y., KONICHEZKY, M., BANIEL, J., LIVNE, P. M., GAL, R. & SAMPSON, S. R. 2004. Expression of protein kinase C isoenzymes in benign hyperplasia and carcinoma of prostate. *Oncol Rep*, 11, 321-6.
- KOREN, R., LANGZAM, L., PAZ, A., LIVNE, P. M., GAL, R. & SAMPSON, S. R. 2000. Protein kinase C (PKC) isoenzymes immunohistochemistry in lymph node revealing solution-fixed, paraffin-embedded bladder tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 8, 166-71.
- KORTLEVER, R. M., HIGGINS, P. J. & BERNARDS, R. 2006. Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nat Cell Biol*, 8, 877-84.
- KOVACINA, K. S., PARK, G. Y., BAE, S. S., GUZZETTA, A. W., SCHAEFER, E., BIRNBAUM, M. J. & ROTH, R. A. 2003. Identification of a proline-rich Akt substrate as a 14-3-3 binding partner. *J Biol Chem*, 278, 10189-94.
- KOZMA, S. C., FERRARI, S., BASSAND, P., SIEGMANN, M., TOTTY, N. & THOMAS, G. 1990. Cloning of the mitogen-activated S6 kinase from rat liver reveals an enzyme of the second messenger subfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 7365-9.
- KRIEG, J., HOFSTEENGE, J. & THOMAS, G. 1988. Identification of the 40 S ribosomal protein S6 phosphorylation sites induced by cycloheximide. *J Biol Chem*, 263, 11473-7.
- KULAWIEC, M., OWENS, K. M. & SINGH, K. K. 2009. Cancer cell mitochondria confer apoptosis resistance and promote metastasis. *Cancer Biol Ther*, 8, 1378-85.
- KYRIAKIS, J. M., APP, H., ZHANG, X. F., BANERJEE, P., BRAUTIGAN, D. L., RAPP, U. R. & AVRUCH, J. 1992. Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature*, 358, 417-21.
- LACHNER, M., O'CARROLL, D., REA, S., MECHTLER, K. & JENUWEIN, T. 2001. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*, 410, 116-20.
- LANGZAM, L., KOREN, R., GAL, R., KUGEL, V., PAZ, A., FARKAS, A. & SAMPSON, S. R. 2001. Patterns of protein kinase C isoenzyme expression in transitional cell carcinoma of bladder. Relation to degree of malignancy. *Am J Clin Pathol*, 116, 377-85.

- LAPLANTE, M. & SABATINI, D. M. 2012. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149, 274-93.
- LATRES, E., CHIAUR, D. S. & PAGANO, M. 1999. The human F box protein beta-Trcp associates with the Cull1/Skp1 complex and regulates the stability of beta-catenin. *Oncogene*, 18, 849-54.
- LE HIR, H., IZAURRALDE, E., MAQUAT, L. E. & MOORE, M. J. 2000. The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *Embo j*, 19, 6860-9.
- LEE, J., THOMPSON, J. R., BOTUYAN, M. V. & MER, G. 2008. Distinct binding modes specify the recognition of methylated histones H3K4 and H4K20 by JMJD2A-tudor. *Nat Struct Mol Biol*, 15, 109-11.
- LEE, J. H., KOH, H., KIM, M., KIM, Y., LEE, S. Y., KARESS, R. E., LEE, S. H., SHONG, M., KIM, J. M., KIM, J. & CHUNG, J. 2007. Energy-dependent regulation of cell structure by AMP-activated protein kinase. *Nature*, 447, 1017-20.
- LEE, J. W., CHOI, J. J., LEE, K. M., CHOI, C. H., KIM, T. J., LEE, J. H., KIM, B. G., AHN, G., SONG, S. Y. & BAE, D. S. 2005. eIF-4E expression is associated with histopathologic grades in cervical neoplasia. *Hum Pathol*, 36, 1197-203.
- LEMPIAINEN, H. & HALAZONETIS, T. D. 2009. Emerging common themes in regulation of PIKKs and PI3Ks. *Embo j*, 28, 3067-73.
- LI, B. D., GRUNER, J. S., ABREO, F., JOHNSON, L. W., YU, H., NAWAS, S., MCDONALD, J. C. & DEBENEDETTI, A. 2002. Prospective study of eukaryotic initiation factor 4E protein elevation and breast cancer outcome. *Ann Surg*, 235, 732-8; discussion 738-9.
- LIU, P., GAN, W., INUZUKA, H., LAZORCHAK, A. S., GAO, D., AROJO, O., LIU, D., WAN, L., ZHAI, B., YU, Y., YUAN, M., KIM, B. M., SHAIK, S., MENON, S., GYGI, S. P., LEE, T. H., ASARA, J. M., MANNING, B. D., BLENIS, J., SU, B. & WEI, W. 2013. Sin1 phosphorylation impairs mTORC2 complex integrity and inhibits downstream Akt signalling to suppress tumorigenesis. *Nat Cell Biol*, 15, 1340-50.
- LONG, X., LIN, Y., ORTIZ-VEGA, S., YONEZAWA, K. & AVRUCH, J. 2005. Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Curr Biol*, 15, 702-13.
- 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., WELLEN, K. E., O'ROURKE, D. M., BERGER, S. L., CHAN, T. A., LEVINE, R. L., MELLINGHOFF, I. K. & THOMPSON, C. B. 2012. IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature*, 483, 474-8.
- LUO, X., LIU, Y., KUBICEK, S., MYLLYHARJU, J., TUMBER, A., NG, S., CHE, K. H., PODOLL, J., HEIGHTMAN, T. D., OPPERMAN, U., SCHREIBER, S. L. & WANG, X. 2011. A selective inhibitor and probe of the cellular functions of Jumonji C domain-containing histone demethylases. *J Am Chem Soc*, 133, 9451-6.
- MA, L., CHEN, Z., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P. & PANDOLFI, P. P. 2005. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell*, 121, 179-93.
- MA, S., JIANG, B., DENG, W., GU, Z. K., WU, F. Z., LI, T., XIA, Y., YANG, H., YE, D., XIONG, Y. & GUAN, K. L. 2015. D-2-hydroxyglutarate is essential for maintaining oncogenic property of mutant IDH-containing cancer cells but dispensable for cell growth. *Oncotarget*, 6, 8606-20.

