



HAL
open science

Modulation de la voie HIPPO par un métabolite aux propriétés anti-tumorales : l'AICAR

Chloe Philippe

► **To cite this version:**

Chloe Philippe. Modulation de la voie HIPPO par un métabolite aux propriétés anti-tumorales : l'AICAR. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2016. Français. NNT : 2016BORD0454 . tel-01968013

HAL Id: tel-01968013

<https://theses.hal.science/tel-01968013>

Submitted on 2 Jan 2019

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

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

Université de Bordeaux

THÈSE POUR LE DIPLÔME DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

Ecole Doctorale science de la vie et de la santé

Spécialité : biologie cellulaire et physiopathologie

Modulation de la voie HIPPO par un métabolite aux propriétés antitumorales : l'AICAR

Soutenue le
16 décembre 2016

Par
Chloé PHILIPPE

Membres du jury

Michel MOENNER	Professeur, Bordeaux	Directeur de thèse
Jean-Max PASQUET	Directeur de Recherche, Bordeaux	Président de jury
Éric CHEVET	Directeur de Recherche, Rennes	Rapporteur
Vincent LAGENTE	Professeur, Rennes	Rapporteur
Christine VARON	Maitre de conférences, Bordeaux	Examinatrice

REMERCIEMENT

Mes travaux ont été réalisés à l'Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires de Bordeaux (UMR 5095). Je remercie Bertrand Daignan-Fornier ainsi que tous les membres de l'équipe pour leur accueil et leur aide.

Je remercie mon directeur de thèse Michel Moenner pour avoir accepté d'encadrer mon travail. Son soutien, sa pédagogie et ses nombreux conseils m'ont permis de mener à bien ce projet de recherche.

Je remercie le Dr Jean-Max Pasquet pour avoir accepté de présider ce jury de thèse ainsi que les membres de ce jury le Dr Vincent Lagente, le Dr Éric Chevet et le Dr Christine Varon pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je souhaitais remercier Jim Dompierre pour son aide indispensable concernant la microscopie.

Merci à mes « collègues » pour votre précieuse amitié : Delphine, Johanna, Stéphane et Laure.

Un grand merci à mes parents et mes grands-parents pour leurs encouragements et leur confiance.

Merci à Simon et à sa famille pour leur énergie et leur optimisme.

Je conclurai ces remerciements par un mot pour ma sœur, Juliette, qui démarre ses études quand je les termine. Je lui souhaite beaucoup de courage, de persévérance et de réussite dans ce qu'elle choisira d'entreprendre.

SOMMAIRE

REMERCIEMENT	2
LISTE DES FIGURES.....	8
LISTE DES ABBREVIATIONS	10
RESUME	12
INTRODUCTION	14
.....	15
I. Partie 1 – Le ZMP, métabolite aux multiples effets	16
A. Biosynthèse des purines et des pyrimidiques.....	18
1. Description des voies de biosynthèse <i>de novo</i> des purines et pyrimidiques	18
2. Régulations des voies de biosynthèse <i>de novo</i> des purines et des pyrimidines	18
3. Les métabolites ZMP et sZMP comme régulateurs	19
B. L'accumulation du ZMP et ses effets chez les mammifères.....	21
1. Le ZMP est une molécule anti tumorale aux effets multiples.	21
a. La culture de lignées cellulaires.....	22
b. L'aneuploïdie, caractéristique tumorale ciblée par le ZMP.....	23
c. L'utilisation de biopsie de patient.....	24
d. L'expérimentation animale.....	25
e. L'essai clinique.....	25
2. Le ZMP active l'AMPK en mimant l'AMP.....	26
a. A l'échelle cellulaire	26
b. A l'échelle de l'organisme.....	27
3. Le ZMP ne cible pas seulement l'AMPK.....	29
a. Effet anti-prolifératif chez la levure <i>S. cerevisiae</i>	29

	b.	Rôle discuté de l'AMPK dans l'effet cytotoxique de l'AICAR.....	30
	c.	Modulation directe de l'AICAR sur certaines enzymes.....	30
	d.	Chromatographie d'affinité sur colonne d'AICAR et d'AMP	30
	C.	But de la thèse	31
II.		Partie 2 – La voie HIPPO	34
	A.	Description globale de la voie HIPPO.....	34
	1.	La convergence des signaux extracellulaires.....	34
	2.	Le centre fonctionnel HIPPO	36
	a.	Les deux modules du centre fonctionnel HIPPO.....	36
		Le module protéine kinase.....	36
		Le module	36
	b.	La voie HIPPO activée.....	36
	c.	La voie HIPPO inhibée.....	36
	3.	La divergence des signaux.....	37
	4.	Les embranchements de la voie HIPPO	37
	B.	Les modulateurs de la voie HIPPO	37
	1.	Polarité apico-basale.....	38
	2.	La MEC.....	40
	3.	La signalisation hormonale et par les cytokines	40
	4.	Le cytosquelette centralise les signaux de polarité cellulaire et de molécules signales.....	41
	C.	Effets de la voie HIPPO médiés par YAP et TAZ.....	42
	1.	Modulation transcriptionnelle par la voie HIPPO.....	43
	2.	Rétrocontrôle négatif sur la voie HIPPO	44
	3.	Rôle dans le développement embryonnaire, la taille des organes et l'homéostasie	45
	a.	La voie HIPPO est fondamentale pour le développement embryonnaire précoce. 45	
	a.	La voie HIPPO régule la taille des organes.....	45
	a.	La voie HIPPO est garante de l'homéostasie tissulaire.	45
	4.	Dysfonction de la voie HIPPO : formation de tumeur	47
	D.	LATS1 et LATS2, au carrefour de plusieurs voies.....	49

1.	LATS1 et LATS2 sont des suppresseurs de tumeurs	49
2.	Le rôle de LATS1 et LATS2 lors du cycle cellulaire	51
3.	Le rôle de LATS1 et LATS2 durant la division cellulaire	51
TRAVAIL DE THESE.....		53
I.	Article 1 :.....	55
	« Identification des transporteurs membranaires de l'AICAR chez la levure et l'homme »	55
A.	Introduction de l'article 1	55
B.	Article	57
C.	Conclusion.....	71
II.	Article 2 :.....	74
	« L'AICAR module la voie HIPPO en activant les protéines LATS1 et LATS2 »	74
A.	Introduction de l'article 2	74
1.	Méthodologie.....	74
2.	Démarche expérimentale.....	74
	a. Culture des lignées cellulaires MEF wt et MEF-dKO AMPK	74
	b. Etude des réponses cellulaires des lignées MEF-wt et MEF-dKO AMPK à l'AICAR	76
	c. Choix des conditions pour l'étude transcriptomique.....	76
	d. Analyse des résultats	77
	e. Validation protéique et fonctionnelle des cibles transcriptionnelles	79
B.	Article	79
C.	Résultats complémentaires	109
1.	Effet antitumoral de l'AICAR dans le modèle murin.....	109
	a. L'étude pilote.....	109
	b. Xénogreffes de lignées tumorales en sous-cutané.....	110
	c. Xénogreffe de lignées tumorales en intra-cérébral.....	110
2.	CUX1, facteur de transcription induisant LATS1	113
DISCUSSION / CONCLUSION		117
1.	L'AICAR et l'AMPK.....	119

2.	L'AICAR et la voie HIPPO.....	120
REFERENCES.....		123

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Un schéma représentant le métabolisme cellulaire.	15
Figure 2 : Formules topologiques de quelques métabolites clefs des. Voie de biosynthèse <i>de novo</i> des purines, ses voies attenantes.	17
Figure 3 : Mécanismes de régulation de la voie de biosynthèse des purines et des pyrimidines.	19
Figure 4 : Transport et métabolisation de l'AICAR exogène.	21
Figure 5 : L'aneuploïde caractérise une cellule dont nombre de chromosome n'est pas un multiple exacte du nombre haploïde de chromosome.	23
Figure 6 : Stress protéotoxique des cellules aneuploïdes.	24
Figure 7 : L'AMPK, une cible thérapeutique pour les maladies du métabolisme.	27
Figure 8 : L'AMPK régule le comportement alimentaire au niveau de l'hypothalamus.	28
Figure 9 : L'effet cytotoxique de l'AICAR est t-il dépendant de l'AMPK ?.....	31
Figure 10 : La voie HIPPO est une « boîte » centralisant et envoyant des signaux.....	33
Figure 11 : Description du centre fonctionnel de la voie HIPPO.	35
Figure 12 : Les mécanismes régulant la voie HIPPO.....	39
Figure 13 : Programme de transcription de la voie HIPPO.....	43
Figure 14 : Rétrocontrôle négatif transcriptionnel sur la voie HIPPO.....	Erreur ! Signet non défini.
Figure 15 : Rôle potentiel de YAP et TAZ dans l'homéostasie tissulaire et le développement de maladies.	46
Figure 16 : Phénomènes pouvant être à l'origine de la localisation nucléaire de YAP et TAZ dans le cadre de la tumorigénèse.....	48
Figure 17 : Les différents domaines des protéines LATS.....	49
Figure 18 : Un modèle de la nouvelle voie pour la ségrégation des chromosomes et la cytokinèse <i>via</i> l'axe ALB.	52
Figure 19 : Les transporteurs de nucléosides permettent le transport de l'AICAR chez la levure et l'homme.	72
Figure 20 : Mise en évidence de fonctions cellulaires modulées par l'AICAR et responsables de son effet cytotoxique indépendamment de l'AMPK.....	75
Figure 21 : Métabolisation de l'AICAR en dérivés intracellulaires ZMP et sZMP.	77
Figure 22 : Impact du traitement à l'AICAR sur le poids des souris.	111
Figure 23 : Xénogreffes sous-cutanées de lignées tumorales issues de glioblastome U87 et SF188 chez la souris immunodéficiente.....	111
Figure 24 : Xénogreffes intra-cérébrales de lignées tumorales issues de glioblastome (U87 et SF188) chez la souris immunodéficiente.....	112
Figure 25 : CUX1 pourrait être la cible directe de l'AICAR.....	114
Figure 26 : Résultats obtenus sur les MEF-Cux+/+ et MEF-Cux-/-	114

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADSL	ADenyloSuccinate Lyase
AICAR ou AICA riboside	5-Amino-4-Imidazole CARboxamide Ribonucleoside
AMA	Agence Mondiale Antidopage
AMPK	Adénosine MonoPhosphate activated Protein Kinase
ATIC	5-Aminoimidazole-4-Carboxamide Ribonucleotide Formyltransferase
Axe ALB	axe Aurora A-Lats1/2- Aurora B
CDK	Cyclin Dependent Kinase
CIHP	Chromatographie en phase ionique à Haute Performance
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
CUX1	Cut homeoboX 1
CNT	Concentrative Nucleoside Transporter
dKO	double Know-Out
ENT	Equilibrative Nucleoside Transporter
F-actine	actine Filamenteuse
GPCR	G Protein-Coupled Receptor
HCT116	Human colon carcinoma
IMP	Inosine MonoPhosphate
kd	Know-Down
KO	Know-Out
LATS1/2	LArge Tumor Suppressor Kinase 1/2
LLC-B	Leucémie Lymphoïde Chronique de type B
LCM	Lymphome à Cellules du Manteau
LMC	Leucémie Myéloïde Chronique
MEC	Matrice ExtraCellulaire
MEF	Mouse Embryonic Fibroblasts
MOB1A/1B	Mps One Binder Kinase Activator-Like 1A/1B
MST1/2	Mammalian STE20-Like Protein Kinase 1/ 2
NmR	NicotinaMide Riboside
PKM	Pyruvate Kinase d'isoforme M