- MA, X. M., YOON, S. O., RICHARDSON, C. J., JULICH, K. & BLENIS, J. 2008. SKAR links pre-mRNA splicing to mTOR/S6K1-mediated enhanced translation efficiency of spliced mRNAs. *Cell*, 133, 303-13.
- MAEHAMA, T. & DIXON, J. E. 1998. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem*, 273, 13375-8.
- MALLETTE, F. A., GAUMONT-LECLERC, M. F. & FERBEYRE, G. 2007. The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes Dev*, 21, 43-8.
- MALLETTE, F. A., MATTIROLI, F., CUI, G., YOUNG, L. C., HENDZEL, M. J., MER, G., SIXMA, T. K. & RICHARD, S. 2012. RNF8- and RNF168-dependent degradation of KDM4A/JMJD2A triggers 53BP1 recruitment to DNA damage sites. *Embo j*, 31, 1865-78.
- MALLETTE, F. A. & RICHARD, S. 2012. JMJD2A promotes cellular transformation by blocking cellular senescence through transcriptional repression of the tumor suppressor CHD5. *Cell Rep*, 2, 1233-43.
- MARCUCCI, G., MAHARRY, K., WU, Y. Z., RADMACHER, M. D., MROZEK, K., MARGESON, D., HOLLAND, K. B., WHITMAN, S. P., BECKER, H., SCHWIND, S., METZELER, K. H., POWELL, B. L., CARTER, T. H., KOLITZ, J. E., WETZLER, M., CARROLL, A. J., BAER, M. R., CALIGIURI, M. A., LARSON, R. A. & BLOOMFIELD, C. D. 2010. IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol*, 28, 2348-55.
- MARDIS, E. R., DING, L., DOOLING, D. J., LARSON, D. E., MCLELLAN, M. D., CHEN, K., KOBOLDT, D. C., FULTON, R. S., DELEHAUNTY, K. D., MCGRATH, S. D., FULTON, L. A., LOCKE, D. P., MAGRINI, V. J., ABBOTT, R. M., VICKERY, T. L., REED, J. S., ROBINSON, J. S., WYLIE, T., SMITH, S. M., CARMICHAEL, L., ELDRID, J. M., HARRIS, C. C., WALKER, J., PECK, J. B., DU, F., DUKES, A. F., SANDERSON, G. E., BRUMMETT, A. M., CLARK, E., MCMICHAEL, J. F., MEYER, R. J., SCHINDLER, J. K., POHL, C. S., WALLIS, J. W., SHI, X., LIN, L., SCHMIDT, H., TANG, Y., HAIPEK, C., WIECHERT, M. E., IVY, J. V., KALICKI, J., ELLIOTT, G., RIES, R. E., PAYTON, J. E., WESTERVELT, P., TOMASSON, M. H., WATSON, M. A., BATY, J., HEATH, S., SHANNON, W. D., NAGARAJAN, R., LINK, D. C., WALTER, M. J., GRAUBERT, T. A., DIPERSIO, J. F., WILSON, R. K. & LEY, T. J. 2009. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med*, 361, 1058-66.
- MARGOLIS, B. & SKOLNIK, E. Y. 1994. Activation of Ras by receptor tyrosine kinases. *J Am Soc Nephrol*, 5, 1288-99.
- MARKS, P. A. & BRESLOW, R. 2007. Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug. *Nat Biotechnol*, 25, 84-90.
- MARTINA, J. A., CHEN, Y., GUCEK, M. & PUERTOLLANO, R. 2012. MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB. *Autophagy*, 8, 903-14.
- MARTINA, J. A. & PUERTOLLANO, R. 2013. Rag GTPases mediate amino acid-dependent recruitment of TFEB and MITF to lysosomes. *J Cell Biol*, 200, 475-91.

- MASRI, J., BERNATH, A., MARTIN, J., JO, O. D., VARTANIAN, R., FUNK, A. & GERA, J. 2007. mTORC2 activity is elevated in gliomas and promotes growth and cell motility via overexpression of rictor. *Cancer Res*, 67, 11712-20.
- MATHEW, R., KONGARA, S., BEAUDOIN, B., KARP, C. M., BRAY, K., DEGENHARDT, K., CHEN, G., JIN, S. & WHITE, E. 2007. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev*, 21, 1367-81.
- MATTHEWS-GREER, J., CALDITO, G., DE BENEDETTI, A., HERRERA, G. A., DOMINGUEZ-MALAGON, H., CHANONA-VILCHIS, J. & TURBAT-HERRERA, E. A. 2005. eIF4E as a marker for cervical neoplasia. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 13, 367-70.
- MEISTER, A. 1983. Selective modification of glutathione metabolism. *Science*, 220, 472-7.
- MENON, S. & MANNING, B. D. 2008. Common corruption of the mTOR signaling network in human tumors. *Oncogene*, 27 Suppl 2, S43-51.
- MERCER, C. A., KALIAPPAN, A. & DENNIS, P. B. 2009. A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. *Autophagy*, 5, 649-62.
- MIROUSE, V., SWICK, L. L., KAZGAN, N., ST JOHNSTON, D. & BRENMAN, J. E. 2007. LKB1 and AMPK maintain epithelial cell polarity under energetic stress. *J Cell Biol*, 177, 387-92.
- MIYASHITA, T., KRAJEWSKI, S., KRAJEWSKA, M., WANG, H. G., LIN, H. K., LIEBERMANN, D. A., HOFFMAN, B. & REED, J. C. 1994. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*, 9, 1799-805.
- MONDESIRE, W. H., JIAN, W., ZHANG, H., ENSOR, J., HUNG, M. C., MILLS, G. B. & MERIC-BERNSTAM, F. 2004. Targeting mammalian target of rapamycin synergistically enhances chemotherapy-induced cytotoxicity in breast cancer cells. *Clin Cancer Res*, 10, 7031-42.
- MOODIE, S. A., WILLUMSEN, B. M., WEBER, M. J. & WOLFMAN, A. 1993. Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. *Science*, 260, 1658-61.
- MORONI, M. C., HICKMAN, E. S., LAZZERINI DENCHI, E., CAPRARA, G., COLLI, E., CECCONI, F., MULLER, H. & HELIN, K. 2001. Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. *Nat Cell Biol*, 3, 552-8.
- MUNTAU, A. C., ROSCHINGER, W., MERKENSCHLAGER, A., VAN DER KNAAP, M. S., JAKOBS, C., DURAN, M., HOFFMANN, G. F. & ROSCHER, A. A. 2000. Combined D-2- and L-2-hydroxyglutaric aciduria with neonatal onset encephalopathy: a third biochemical variant of 2-hydroxyglutaric aciduria? *Neuropediatrics*, 31, 137-40.
- MUTHUKKUMAR, S., RAMESH, T. M. & BONDADA, S. 1995. Rapamycin, a potent immunosuppressive drug, causes programmed cell death in B lymphoma cells. *Transplantation*, 60, 264-70.
- NAKANO, K. & VOUSDEN, K. H. 2001. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell*, 7, 683-94.
- NAKAYAMA, J., RICE, J. C., STRAHL, B. D., ALLIS, C. D. & GREWAL, S. I. 2001. Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science*, 292, 110-3.

- NATHAN, C. O., CARTER, P., LIU, L., LI, B. D., ABREO, F., TUDOR, A., ZIMMER, S. G. & DE BENEDETTI, A. 1997a. Elevated expression of eIF4E and FGF-2 isoforms during vascularization of breast carcinomas. *Oncogene*, 15, 1087-94.
- NATHAN, C. O., LIU, L., LI, B. D., ABREO, F. W., NANDY, I. & DE BENEDETTI, A. 1997b. Detection of the proto-oncogene eIF4E in surgical margins may predict recurrence in head and neck cancer. *Oncogene*, 15, 579-84.
- NG, T., SHIMA, D., SQUIRE, A., BASTIAENS, P. I., GSCHMEISSNER, S., HUMPHRIES, M. J. & PARKER, P. J. 1999. PKC α regulates beta1 integrin-dependent cell motility through association and control of integrin traffic. *Embo j*, 18, 3909-23.
- NICKLIN, P., BERGMAN, P., ZHANG, B., TRIANTAFELLOW, E., WANG, H., NYFELER, B., YANG, H., HILD, M., KUNG, C., WILSON, C., MYER, V. E., MACKEIGAN, J. P., PORTER, J. A., WANG, Y. K., CANTLEY, L. C., FINAN, P. M. & MURPHY, L. O. 2009. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell*, 136, 521-34.
- NIELSEN, A. L., KRISTENSEN, L. H., STEPHANSEN, K. B., KRISTENSEN, J. B., HELGSTRAND, C., LEES, M., CLOOS, P., HELIN, K., GAJHEDE, M. & OLSEN, L. 2012. Identification of catechols as histone-lysine demethylase inhibitors. *FEBS Lett*, 586, 1190-4.
- NIELSEN, A. L., OULAD-ABDELGHANI, M., ORTIZ, J. A., REMBOUTSIKA, E., CHAMBON, P. & LOSSON, R. 2001. Heterochromatin formation in mammalian cells: interaction between histones and HP1 proteins. *Mol Cell*, 7, 729-39.
- NIELSEN, P. R., NIETLISPACH, D., MOTT, H. R., CALLAGHAN, J., BANNISTER, A., KOUZARIDES, T., MURZIN, A. G., MURZINA, N. V. & LAUE, E. D. 2002. Structure of the HP1 chromodomain bound to histone H3 methylated at lysine 9. *Nature*, 416, 103-7.
- NOH, W. C., KIM, Y. H., KIM, M. S., KOH, J. S., KIM, H. A., MOON, N. M. & PAIK, N. S. 2008. Activation of the mTOR signaling pathway in breast cancer and its correlation with the clinicopathologic variables. *Breast Cancer Res Treat*, 110, 477-83.
- ODA, E., OHKI, R., MURASAWA, H., NEMOTO, J., SHIBUE, T., YAMASHITA, T., TOKINO, T., TANIGUCHI, T. & TANAKA, N. 2000. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*, 288, 1053-8.
- OGAWA, T., TOKUDA, M., TOMIZAWA, K., MATSUI, H., ITANO, T., KONISHI, R., NAGAHATA, S. & HATASE, O. 1998. Osteoblastic differentiation is enhanced by rapamycin in rat osteoblast-like osteosarcoma (ROS 17/2.8) cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 249, 226-30.
- OHGAKI, H. 2009. Epidemiology of brain tumors. *Methods Mol Biol*, 472, 323-42.
- OHGAKI, H., DESSEN, P., JOURDE, B., HORSTMANN, S., NISHIKAWA, T., DI PATRE, P. L., BURKHARD, C., SCHULER, D., PROBST-HENSCH, N. M., MAIORKA, P. C., BAEZA, N., PISANI, P., YONEKAWA, Y., YASARGIL, M. G., LUTOLF, U. M. & KLEIHUES, P. 2004. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res*, 64, 6892-9.
- OHGAKI, H. & KLEIHUES, P. 2011. Genetic profile of astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Brain Tumor Pathol*, 28, 177-83.
- OIZEL, K., GRATAS, C., NADARADJANE, A., OLIVER, L., VALLETTE, F. M. & PECQUEUR, C. 2015. D-2-Hydroxyglutarate does not mimic all the IDH mutation