PRPP	5-PhosphoRibosyl- α -1-PyroPhosphate
RE	Reticulum Endoplasmique
RPE-1	Retinal Pigment Epithelium-1
R5P	Ribose-5-Phosphate
S. cerevisiae	Saccharomyces cerevisiae
S. Pombe	Schizosaccharomyces Pombe
SAV1	Salvador Family WW Domain Containing Protein
shARN	Short Hairpin RNA
siARN	Small Interference RNA
sZMP	Succinyl-ZMP
TAZ	Transcriptionnal co Activator with pdZ binding motif
TEADs	TEA Domain Transcription Factors
UBA1	Ubiquitin Like Modifier Activating Enzyme 1
UMP	Uridine MonoPhosphate
wt	Wild Type, Sauvage
YAP1	Yes Associated Protein 1
ZMP	5'-phosphoribosyl-5-amino-4-imidazole carboxamide

RESUME

L'AICAR (5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide) est un intermédiaire de la voie de biosynthèse des purines. A des concentrations importantes, ce métabolite a un effet cytotoxique sur les cellules cancéreuses aneuploïdes, c'est-à-dire contenant un nombre anormal de chromosome. Or, 90% des tumeurs solides sont aneuploïdes. Les mécanismes responsables de cette cytotoxicité doivent donc être mieux étudiés pour une utilisation éventuelle en thérapie anti-cancéreuse.

Dans la littérature, l'effet de l'AICAR est expliqué par son rôle mimétique de l'AMP sur l'AMPK. Cependant, certaines données de la littérature et du laboratoire laissent penser que l'inhibition de la croissance par l'AICAR peut impliquer plusieurs types de mécanismes dont certains sont dépendants de l'AMPK et d'autres indépendants. L'identification des cibles de l'AICAR alternatives à l'AMPK est donc nécessaire pour une meilleure compréhension de ses effets.

Dans ce projet, j'ai pu confirmer la présence d'autres cibles de l'AICAR indépendantes de l'AMPK et responsables de son effet cytotoxique. Grâce à une approche transcriptomique, j'ai montré un effet de l'AICAR sur l'expression et l'activation de LATS1 et LATS2 (large tumor suppressor 1 and 2). Ces protéines kinases font partie du core enzymatique de la voie HIPPO, dont le rôle en cancérologie est fondamental. Les effecteurs finaux de cette voie sont YAP et TAZ, deux cofacteurs de transcription, aussi régulés par l'AICAR. J'ai pu montrer que la cytotoxicité de l'AICAR est due en partie à l'activation de cette voie. Depuis la découverte récente de la voie HIPPO, de nombreuses études visent à identifier des molécules permettant l'inhibition directe de cette voie. L'AICAR s'avère être une molécule puissante dans le cadre d'une thérapie anticancéreuse ciblant la voie HIPPO.

INTRODUCTION

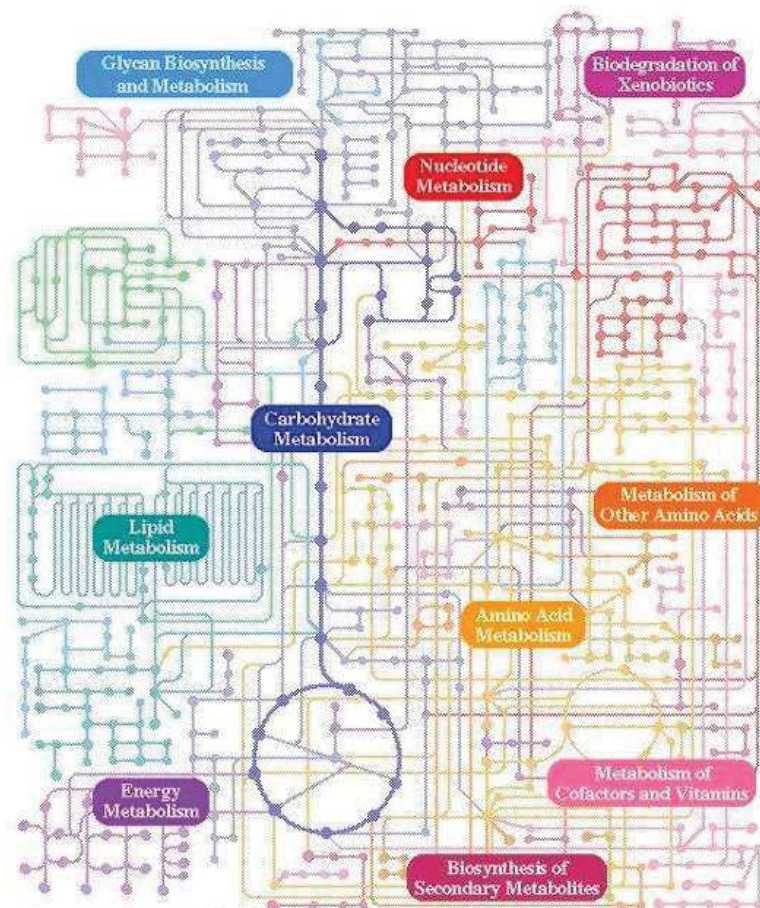


Figure 1 : Un schéma représentant le métabolisme cellulaire.

Les points représentent les métabolites et les lignes, les réactions chimiques. Les lignes et points en gras au centre représentent les voies cataboliques centrales de la glycolyse et du cycle de Krebs. Les différentes voies métaboliques sont représentées en couleurs. Un point connecté à une ligne peut être un nutriment, une molécule de stockage ou un produit final. Certains métabolites sont des intermédiaires de plusieurs voies métaboliques distinctes. Illustration issue du site web suivant : <http://www.genome.jp/kegg/>

I. Partie 1 – Le ZMP, métabolite aux multiples effets

Le mot métabolisme vient du grec « metabole » qui signifie le changement, la transformation. Le métabolisme représente dans une cellule donnée plus d'un millier de réactions chimiques permettant la conversion des nutriments en énergie ou en biomolécules. Cet ensemble de réactions est composé de voies métaboliques au sein desquelles les substrats sont transformés en produits, générant ainsi de nombreux intermédiaires moléculaires appelés métabolites.