- effects, in particular the reduced etoposide-triggered apoptosis mediated by an alteration in mitochondrial NADH. *Cell Death Dis*, 6, e1704.
- OKANO, M., XIE, S. & LI, E. 1998. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet*, 19, 219-20.
- PANG, H. & FABER, L. E. 2001. Estrogen and rapamycin effects on cell cycle progression in T47D breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, 70, 21-6.
- PANSURIYA, T. C., VAN EIJK, R., D'ADAMO, P., VAN RULER, M. A., KUIJER, M. L., OOSTING, J., CLETON-JANSEN, A. M., VAN OOSTERWIJK, J. G., VERBEKE, S. L., MEIJER, D., VAN WEZEL, T., NORD, K. H., SANGIORGI, L., TOKER, B., LIEGL-ATZWANGER, B., SAN-JULIAN, M., SCIOT, R., LIMAYE, N., KINDBLOM, L. G., DAUGAARD, S., GODFRAIND, C., BOON, L. M., VIKKULA, M., KUREK, K. C., SZUHAI, K., FRENCH, P. J. & BOVEE, J. V. 2011. Somatic mosaic IDH1 and IDH2 mutations are associated with enchondroma and spindle cell hemangioma in Ollier disease and Maffucci syndrome. *Nat Genet*, 43, 1256-61.
- PARADA, L. F., TABIN, C. J., SHIH, C. & WEINBERG, R. A. 1982. Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature*, 297, 474-8.
- PARK, S., GUO, J., KIM, D. & CHENG, J. Q. 2009. Identification of 24p3 as a direct target of Foxo3a regulated by interleukin-3 through the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *J Biol Chem*, 284, 2187-93.
- PARSONS, D. W., JONES, S., ZHANG, X., LIN, J. C., LEARY, R. J., ANGENENDT, P., MANKOO, P., CARTER, H., SIU, I. M., GALLIA, G. L., OLIVI, A., MCLENDON, R., RASHEED, B. A., KEIR, S., NIKOLSKAYA, T., NIKOLSKY, Y., BUSAM, D. A., TEKLEAB, H., DIAZ, L. A., JR., HARTIGAN, J., SMITH, D. R., STRAUSBERG, R. L., MARIE, S. K., SHINJO, S. M., YAN, H., RIGGINS, G. J., BIGNER, D. D., KARCHIN, R., PAPADOPOULOS, N., PARMIGIANI, G., VOGELSTEIN, B., VELCULESCU, V. E. & KINZLER, K. W. 2008. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*, 321, 1807-12.
- PASCHKA, P., SCHLENK, R. F., GAIDZIK, V. I., HABDANK, M., KRONKE, J., BULLINGER, L., SPATH, D., KAYSER, S., ZUCKNICK, M., GOTZE, K., HORST, H. A., GERMING, U., DOHNER, H. & DOHNER, K. 2010. IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication. *J Clin Oncol*, 28, 3636-43.
- PATEL, M. S. & KOROTCHKINA, L. G. 2006. Regulation of the pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem Soc Trans*, 34, 217-22.
- PAUSE, A., BELSHAM, G. J., GINGRAS, A. C., DONZE, O., LIN, T. A., LAWRENCE, J. C., JR. & SONENBERG, N. 1994. Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature*, 371, 762-7.
- PEARCE, L. R., HUANG, X., BOUDEAU, J., PAWLOWSKI, R., WULLSCHLEGER, S., DEAK, M., IBRAHIM, A. F., GOURLAY, R., MAGNUSON, M. A. & ALESSI, D. R. 2007. Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2. *Biochem J*, 405, 513-22.
- PEARSON, R. B., DENNIS, P. B., HAN, J. W., WILLIAMSON, N. A., KOZMA, S. C., WETTENHALL, R. E. & THOMAS, G. 1995. The principal target of rapamycin-

- induced p70s6k inactivation is a novel phosphorylation site within a conserved hydrophobic domain. *Embo j*, 14, 5279-87.
- PETERSON, R. T., BEAL, P. A., COMB, M. J. & SCHREIBER, S. L. 2000. FKBP12-rapamycin-associated protein (FRAP) autophosphorylates at serine 2481 under translationally repressive conditions. *J Biol Chem*, 275, 7416-23.
- PETERSON, T. R., LAPLANTE, M., THOREEN, C. C., SANCAK, Y., KANG, S. A., KUEHL, W. M., GRAY, N. S. & SABATINI, D. M. 2009. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell*, 137, 873-86.
- PETERSON, T. R., SENGUPTA, S. S., HARRIS, T. E., CARMACK, A. E., KANG, S. A., BALDERAS, E., GUERTIN, D. A., MADDEN, K. L., CARPENTER, A. E., FINCK, B. N. & SABATINI, D. M. 2011. mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell*, 146, 408-20.
- PETTERSSON, F., YAU, C., DOBOCAN, M. C., CULJKOVIC-KRALJACIC, B., RETROUVEY, H., PUCKETT, R., FLORES, L. M., KROP, I. E., ROUSSEAU, C., COCOLAKIS, E., BORDEN, K. L., BENZ, C. C. & MILLER, W. H., JR. 2011. Ribavirin treatment effects on breast cancers overexpressing eIF4E, a biomarker with prognostic specificity for luminal B-type breast cancer. *Clin Cancer Res*, 17, 2874-84.
- PONNALURI, V. K., VAVILALA, D. T., PUTTY, S., GUTHEIL, W. G. & MUKHERJI, M. 2009. Identification of non-histone substrates for JMJD2A-C histone demethylases. *Biochem Biophys Res Commun*, 390, 280-4.
- POPOVICI-MULLER, J., SAUNDERS, J. O., SALITURO, F. G., TRAVINS, J. M., YAN, S., ZHAO, F., GROSS, S., DANG, L., YEN, K. E., YANG, H., STRALEY, K. S., JIN, S., KUNII, K., FANTIN, V. R., ZHANG, S., PAN, Q., SHI, D., BILLER, S. A. & SU, S. M. 2012. Discovery of the First Potent Inhibitors of Mutant IDH1 That Lower Tumor 2-HG in Vivo. *ACS Med Chem Lett*, 3, 850-5.
- POPULO, H., LOPES, J. M. & SOARES, P. 2012. The mTOR signalling pathway in human cancer. *Int J Mol Sci*, 13, 1886-918.
- PULLEN, N., DENNIS, P. B., ANDJELKOVIC, M., DUFNER, A., KOZMA, S. C., HEMMINGS, B. A. & THOMAS, G. 1998. Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1. *Science*, 279, 707-10.
- RALL, T. W. & LEHNINGER, A. L. 1952. Glutathione reductase of animal tissues. *J Biol Chem*, 194, 119-30.
- RATCLIFFE, M. J., ITOH, K. & SOKOL, S. Y. 2000. A positive role for the PP2A catalytic subunit in Wnt signal transduction. *J Biol Chem*, 275, 35680-3.
- RAUGHT, B., PEIRETTI, F., GINGRAS, A. C., LIVINGSTONE, M., SHAHBAZIAN, D., MAYEUR, G. L., POLAKIEWICZ, R. D., SONENBERG, N. & HERSHEY, J. W. 2004. Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. *Embo j*, 23, 1761-9.
- REA, S., EISENHABER, F., O'CARROLL, D., STRAHL, B. D., SUN, Z. W., SCHMID, M., OPRAVIL, S., MECHTLER, K., PONTING, C. P., ALLIS, C. D. & JENUWEIN, T. 2000. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*, 406, 593-9.
- REBSAMEN, M., POCHINI, L., STASYK, T., DE ARAUJO, M. E., GALLUCCIO, M., KANDASAMY, R. K., SNIJDER, B., FAUSTER, A., RUDASHEVSKAYA, E. L., BRUCKNER, M., SCORZONI, S., FILIPEK, P. A., HUBER, K. V., BIGENZAHN, J.

- W., HEINZ, L. X., KRAFT, C., BENNETT, K. L., INDIVERI, C., HUBER, L. A. & SUPERTI-FURGA, G. 2015. SLC38A9 is a component of the lysosomal amino acid sensing machinery that controls mTORC1. *Nature*, 519, 477-81.
- RIDLEY, A. J. & HALL, A. 1992. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, 70, 389-99.
- RIDLEY, A. J., PATERSON, H. F., JOHNSTON, C. L., DIEKMANN, D. & HALL, A. 1992. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*, 70, 401-10.
- ROACH, E. S. & SPARAGANA, S. P. 2004. Diagnosis of tuberous sclerosis complex. *J Child Neurol*, 19, 643-9.
- ROBITAILLE, A. M., CHRISTEN, S., SHIMOBAYASHI, M., CORNU, M., FAVA, L. L., MOES, S., PRESCIANNOTTO-BASCHONG, C., SAUER, U., JENOE, P. & HALL, M. N. 2013. Quantitative phosphoproteomics reveal mTORC1 activates de novo pyrimidine synthesis. *Science*, 339, 1320-3.
- ROBLES, A. I., BEMMELS, N. A., FORAKER, A. B. & HARRIS, C. C. 2001. APAF-1 is a transcriptional target of p53 in DNA damage-induced apoptosis. *Cancer Res*, 61, 6660-4.
- ROCZNIAK-FERGUSON, A., PETIT, C. S., FROEHLICH, F., QIAN, S., KY, J., ANGAROLA, B., WALTHER, T. C. & FERGUSON, S. M. 2012. The transcription factor TFEB links mTORC1 signaling to transcriptional control of lysosome homeostasis. *Sci Signal*, 5, ra42.
- ROGERS, G. W., JR., LIMA, W. F. & MERRICK, W. C. 2001a. Further characterization of the helicase activity of eIF4A. Substrate specificity. *J Biol Chem*, 276, 12598-608.
- ROGERS, G. W., JR., RICHTER, N. J., LIMA, W. F. & MERRICK, W. C. 2001b. Modulation of the helicase activity of eIF4A by eIF4B, eIF4H, and eIF4F. *J Biol Chem*, 276, 30914-22.
- ROHLE, D., POPOVICI-MULLER, J., PALASKAS, N., TURCAN, S., GROMMES, C., CAMPOS, C., TSOI, J., CLARK, O., OLDRINI, B., KOMISOPOULOU, E., KUNII, K., PEDRAZA, A., SCHALM, S., SILVERMAN, L., MILLER, A., WANG, F., YANG, H., CHEN, Y., KERNYTSKY, A., ROSENBLUM, M. K., LIU, W., BILLER, S. A., SU, S. M., BRENNAN, C. W., CHAN, T. A., GRAEBER, T. G., YEN, K. E. & MELLINGHOFF, I. K. 2013. An inhibitor of mutant IDH1 delays growth and promotes differentiation of glioma cells. *Science*, 340, 626-30.
- ROSE, N. R., NG, S. S., MECINOVIC, J., LIENARD, B. M., BELLO, S. H., SUN, Z., MCDONOUGH, M. A., OPPERMAN, U. & SCHOFIELD, C. J. 2008. Inhibitor scaffolds for 2-oxoglutarate-dependent histone lysine demethylases. *J Med Chem*, 51, 7053-6.
- ROSE, N. R., WOON, E. C., KINGHAM, G. L., KING, O. N., MECINOVIC, J., CLIFTON, I. J., NG, S. S., TALIB-HARDY, J., OPPERMAN, U., MCDONOUGH, M. A. & SCHOFIELD, C. J. 2010. Selective inhibitors of the JMJD2 histone demethylases: combined nondenaturing mass spectrometric screening and crystallographic approaches. *J Med Chem*, 53, 1810-8.
- ROSNER, M. & HENGSTSCHLAGER, M. 2008. Cytoplasmic and nuclear distribution of the protein complexes mTORC1 and mTORC2: rapamycin triggers dephosphorylation and

- delocalization of the mTORC2 components rictor and sin1. *Hum Mol Genet*, 17, 2934-48.
- ROSNER, M. & HENGSTSCHLAGER, M. 2011. mTOR protein localization is cell cycle-regulated. *Cell Cycle*, 10, 3608-10.
- ROSNER, M. & HENGSTSCHLAGER, M. 2012. Detection of cytoplasmic and nuclear functions of mTOR by fractionation. *Methods Mol Biol*, 821, 105-24.
- ROTH, J., DOBBELSTEIN, M., FREEDMAN, D. A., SHENK, T. & LEVINE, A. J. 1998. Nucleo-cytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein. *Embo j*, 17, 554-64.
- ROUX, P. P., BALLIF, B. A., ANJUM, R., GYGI, S. P. & BLENIS, J. 2004. Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 13489-94.
- RUBINFELD, B., SOUZA, B., ALBERT, I., MULLER, O., CHAMBERLAIN, S. H., MASIARZ, F. R., MUNEMITSU, S. & POLAKIS, P. 1993. Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science*, 262, 1731-4.
- RUVINSKY, I., SHARON, N., LERER, T., COHEN, H., STOLOVICH-RAIN, M., NIR, T., DOR, Y., ZISMAN, P. & MEYUHAS, O. 2005. Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes Dev*, 19, 2199-211.
- RZEM, R., VEIGA-DA-CUNHA, M., NOEL, G., GOFFETTE, S., NASSOGNE, M. C., TABARKI, B., SCHOLLER, C., MARQUARDT, T., VIKKULA, M. & VAN SCHAFTINGEN, E. 2004. A gene encoding a putative FAD-dependent L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase is mutated in L-2-hydroxyglutaric aciduria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 16849-54.
- RZEM, R., VINCENT, M. F., VAN SCHAFTINGEN, E. & VEIGA-DA-CUNHA, M. 2007. L-2-hydroxyglutaric aciduria, a defect of metabolite repair. *J Inherit Metab Dis*, 30, 681-9.
- SAITO, K., ARAKI, Y., KONTANI, K., NISHINA, H. & KATADA, T. 2005. Novel role of the small GTPase Rheb: its implication in endocytic pathway independent of the activation of mammalian target of rapamycin. *J Biochem*, 137, 423-30.
- SAKAMOTO, K., MCCARTHY, A., SMITH, D., GREEN, K. A., GRAHAME HARDIE, D., ASHWORTH, A. & ALESSI, D. R. 2005. Deficiency of LKB1 in skeletal muscle prevents AMPK activation and glucose uptake during contraction. *Embo j*, 24, 1810-20.
- SAKURAI, M., ROSE, N. R., SCHULTZ, L., QUINN, A. M., JADHAV, A., NG, S. S., OPPERMAN, U., SCHOFIELD, C. J. & SIMEONOV, A. 2010. A miniaturized screen for inhibitors of Jumonji histone demethylases. *Mol Biosyst*, 6, 357-64.
- SALCEDA, S. & CARO, J. 1997. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem*, 272, 22642-7.
- SALVEMINI, F., FRANZE, A., IERVOLINO, A., FILOSA, S., SALZANO, S. & URSINI, M. V. 1999. Enhanced glutathione levels and oxidoresistance mediated by increased glucose-6-phosphate dehydrogenase expression. *J Biol Chem*, 274, 2750-7.