Le métabolisme sert deux buts fondamentaux : d'une part la génération d'énergie pour assurer le fonctionnement des fonctions vitales, et d'autre part la synthèse des molécules biologiques pour produire les divers constituants cellulaires. Pour répondre à ces besoins cellulaires, le métabolisme est divisé en deux processus s'opposant : le catabolisme consistant en une dégradation des molécules et l'anabolisme représentant la biosynthèse de constituants cellulaires. Le catabolisme libère de l'énergie alors que l'anabolisme utilise de l'énergie pour la biosynthèse de constituants cellulaires.

Les flux métaboliques doivent être finement régulés afin de répondre au mieux aux besoins cellulaires en énergie et en constituants. La régulation d'enzymes catalysant des étapes clés du métabolisme contribue à maintenir l'homéostasie cellulaire. Deux niveaux de régulation majeurs existent :

- Les produits finaux des voies métaboliques peuvent réguler la vitesse des flux selon le principe du rétrocontrôle. Lors de cette régulation intrinsèque au métabolisme, des enzymes peuvent fixer les produits finaux et être ainsi régulées. Certains intermédiaires réactionnels contribuent également à la régulation du métabolisme. Ainsi, les intermédiaires métabolites ne sont pas de simples maillons d'un ensemble de chaînes mais ont aussi un rôle dans l'homéostasie cellulaire.
- Des voies extrinsèques au métabolisme tel que la régulation hormonale régulent la vitesse des flux métaboliques. Les enzymes peuvent être régulées par fixation directe ou alors par modulation de leur expression.

Lors de ce travail, je me suis intéressée à un métabolite en particulier, le ZMP (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide). Le ZMP est un intermédiaire du métabolisme des bases puriques très conservé au cours de l'évolution et possédant de nombreuses propriétés ^{1,2}.

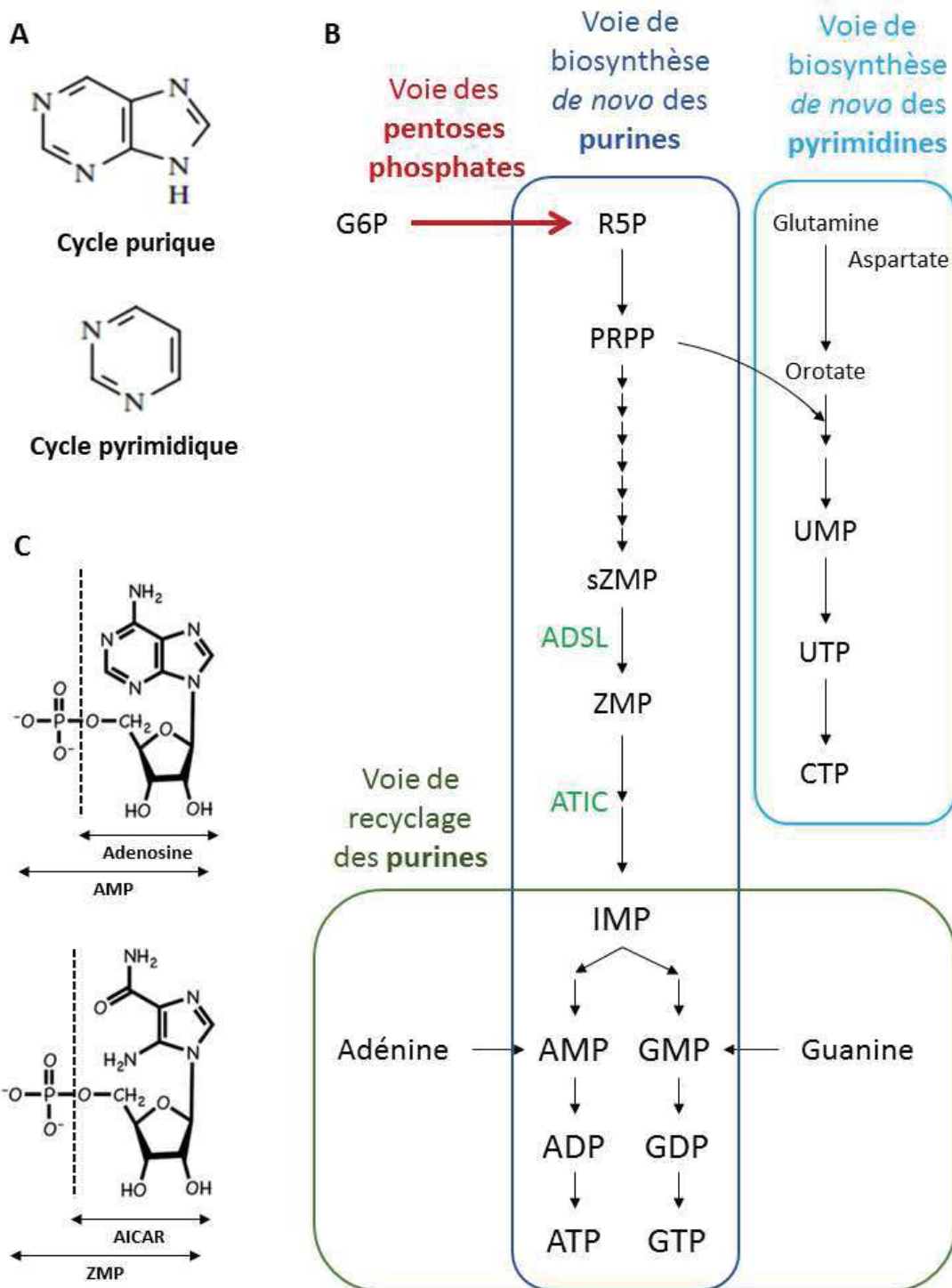


Figure 2 : Formules topologiques de quelques métabolites clés des. Voie de biosynthèse *de novo* des purines, ses voies attenantes.

A) Les cycles puriques et pyrimidiques, structures communes aux bases puriques et pyrimidiques. B) Le R5P (Ribose-5-Phosphate), substrat des voies de biosynthèse des purines et pyrimidines, est fourni par la voie des pentoses phosphates. Les voies de biosynthèse de novo des purines et des pyrimidines aboutissent aux nucléotides triphosphates puriques (ATP, GTP) et pyrimidiques (UTP, CTP). Les nucléotides puriques sont également synthétisés par une voie dite de recyclage utilisant l'adénine et la guanine présents dans l'environnement intra- ou extracellulaire. C) Structure chimique de l'AICAR, de l'AMP et de ses dérivés ribosides.

A. Biosynthèse des purines et des pyrimidiques

1. Description des voies de biosynthèse *de novo* des purines et pyrimidiques

Afin de dupliquer son ADN, la cellule nécessite un approvisionnement important en bases azotées puriques (adénine et guanine) et pyrimidiques (thymine et cytosine). Les bases pyrimidiques sont composées d'un cycle de 6 atomes de carbone et d'azote. Les bases puriques sont la combinaison d'un cycle pyrimidique et d'un cycle de 5 atomes de carbones et d'azote (Fig. 2 A).

Deux voies de biosynthèse *de novo* intimement liées par des corégulations réciproques permettent de synthétiser les bases azotées (Fig. 2 B et C). Leur substrat commun est le R5P (Ribose-5-Phosphate) fourni par la voie des pentoses phosphates. Cette voie est approvisionnée par le premier intermédiaire de la glycolyse, le G6P (Glucose-6-Phosphate). Le R5P est alors métabolisé en PRPP (5-phosphoribosyl- α -1-pyrophosphate).

A partir du PRPP, les bases puriques sont formées grâce à un ensemble d'étapes successives (Fig. 2C). Une des dernières étapes de la voie permet le clivage du métabolite sZMP (Succinyl ZMP) par l'enzyme ADSL (ADenyloSuccinate Lyase) en ZMP et fumarate (Fig. 2 C). Le ZMP est ensuite métabolisé par l'ATIC (5-Aminoimidazole-4-Carboxamide Ribonucleotide Formyltransferase) en IMP (Inosine MonoPhosphate). Deux voies distinctes utilisent l'IMP pour synthétiser l'AMP et le GMP (Adénosine et Guanosine MonoPhosphates, respectivement) qui seront ensuite convertis en formes di- et triphosphates (ADP, ATP, GDP et GTP) (Fig. 2 B et C). Une voie de recyclage participe aussi à cette synthèse en réactivant les bases azotées qui proviennent de la digestion des acides nucléiques.

En ce qui concerne la biosynthèse des pyrimidines, la structure primaire des bases, l'orotate, est formée avant sa réaction avec l'PRPP (Fig. 2 B). L'orotate est synthétisé en quatre étapes à partir des deux acides aminés, l'aspartate et le glutamine. Le PRPP et l'orotate conduisent à la formation d'UMP (Uridine MonoPhosphate) suivi par les formations successives d'UTP et de CTP (Uridine et Cytosine monophosphates, respectivement).

2. Régulations des voies de biosynthèse *de novo* des purines et des pyrimidines

Les besoins cellulaires en bases azotées sont très variables au cours du cycle cellulaire. Les concentrations en purines et pyrimidines doivent donc être finement régulées. Généralement, les produits finaux des voies de biosynthèse établissent un rétrocontrôle négatif sur leur propre production. Pour la voie de biosynthèse *de novo* des purines, l'adénosine et la guanosine Mono-, di- et TriPhosphates, respectivement, inhibent les deux premières enzymes métabolisant le R5P et le PRPP (R5P pyrophosphokinase et glutamine PRPP amidotransférase) (Fig. 3 A). La métabolisation de l'IMP est directement inhibée par les produits AMP et le GMP (Fig. 3 A). Un rétrocontrôle négatif est aussi

présent pour la voie de biosynthèse *de novo* des pyrimidines : l'UDP et l'UMP inhibent la première enzyme de la voie (Carbamoyl phosphate synthetase) (Fig. 3 B).

Afin d'assurer l'équilibre entre le GMP et l'AMP, les flux de transformation de l'IMP vers l'AMP ou le GMP sont contrôlés respectivement par le GTP ou l'ATP (Fig. 3 A). L'ATP est aussi un substrat de la première étape de la voie de biosynthèse des pyrimidines (Fig. 3 B). Ainsi, la synthèse des pyrimidines est régulée par les produits finaux de la voie des purines. Le PRPP, métabolite commun aux deux voies, régule positivement les premières étapes des voies de biosynthèse *de novo* des purines et des pyrimidines (Fig. 3). Ainsi, ces corégulations permettent d'obtenir un équilibre entre les différentes bases azotées nécessaire au bon fonctionnement cellulaire tel que pour la synthèse d'ADN.