- SANCAK, Y., BAR-PELED, L., ZONCU, R., MARKHARD, A. L., NADA, S. & SABATINI, D. M. 2010. Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell*, 141, 290-303.
- SANCAK, Y., PETERSON, T. R., SHAUL, Y. D., LINDQUIST, R. A., THOREEN, C. C., BAR-PELED, L. & SABATINI, D. M. 2008. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science*, 320, 1496-501.
- SANCAK, Y., THOREEN, C. C., PETERSON, T. R., LINDQUIST, R. A., KANG, S. A., SPOONER, E., CARR, S. A. & SABATINI, D. M. 2007. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell*, 25, 903-15.
- SANDERS, S. L., PORTOSO, M., MATA, J., BAHLER, J., ALLSHIRE, R. C. & KOUZARIDES, T. 2004. Methylation of histone H4 lysine 20 controls recruitment of Crb2 to sites of DNA damage. *Cell*, 119, 603-14.
- SANSON, M., MARIE, Y., PARIS, S., IDBAIH, A., LAFFAIRE, J., DUCRAY, F., EL HALLANI, S., BOISSELIER, B., MOKHTARI, K., HOANG-XUAN, K. & DELATTRE, J. Y. 2009. Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J Clin Oncol*, 27, 4150-4.
- SANTOS, E., TRONICK, S. R., AARONSON, S. A., PULCIANI, S. & BARBACID, M. 1982. T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB- and Harvey-MSV transforming genes. *Nature*, 298, 343-7.
- SARBASSOV, D. D., ALI, S. M., KIM, D. H., GUERTIN, D. A., LATEK, R. R., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P. & SABATINI, D. M. 2004. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol*, 14, 1296-302.
- SARBASSOV, D. D., ALI, S. M., SENGUPTA, S., SHEEN, J. H., HSU, P. P., BAGLEY, A. F., MARKHARD, A. L. & SABATINI, D. M. 2006. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell*, 22, 159-68.
- SARBASSOV, D. D., GUERTIN, D. A., ALI, S. M. & SABATINI, D. M. 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 307, 1098-101.
- SAX, J. K., FEL, P., MURPHY, M. E., BERNHARD, E., KORSMEYER, S. J. & EL-DEIRY, W. S. 2002. BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nat Cell Biol*, 4, 842-9.
- SCHAAP, F. G., FRENCH, P. J. & BOVEE, J. V. 2013. Mutations in the isocitrate dehydrogenase genes IDH1 and IDH2 in tumors. *Adv Anat Pathol*, 20, 32-8.
- SCHMITT, C. A. 2003. Senescence, apoptosis and therapy--cutting the lifelines of cancer. *Nat Rev Cancer*, 3, 286-95.
- SCHUMACHER, T., BUNSE, L., PUSCH, S., SAHM, F., WIESTLER, B., QUANDT, J., MENN, O., OSSWALD, M., OEZEN, I., OTT, M., KEIL, M., BALSS, J., RAUSCHENBACH, K., GRABOWSKA, A. K., VOGLER, I., DIEKMANN, J., TRAUTWEIN, N., EICHMULLER, S. B., OKUN, J., STEVANOVIC, S., RIEMER, A. B., SAHIN, U., FRIESE, M. A., BECKHOVE, P., VON DEIMLING, A., WICK, W. & PLATTEN, M. 2014. A vaccine targeting mutant IDH1 induces antitumour immunity. *Nature*, 512, 324-7.
- SCOTT, R. C., JUHASZ, G. & NEUFELD, T. P. 2007. Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. *Curr Biol*, 17, 1-11.

- SEELING, J. M., MILLER, J. R., GIL, R., MOON, R. T., WHITE, R. & VIRSHUP, D. M. 1999. Regulation of beta-catenin signaling by the B56 subunit of protein phosphatase 2A. *Science*, 283, 2089-91.
- SEHGAL, S. N., BAKER, H. & VEZINA, C. 1975. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot (Tokyo)*, 28, 727-32.
- SEKI, N., TAKASU, T., MANDAI, K., NAKATA, M., SAEKI, H., HEIKE, Y., TAKATA, I., SEGAWA, Y., HANAFUSA, T. & EGUCHI, K. 2002. Expression of eukaryotic initiation factor 4E in atypical adenomatous hyperplasia and adenocarcinoma of the human peripheral lung. *Clin Cancer Res*, 8, 3046-53.
- SEKIGUCHI, T., HIROSE, E., NAKASHIMA, N., II, M. & NISHIMOTO, T. 2001. Novel G proteins, Rag C and Rag D, interact with GTP-binding proteins, Rag A and Rag B. *J Biol Chem*, 276, 7246-57.
- SEKIRNIK, R., ROSE, N. R., THALHAMMER, A., SEDEN, P. T., MECINOVIC, J. & SCHOFIELD, C. J. 2009. Inhibition of the histone lysine demethylase JMJD2A by ejection of structural Zn(II). *Chem Commun (Camb)*, 6376-8.
- SERRANO, M., LIN, A. W., MCCURRACH, M. E., BEACH, D. & LOWE, S. W. 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, 88, 593-602.
- SETTEMBRE, C., DI MALTA, C., POLITO, V. A., GARCIA ARENCIBIA, M., VETRINI, F., ERDIN, S., ERDIN, S. U., HUYNH, T., MEDINA, D., COLELLA, P., SARDIELLO, M., RUBINSZTEIN, D. C. & BALLABIO, A. 2011. TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science*, 332, 1429-33.
- SETTEMBRE, C., ZONCU, R., MEDINA, D. L., VETRINI, F., ERDIN, S., ERDIN, S., HUYNH, T., FERRON, M., KARSENTY, G., VELLARD, M. C., FACCHINETTI, V., SABATINI, D. M. & BALLABIO, A. 2012. A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *Embo j*, 31, 1095-108.
- SEUFFERLEIN, T. & ROZENGURT, E. 1996. Rapamycin inhibits constitutive p70s6k phosphorylation, cell proliferation, and colony formation in small cell lung cancer cells. *Cancer Res*, 56, 3895-7.
- SHAHBAZIAN, D., ROUX, P. P., MIEULET, V., COHEN, M. S., RAUGHT, B., TAUNTON, J., HERSHEY, J. W., BLENIS, J., PENDE, M. & SONENBERG, N. 2006. The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity. *Embo j*, 25, 2781-91.
- SHAW, R. J., LAMIA, K. A., VASQUEZ, D., KOO, S. H., BARDEESY, N., DEPINHO, R. A., MONTMINY, M. & CANTLEY, L. C. 2005. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science*, 310, 1642-6.
- SHIMOBAYASHI, M. & HALL, M. N. 2014. Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15, 155-62.
- SHOSHANI, T., FAERMAN, A., METT, I., ZELIN, E., TENNE, T., GORODIN, S., MOSHEL, Y., ELBAZ, S., BUDANOV, A., CHAJUT, A., KALINSKI, H., KAMER, I., ROZEN, A., MOR, O., KESHET, E., LESHKOWITZ, D., EINAT, P., SKALITER, R. & FEINSTEIN, E. 2002. Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, RTP801, involved in apoptosis. *Mol Cell Biol*, 22, 2283-93.

- SIMAMORA, P., ALVAREZ, J. M. & YALKOWSKY, S. H. 2001. Solubilization of rapamycin. *Int J Pharm*, 213, 25-9.
- SIMPSON, J. C., WELLENREUTHER, R., POUSTKA, A., PEPPERKOK, R. & WIEMANN, S. 2000. Systematic subcellular localization of novel proteins identified by large-scale cDNA sequencing. *EMBO Rep*, 1, 287-92.
- SJOBLOM, T., JONES, S., WOOD, L. D., PARSONS, D. W., LIN, J., BARBER, T. D., MANDELKER, D., LEARY, R. J., PTAK, J., SILLIMAN, N., SZABO, S., BUCKHAULTS, P., FARRELL, C., MEEH, P., MARKOWITZ, S. D., WILLIS, J., DAWSON, D., WILLSON, J. K., GAZDAR, A. F., HARTIGAN, J., WU, L., LIU, C., PARMIGIANI, G., PARK, B. H., BACHMAN, K. E., PAPADOPOULOS, N., VOGELSTEIN, B., KINZLER, K. W. & VELCULESCU, V. E. 2006. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science*, 314, 268-74.
- SOFER, A., LEI, K., JOHANNESSEN, C. M. & ELLISEN, L. W. 2005. Regulation of mTOR and cell growth in response to energy stress by REDD1. *Mol Cell Biol*, 25, 5834-45.
- SONENBERG, N., MORGAN, M. A., MERRICK, W. C. & SHATKIN, A. J. 1978. A polypeptide in eukaryotic initiation factors that crosslinks specifically to the 5'-terminal cap in mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75, 4843-7.
- SONODA, Y., KUMABE, T., NAKAMURA, T., SAITO, R., KANAMORI, M., YAMASHITA, Y., SUZUKI, H. & TOMINAGA, T. 2009. Analysis of IDH1 and IDH2 mutations in Japanese glioma patients. *Cancer Sci*, 100, 1996-8.
- STAMBOLIC, V., MACPHERSON, D., SAS, D., LIN, Y., SNOW, B., JANG, Y., BENCHIMOL, S. & MAK, T. W. 2001. Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol Cell*, 8, 317-25.
- STEELMAN, L. S., NAVOLANIC, P. M., SOKOLOSKY, M. L., TAYLOR, J. R., LEHMANN, B. D., CHAPPELL, W. H., ABRAMS, S. L., WONG, E. W., STADELMAN, K. M., TERRIAN, D. M., LESLIE, N. R., MARTELLI, A. M., STIVALA, F., LIBRA, M., FRANKLIN, R. A. & MCCUBREY, J. A. 2008. Suppression of PTEN function increases breast cancer chemotherapeutic drug resistance while conferring sensitivity to mTOR inhibitors. *Oncogene*, 27, 4086-95.
- STEWART, M. D., LI, J. & WONG, J. 2005. Relationship between histone H3 lysine 9 methylation, transcription repression, and heterochromatin protein 1 recruitment. *Mol Cell Biol*, 25, 2525-38.
- STOKOE, D., STEPHENS, L. R., COPELAND, T., GAFFNEY, P. R., REESE, C. B., PAINTER, G. F., HOLMES, A. B., MCCORMICK, F. & HAWKINS, P. T. 1997. Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science*, 277, 567-70.
- STRUYS, E. A., VERHOEVEN, N. M., TEN BRINK, H. J., WICKENHAGEN, W. V., GIBSON, K. M. & JAKOBS, C. 2005. Kinetic characterization of human hydroxyacid-oxoacid transhydrogenase: relevance to D-2-hydroxyglutaric and gamma-hydroxybutyric acidurias. *J Inherit Metab Dis*, 28, 921-30.
- STURGILL, T. W., RAY, L. B., ERIKSON, E. & MALLER, J. L. 1988. Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II. *Nature*, 334, 715-8.
- SU, L. K., VOGELSTEIN, B. & KINZLER, K. W. 1993. Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science*, 262, 1734-7.

- SUTTER, C. H., LAUGHNER, E. & SEMENZA, G. L. 2000. Hypoxia-inducible factor 1alpha protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 4748-53.
- SUZUKI, M. M. & BIRD, A. 2008. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet*, 9, 465-76.
- TAHILIANI, M., KOH, K. P., SHEN, Y., PASTOR, W. A., BANDUKWALA, H., BRUDNO, Y., AGARWAL, S., IYER, L. M., LIU, D. R., ARAVIND, L. & RAO, A. 2009. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*, 324, 930-5.
- TAKAHASHI, T., HARA, K., INOUE, H., KAWA, Y., TOKUNAGA, C., HIDAYAT, S., YOSHINO, K., KURODA, Y. & YONEZAWA, K. 2000. Carboxyl-terminal region conserved among phosphoinositide-kinase-related kinases is indispensable for mTOR function in vivo and in vitro. *Genes Cells*, 5, 765-75.
- TEE, A. R., MANNING, B. D., ROUX, P. P., CANTLEY, L. C. & BLENIS, J. 2003. Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Curr Biol*, 13, 1259-68.
- THALHAMMER, A., MECINOVIC, J., LOENARZ, C., TUMBER, A., ROSE, N. R., HEIGHTMAN, T. D. & SCHOFIELD, C. J. 2011. Inhibition of the histone demethylase JMJD2E by 3-substituted pyridine 2,4-dicarboxylates. *Org Biomol Chem*, 9, 127-35.
- THOMAS, G. V., TRAN, C., MELLINGHOFF, I. K., WELSBIE, D. S., CHAN, E., FUEGER, B., CZERNIN, J. & SAWYERS, C. L. 2006. Hypoxia-inducible factor determines sensitivity to inhibitors of mTOR in kidney cancer. *Nat Med*, 12, 122-7.
- THOREEN, C. C., CHANTRANUPONG, L., KEYS, H. R., WANG, T., GRAY, N. S. & SABATINI, D. M. 2012. A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature*, 485, 109-13.
- THOREEN, C. C., KANG, S. A., CHANG, J. W., LIU, Q., ZHANG, J., GAO, Y., REICHLING, L. J., SIM, T., SABATINI, D. M. & GRAY, N. S. 2009. An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *J Biol Chem*, 284, 8023-32.
- TOMLINSON, I. P., ALAM, N. A., ROWAN, A. J., BARCLAY, E., JAEGER, E. E., KELSELL, D., LEIGH, I., GORMAN, P., LAMLUM, H., RAHMAN, S., ROYLANCE, R. R., OLPIN, S., BEVAN, S., BARKER, K., HEARLE, N., HOULSTON, R. S., KIURU, M., LEHTONEN, R., KARHU, A., VILKKI, S., LAIHO, P., EKLUND, C., VIERIMAA, O., AITTO MAKI, K., HIETALA, M., SISTONEN, P., PAETAU, A., SALOVAARA, R., HERVA, R., LAUNONEN, V. & AALTONEN, L. A. 2002. Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nat Genet*, 30, 406-10.
- TOPCU, M., JOBARD, F., HALLIEZ, S., COSKUN, T., YALCINKAYAL, C., GERCEKER, F. O., WANDERS, R. J., PRUD'HOMME, J. F., LATHROP, M., OZGUC, M. & FISCHER, J. 2004. L-2-Hydroxyglutaric aciduria: identification of a mutant gene C14orf160, localized on chromosome 14q22.1. *Hum Mol Genet*, 13, 2803-11.
- TREINS, C., WARNE, P. H., MAGNUSON, M. A., PENDE, M. & DOWNWARD, J. 2010. Rictor is a novel target of p70 S6 kinase-1. *Oncogene*, 29, 1003-16.