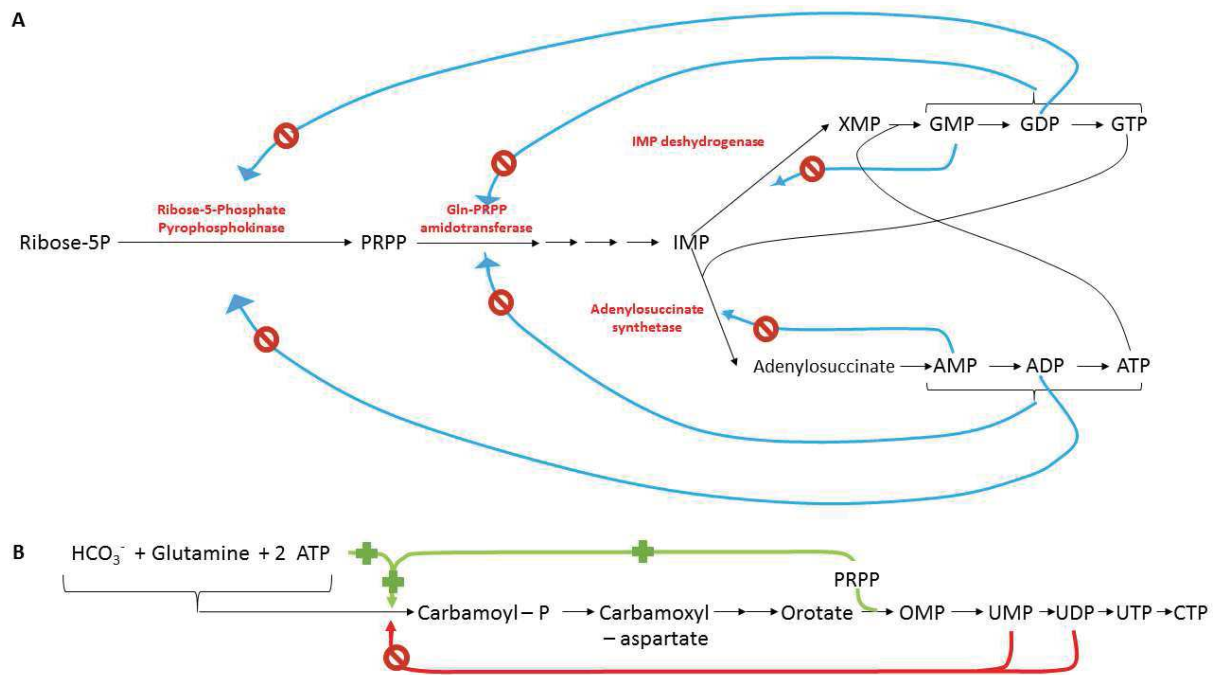


Figure 3 : Mécanismes de régulation de la voie de biosynthèse des purines et des pyrimidines.

A) La voie de biosynthèse *de novo* des purines. Les flèches bleues en pointillés correspondent aux rétrocontrôles négatifs exercés par les quatre produits (GMP, GDP, AMP, ADP) sur quatre enzymes distinctes (R5P pyrophosphokinase, glutamine PRPP amidotransférase, IMP deshydrogénase et adenylosuccinate synthétase) de la voie. B) La voie de biosynthèse *de novo* des pyrimidines. Les flèches rouges correspondent aux rétrocontrôles négatifs exercés par les produits UDP et UTP sur l'enzyme Carbamoyl phosphate synthetase. Les flèches vertes correspondent à l'activation de cette enzyme à la fois par l'ATP et le PRPP. Ces différentes régulations permettent d'équilibrer à tout moment la balance existant entre les purines et les pyrimidines et de répondre ainsi aux besoins cellulaires.

3. Les métabolites ZMP et sZMP comme régulateurs

En plus de leur simple rôle d'intermédiaires métaboliques, le ZMP et le sZMP sont des molécules régulatrices chez la bactérie, la levure et les mammifères.

Chez la bactérie *Thermosinus carboxydvorans*, le ZMP régule l'expression d'enzymes de la voie de biosynthèse *de novo* des purines ¹. Ce métabolite peut se fixer sur un motif de structure secondaire

d'ARNm. La structure est ensuite modifiée lors d'un mécanisme nommé « riboswitch », ce qui permet l'activation de la transcription. Cette régulation de la transcription fait du ZMP un régulateur majeur du métabolisme du carbone et des purines ¹.

Chez la levure *S. cerevisiae* (*Saccharomyces cerevisiae*), un autre niveau de régulation des enzymes du métabolisme a été mis en évidence et implique l'utilisation des intermédiaires métaboliques de la voie *de novo* des purines sZMP et ZMP ². Ces deux molécules stimulent l'interaction des facteurs de transcription Pho2, Pho 4 et Bas1 impliqués dans la régulation des voies de biosynthèse *de novo* des purines et d'utilisation du phosphate. La corégulation des deux voies permet de répondre aux besoins cellulaires en bases puriques.

Ainsi, le ZMP et le sZMP sont des molécules régulatrices chez les procaryotes et les eucaryotes unicellulaires. L'effet du ZMP à des concentrations endogènes n'a pas été démontré chez les mammifères. Cependant, plusieurs éléments laissent penser que des rôles régulateurs du ZMP et de son précurseur immédiat sZMP existent également :

- Le sZMP interagit avec la PKM (Pyruvate Kinase d'isoforme M) et module son activité ^{3,4}. Cependant, certaines des conclusions de ces auteurs concernant l'activité protéine kinase de la PKM ont été récemment remises en question ⁵.
- L'accumulation de ZMP aboutit à la régulation de certaines enzymes telles que la glucokinase et la glycogène phosphorylase ^{6,7}. Dans certains cas, une interaction directe avec l'AICAR a été documentée. C'est le cas pour la phosphofructokinase (PFK) et la fructose-1,6-biphosphatase (F1,6-BPase) qui sont inhibés *in vitro* par l'AICAR ^{6,8}.
- Le ZMP fixe la protéine UBA1 (Ubiquitin Like Modifier Activating Enzyme 1), conduisant ainsi à une modulation de la protéostasie cellulaire ^(Puyo et al., en cours de publication). Comme UBA1, plusieurs protéines de levures et leurs orthologues chez la souris et l'homme fixent le ZMP couplé sur colonne d'affinité (données du laboratoire non publiées). Ces éléments nous suggèrent que le ZMP pourrait se fixer également *in vivo* à des protéines et modulerait ainsi leurs activités.
- Les taux cellulaires de ZMP changent suite à un stress hypoglycémique sur des cellules humaines en culture (Michel MOENNER ; communications personnelles). De manière intéressante, un pic de ZMP apparaît durant le développement du Xénope (*Xenopus laevis*) sans que la cause ne soit encore connue (Maelle DUPERRAY ; communications personnelles).