- TROJER, P., ZHANG, J., YONEZAWA, M., SCHMIDT, A., ZHENG, H., JENUWEIN, T. & REINBERG, D. 2009. Dynamic Histone H1 Isozyme 4 Methylation and Demethylation by Histone Lysine Methyltransferase G9a/KMT1C and the Jumonji Domain-containing JMJD2/KDM4 Proteins. *J Biol Chem*, 284, 8395-405.
- TSUKADA, Y., FANG, J., ERDJUMENT-BROMAGE, H., WARREN, M. E., BORCHERS, C. H., TEMPST, P. & ZHANG, Y. 2006. Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature*, 439, 811-6.
- TSUN, Z. Y., BAR-PELED, L., CHANTRANUPONG, L., ZONCU, R., WANG, T., KIM, C., SPOONER, E. & 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.
- TURCAN, S., ROHLE, D., GOENKA, A., WALSH, L. A., FANG, F., YILMAZ, E., CAMPOS, C., FABIUS, A. W., LU, C., WARD, P. S., THOMPSON, C. B., KAUFMAN, A., GURYANOVA, O., LEVINE, R., HEGUY, A., VIALE, A., MORRIS, L. G., HUSE, J. T., MELLINGHOFF, I. K. & CHAN, T. A. 2012. IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature*, 483, 479-83.
- UPADHYAY, A. K., ROTILI, D., HAN, J. W., HU, R., CHANG, Y., LABELLA, D., ZHANG, X., YOON, Y. S., MAI, A. & CHENG, X. 2012. An analog of BIX-01294 selectively inhibits a family of histone H3 lysine 9 Jumonji demethylases. *J Mol Biol*, 416, 319-27.
- VAN AELST, L., BARR, M., MARCUS, S., POLVERINO, A. & WIGLER, M. 1993. Complex formation between RAS and RAF and other protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 6213-7.
- VAN DER POEL, H. G., HANRAHAN, C., ZHONG, H. & SIMONS, J. W. 2003. Rapamycin induces Smad activity in prostate cancer cell lines. *Urol Res*, 30, 380-6.
- VAN DER VOS, K. E. & COFFER, P. J. 2012. Glutamine metabolism links growth factor signaling to the regulation of autophagy. *Autophagy*, 8, 1862-4.
- VAN DER VOS, K. E., ELIASSON, P., PROIKAS-CEZANNE, T., VERVOORT, S. J., VAN BOXTEL, R., PUTKER, M., VAN ZUTPHEN, I. J., MAUTHE, M., ZELLMER, S., PALS, C., VERHAGEN, L. P., GROOT KOERKAMP, M. J., BRAAT, A. K., DANSEN, T. B., HOLSTEGE, F. C., GEBHARDT, R., BURGERING, B. M. & COFFER, P. J. 2012. Modulation of glutamine metabolism by the PI(3)K-PKB-FOXO network regulates autophagy. *Nat Cell Biol*, 14, 829-37.
- VAN NOORDEN, C. J. & BUTCHER, R. G. 1986. A quantitative histochemical study of NADPH-ferrihemoprotein reductase activity. *Histochem J*, 18, 364-70.
- VAN RECHEM, C., BLACK, J. C., BOUKHALI, M., ARYEE, M. J., GRASLUND, S., HAAS, W., BENES, C. H. & WHETSTINE, J. R. 2015a. Lysine demethylase KDM4A associates with translation machinery and regulates protein synthesis. *Cancer Discov*, 5, 255-63.
- VAN RECHEM, C., BLACK, J. C., GRENINGER, P., ZHAO, Y., DONADO, C., BURROWES, P. D., LADD, B., CHRISTIANI, D. C., BENES, C. H. & WHETSTINE, J. R. 2015b. A coding single-nucleotide polymorphism in lysine demethylase KDM4A associates with increased sensitivity to mTOR inhibitors. *Cancer Discov*, 5, 245-54.

- VAN SLEGTENHORST, M., DE HOOGT, R., HERMANS, C., NELLIST, M., JANSSEN, B., VERHOEF, S., LINDHOUT, D., VAN DEN OUWELAND, A., HALLEY, D., YOUNG, J., BURLEY, M., JEREMIAH, S., WOODWARD, K., NAHMIAS, J., FOX, M., EKONG, R., OSBORNE, J., WOLFE, J., POVEY, S., SNELL, R. G., CHEADLE, J. P., JONES, A. C., TACHATAKI, M., RAVINE, D., SAMPSON, J. R., REEVE, M. P., RICHARDSON, P., WILMER, F., MUNRO, C., HAWKINS, T. L., SEPP, T., ALI, J. B., WARD, S., GREEN, A. J., YATES, J. R., KWIATKOWSKA, J., HENSKKE, E. P., SHORT, M. P., HAINES, J. H., JOZWIAK, S. & KWIATKOWSKI, D. J. 1997. Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34. *Science*, 277, 805-8.
- VANDER HAAR, E., LEE, S. I., BANDHAKAVI, S., GRIFFIN, T. J. & KIM, D. H. 2007. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol*, 9, 316-23.
- VARGA, A., CZIFRA, G., TALLAI, B., NEMETH, T., KOVACS, I., KOVACS, L. & BIRO, T. 2004. Tumor grade-dependent alterations in the protein kinase C isoform pattern in urinary bladder carcinomas. *Eur Urol*, 46, 462-5.
- VELLAI, T., TAKACS-VELLAI, K., ZHANG, Y., KOVACS, A. L., OROSZ, L. & MULLER, F. 2003. Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. *Nature*, 426, 620.
- VEZINA, C., KUDELSKI, A. & SEHGAL, S. N. 1975. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)*, 28, 721-6.
- VOJTEK, A. B., HOLLENBERG, S. M. & COOPER, J. A. 1993. Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell*, 74, 205-14.
- WAGNER, K., DAMM, F., GOHRING, G., GORLICH, K., HEUSER, M., SCHAFFER, I., OTTMANN, O., LUBBERT, M., HEIT, W., KANZ, L., SCHLIMOK, G., RAGHAVACHAR, A. A., FIEDLER, W., KIRCHNER, H. H., BRUGGER, W., ZUCKNICK, M., SCHLEGELBERGER, B., HEIL, G., GANSER, A. & KRAUTER, J. 2010. Impact of IDH1 R132 mutations and an IDH1 single nucleotide polymorphism in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: SNP rs11554137 is an adverse prognostic factor. *J Clin Oncol*, 28, 2356-64.
- WANDER, S. A., HENNESSY, B. T. & SLINGERLAND, J. M. 2011. Next-generation mTOR inhibitors in clinical oncology: how pathway complexity informs therapeutic strategy. *J Clin Invest*, 121, 1231-41.
- WANG, F., TRAVINS, J., DELABARRE, B., PENARD-LACRONIQUE, V., SCHALM, S., HANSEN, E., STRALEY, K., KERNYTSKY, A., LIU, W., GLISER, C., YANG, H., GROSS, S., ARTIN, E., SAADA, V., MYLONAS, E., QUIVORON, C., POPOVICI-MULLER, J., SAUNDERS, J. O., SALITURO, F. G., YAN, S., MURRAY, S., WEI, W., GAO, Y., DANG, L., DORSCH, M., AGRESTA, S., SCHENKEIN, D. P., BILLER, S. A., SU, S. M., DE BOTTON, S. & YEN, K. E. 2013. Targeted inhibition of mutant IDH2 in leukemia cells induces cellular differentiation. *Science*, 340, 622-6.
- WANG, G. L., JIANG, B. H., RUE, E. A. & SEMENZA, G. L. 1995. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 5510-4.
- WANG, S., TSUN, Z. Y., WOLFSON, R. L., SHEN, K., WYANT, G. A., PLOVANICH, M. E., YUAN, E. D., JONES, T. D., CHANTRANUPONG, L., COMB, W., WANG, T.,

- BAR-PELED, L., ZONCU, R., STRAUB, C., KIM, C., PARK, J., SABATINI, B. L. & SABATINI, D. M. 2015. Metabolism. Lysosomal amino acid transporter SLC38A9 signals arginine sufficiency to mTORC1. *Science*, 347, 188-94.
- WANG, X., CAMPBELL, L. E., MILLER, C. M. & PROUD, C. G. 1998. Amino acid availability regulates p70 S6 kinase and multiple translation factors. *Biochem J*, 334 (Pt 1), 261-7.
- WANG, X., LI, W., WILLIAMS, M., TERADA, N., ALESSI, D. R. & PROUD, C. G. 2001. Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *Embo j*, 20, 4370-9.
- WARBURG, O. 1956. On the origin of cancer cells. *Science*, 123, 309-14.
- WARD, P. S., CROSS, J. R., LU, C., WEIGERT, O., ABEL-WAHAB, O., LEVINE, R. L., WEINSTOCK, D. M., SHARP, K. A. & THOMPSON, C. B. 2012. Identification of additional IDH mutations associated with oncometabolite R(-)-2-hydroxyglutarate production. *Oncogene*, 31, 2491-8.
- WARD, P. S., PATEL, J., WISE, D. R., ABDEL-WAHAB, O., BENNETT, B. D., COLLER, H. A., CROSS, J. R., FANTIN, V. R., HEDVAT, C. V., PERL, A. E., RABINOWITZ, J. D., CARROLL, M., SU, S. M., SHARP, K. A., LEVINE, R. L. & THOMPSON, C. B. 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, 225-34.
- WATANABE, T., NOBUSAWA, S., KLEIHUES, P. & OHGAKI, H. 2009. IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am J Pathol*, 174, 1149-53.
- WHETSTINE, J. R., NOTTKE, A., LAN, F., HUARTE, M., SMOLIKOV, S., CHEN, Z., SPOONER, E., LI, E., ZHANG, G., COLAIACOVO, M. & SHI, Y. 2006. Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases. *Cell*, 125, 467-81.
- WILLIAMS, S. C. 2013. Inhibitors of rogue enzyme near trials for brain and blood tumors. *Nat Med*, 19, 514.
- WILLIAMS, S. C., KARAJANNIS, M. A., CHIRIBOGA, L., GOLFINOS, J. G., VON DEIMLING, A. & ZAGZAG, D. 2011. R132H-mutation of isocitrate dehydrogenase-1 is not sufficient for HIF-1alpha upregulation in adult glioma. *Acta Neuropathol*, 121, 279-81.
- WINSTON, J. T., STRACK, P., BEER-ROMERO, P., CHU, C. Y., ELLEDGE, S. J. & HARPER, J. W. 1999. The SCFbeta-TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in IkappaBalpha and beta-catenin and stimulates IkappaBalpha ubiquitination in vitro. *Genes Dev*, 13, 270-83.
- WISEMAN, H. & HALLIWELL, B. 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J*, 313 (Pt 1), 17-29.
- XIAO, M., YANG, H., XU, W., MA, S., LIN, H., ZHU, H., LIU, L., LIU, Y., YANG, C., XU, Y., ZHAO, S., YE, D., XIONG, Y. & GUAN, K. L. 2012. Inhibition of alpha-KG-dependent histone and DNA demethylases by fumarate and succinate that are accumulated in mutations of FH and SDH tumor suppressors. *Genes Dev*, 26, 1326-38.
- XU, W., YANG, H., LIU, Y., YANG, Y., WANG, P., KIM, S. H., ITO, S., YANG, C., WANG, P., XIAO, M. T., LIU, L. X., JIANG, W. Q., LIU, J., ZHANG, J. Y., WANG,

- B., FRYE, S., ZHANG, Y., XU, Y. H., LEI, Q. Y., GUAN, K. L., ZHAO, S. M. & XIONG, Y. 2011. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell*, 19, 17-30.
- YADAV, R. B., BURGOS, P., PARKER, A. W., IADEVAIA, V., PROUD, C. G., ALLEN, R. A., O'CONNELL, J. P., JESHTADI, A., STUBBS, C. D. & BOTCHWAY, S. W. 2013. mTOR direct interactions with Rheb-GTPase and raptor: sub-cellular localization using fluorescence lifetime imaging. *BMC Cell Biol*, 14, 3.
- YAMAMOTO, Y. 1969. Relative activities of NAD- and NADP- isocitric dehydrogenases in bean mitochondria modified by glycerol or NADP. *Plant Physiol*, 44, 262-6.
- YAN, H., PARSONS, D. W., JIN, G., MCLENDON, R., RASHEED, B. A., YUAN, W., KOS, I., BATINIC-HABERLE, I., JONES, S., RIGGINS, G. J., FRIEDMAN, H., FRIEDMAN, A., REARDON, D., HERNDON, J., KINZLER, K. W., VELCULESCU, V. E., VOGELSTEIN, B. & BIGNER, D. D. 2009. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*, 360, 765-73.
- YANG, H., LIU, Y., BAI, F., ZHANG, J. Y., MA, S. H., LIU, J., XU, Z. D., ZHU, H. G., LING, Z. Q., YE, D., GUAN, K. L. & XIONG, Y. 2013. Tumor development is associated with decrease of TET gene expression and 5-methylcytosine hydroxylation. *Oncogene*, 32, 663-9.
- YEANG, C. H., MCCORMICK, F. & LEVINE, A. 2008. Combinatorial patterns of somatic gene mutations in cancer. *Faseb j*, 22, 2605-22.
- YOST, C., TORRES, M., MILLER, J. R., HUANG, E., KIMELMAN, D. & MOON, R. T. 1996. The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev*, 10, 1443-54.
- YOU, H., PELLEGRINI, M., TSUCHIHARA, K., YAMAMOTO, K., HACKER, G., ERLACHER, M., VILLUNGER, A. & MAK, T. W. 2006. FOXO3a-dependent regulation of Puma in response to cytokine/growth factor withdrawal. *J Exp Med*, 203, 1657-63.
- YUAN, M., PINO, E., WU, L., KACERGIS, M. & SOUKAS, A. A. 2012. Identification of Akt-independent regulation of hepatic lipogenesis by mammalian target of rapamycin (mTOR) complex 2. *J Biol Chem*, 287, 29579-88.
- ZHANG, X., SHU, L., HOSOI, H., MURTI, K. G. & HOUGHTON, P. J. 2002. Predominant nuclear localization of mammalian target of rapamycin in normal and malignant cells in culture. *J Biol Chem*, 277, 28127-34.
- ZHAO, S., LIN, Y., XU, W., JIANG, W., ZHA, Z., WANG, P., YU, W., LI, Z., GONG, L., PENG, Y., DING, J., LEI, Q., GUAN, K. L. & XIONG, Y. 2009. Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1alpha. *Science*, 324, 261-5.
- ZHAO, Y., XIONG, X. & SUN, Y. 2011. DEPTOR, an mTOR inhibitor, is a physiological substrate of SCF(betaTrCP) E3 ubiquitin ligase and regulates survival and autophagy. *Mol Cell*, 44, 304-16.
- ZHENG, B., YAO, Y., LIU, Z., DENG, L., ANGLIN, J. L., JIANG, H., PRASAD, B. V. & SONG, Y. 2013. Crystallographic Investigation and Selective Inhibition of Mutant Isocitrate Dehydrogenase. *ACS Med Chem Lett*, 4, 542-546.
- ZHONG, H., CHILES, K., FELDSER, D., LAUGHNER, E., HANRAHAN, C., GEORGESCU, M. M., SIMONS, J. W. & SEMENZA, G. L. 2000. Modulation of

hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res*, 60, 1541-5.

ZINZALLA, V., STRACKA, D., OPPLIGER, W. & HALL, M. N. 2011. Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell*, 144, 757-68.

ZONCU, R., BAR-PELED, L., EFEYAN, A., WANG, S., SANCAK, Y. & SABATINI, D. M. 2011. mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase. *Science*, 334, 678-83.

ZUNDEL, W., SCHINDLER, C., HAAS-KOGAN, D., KOONG, A., KAPER, F., CHEN, E., GOTTSCHALK, A. R., RYAN, H. E., JOHNSON, R. S., JEFFERSON, A. B., STOKOE, D. & GIACCIA, A. J. 2000. Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev*, 14, 391-6.