L'homéostasie du métabolisme est donc permise par des régulations intra ou inter-voies métaboliques telle que le rétrocontrôle négatif et la régulation des voies purique, pyrimidique et du phosphate par le sZMP et le ZMP. Cette hétérogénéité de régulations montre que, au cours de l'évolution, la cellule a su assimiler tous les signaux utiles afin de maintenir son homéostasie.

Ainsi, le ZMP s'inscrit comme molécule régulatrice centrale du métabolisme chez la levure et la bactérie ². Bien que ce rôle endogène soit peu connu chez les mammifères, l'accumulation de ZMP a de nombreux effets détaillés dans le paragraphe suivant.

B. L'accumulation du ZMP et ses effets chez les mammifères

Les effets du ZMP à concentrations physiologiques sont encore peu étudiés chez les mammifères. Par contre, l'accumulation de ce métabolite a de nombreuses propriétés dont certaines sont détaillées dans ce paragraphe.

Afin d'accumuler le ZMP intracellulaire, le métabolite est ajouté de manière exogène sous sa forme non phosphorylée AICAR (AICA riboside) (Fig. 2 B). Nous avons pu établir que l'AICAR entrait dans la cellule *via* différents transporteurs de nucléosides⁹(article 1 de ce manuscrit) puis était phosphorylé par l'adénosine kinase (ADK) en ZMP¹ (Fig. 4). Le ZMP ainsi accumulé a de nombreux effets dont leur étude fait l'objet de ma thèse.

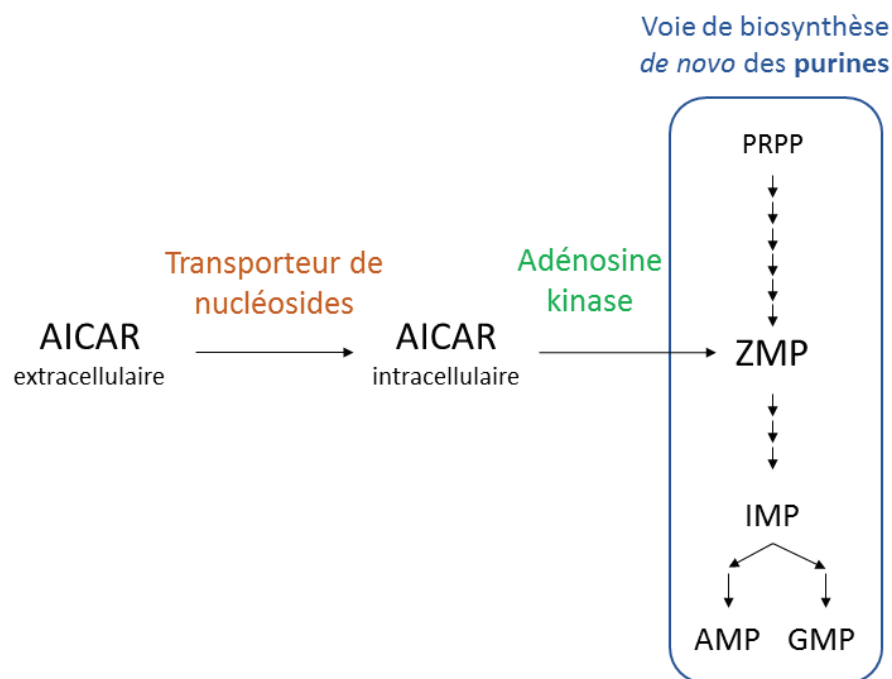


Figure 4 : Transport et métabolisation de l'AICAR exogène.

L'AICA riboside est ajouté dans le milieu de culture cellulaire. Son entrée est permise grâce aux transporteurs de nucléosides et sa métabolisation en ZMP par l'adénoside kinase.

1. Le ZMP est une molécule anti tumorale aux effets multiples.

L'AICAR présente des propriétés antitumorales décrites par de nombreuses approches reportées ci-dessous.

a. La culture de lignées cellulaires

Le traitement à l'AICAR altère la viabilité de cellule en culture. Les sensibilités à l'AICAR varient d'un facteur 1000 selon le type de cellule cancéreuse (IC50 de l'ordre du μM jusqu'au mM) (source: <http://www.cancerrxgene.org/translation/Drug/1001>). Nous avons montré au laboratoire que les IC50 sont effectivement différents sur une quinzaine de lignées cellulaires humaines et murines incluant des cellules de carcinomes (A431, A549, HCT116, HT29, Hela, MCF.7) des lignées d'hépatome (EpG2, Huh7), des lignées tumorales de glioblastomes (SF188, SF126, U87, NHA/TS), les lignées épithéliales non transformées (MDCK, RPE-1) et enfin des lignées fibroblastiques embryonnaires (MEFs). Une origine possible de la différence d'IC50 pourrait être expliquée par la différence d'efficacité d'entrée d'AICAR et de sa conversion en ZMP ⁹(article 1 de ce manuscrit).

L'origine de cette baisse de viabilité cellulaire n'est pas entièrement connue. Au niveau cellulaire, il est observé que l'AICAR entraîne le ralentissement du cycle cellulaire et une induction de la mort cellulaire.

L'effet de l'AICAR sur le cycle cellulaire est variable selon le type de lignée étudiée. Le traitement à l'AICAR de différents types cellulaires conduit un arrêt en phase G1 ¹⁰⁻¹². D'autres auteurs rapportent un arrêt en phase S ¹³⁻¹⁷.

En étudiant ainsi le cycle cellulaire, certains auteurs ont mis en évidence l'accumulation des cellules en phase pré G1 correspondant à la mort cellulaire ^{13,16}. Plus précisément, la cytotoxicité de l'AICAR passe par l'apoptose dans certains modèles cellulaires ¹⁵⁻¹⁹. Cependant, certains auteurs montrent que l'apoptose n'est pas à l'origine de la cytotoxicité de l'AICAR ^{20,21}. En effet, dans un modèle de LMC (Leucémie Myéloïde Chronique), l'AICAR induit la mort des cellules par autophagie ²¹. Ainsi, chaque lignée cellulaire répond différemment au traitement à l'AICAR ce qui expliquerait les écarts d'IC50. Dans une perspective de thérapie anti-cancéreuse, le type de cancer devra être pris en compte pour l'utilisation de l'AICAR ou d'une molécule dérivée.

Sur un modèle de carcinome cervical les cellules Hela, l'AICAR provoque à de faibles concentrations un ralentissement du cycle cellulaire en phase S sans effet sur la mort cellulaire et à forte concentration, l'apoptose sans conséquence sur le cycle cellulaire ¹⁶. Ce cas illustre clairement les différents effets cellulaires en fonction de la concentration d'AICAR entraînant sa cytotoxicité.

L'entrée dans la cellule de l'AICAR conduit à sa phosphorylation en ZMP. Cependant, l'accumulation de cet intermédiaire métabolique entraîne une mauvaise régulation du flux des voies de biosynthèse des purines et des pyrimidines ^{17,22}. Le ratio entre les bases azotées est déstabilisé avec une augmentation des bases puriques et une diminution des bases pyrimidiques ²². Certains auteurs montrent une corrélation entre la cytotoxicité de l'AICAR et la dérégulation de la balance en nucléotides cellulaire ^{17,22,23}. Plus précisément, Bardeleben *et al.* montrent que l'induction de l'apoptose par l'AICAR est la conséquence de la déstabilisation des concentrations en bases puriques et pyrimidiques.

L'effet cytotoxique de l'AICAR peut être donc médié par différents mécanismes selon la concentration d'AICAR et la lignée cellulaire utilisée.

b. L'aneuploïdie, caractéristique tumorale ciblée par le ZMP

L'aneuploïdie caractérise une cellule dont le nombre de chromosome n'est pas un multiple exacte du nombre haploïde de chromosome (Fig. 5).

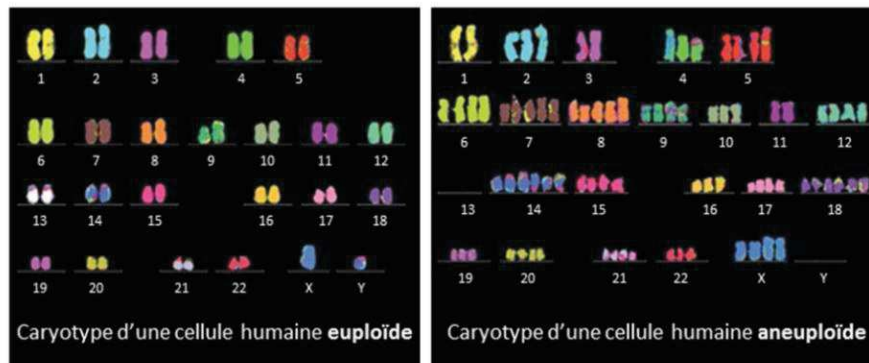


Figure 5 : L'aneuploïdie caractérise une cellule dont nombre de chromosome n'est pas un multiple exacte du nombre haploïde de chromosome.

A gauche, le caryotype d'une cellule humaine euploïde. A droite, le caryotype d'une cellule humaine euploïde.

Il existe une multitude de cancers pouvant se développer à partir de presque tous les tissus. Chacun possède ses propres caractéristiques. Au sein même d'un cancer, plusieurs types de cellules tumorales peuvent exister. Cette grande variabilité tumorale est observée au niveau génétique, épigénétique, cellulaire. Ceci explique l'hétérogénéité de réponse aux traitements anti-tumoraux.

Au regard de cette complexité, les mécanismes modulés dans la majorité des cellules tumorales sans être affectés chez les cellules normales pourraient représenter la cible de stratégie antitumorale efficace. Dans ce sens, 90% des tumeurs solides et 75% des cancers hématopoïétiques sont aneuploïdes alors que cette caractéristique est rare dans les tissus normaux ²⁴.

Ainsi, A. Amon et ses co-auteurs ²⁵ ont cherché en 2011 à identifier des composés ciblant spécifiquement les cellules aneuploïdes tout en ayant peu d'effet sur les cellules euploïdes. Ils ont ainsi identifié deux composés comme étant des molécules antitumorales ayant un effet plus important sur les cellules aneuploïdes: le 17-AAG, inhibiteur du repliement des protéines, et l'AICAR. Cet effet a été validé en culture cellulaire mais aussi chez la souris grâce à des xénogreffes de cellules euploïdes et aneuploïdes ²⁴.

Le laboratoire a confirmé cet effet pour l'AICAR (Puyo *et al.*, en cours de publication). Pour ce faire, quatre lignées cellulaires ont été utilisées : des lignées issues de cellules de rétine pigmentaires humaines euploïde (RPE-1) et trisomique pour le chromosome 21 (RPE-1 21/3), ainsi que les lignées issues d'un carcinome de colon euploïde (HCT116) et trisomique pour le chromosome 5 (HCT116 5/3) ²⁶. Les lignées trisomiques ont été générées par la micro fusion de noyau à partir de leur parent euploïde. De par leur fond génétique identique, ces lignées tumorales sont de bons modèles d'études de l'aneuploïdie puisque la lignée trisomique peut être comparée à la lignée euploïde. Le laboratoire a confirmé l'effet cytotoxique de l'AICAR plus important sur les deux lignées aneuploïdes par rapport à leur lignée contrôle euploïde. Or, la surexpression d'UBA1, ubiquitine ligase, abolit cette hypersensibilité à l'AICAR et cette enzyme fixe l'AICAR sur colonne d'affinité. On peut donc suggérer que l'AICAR serait plus cytotoxique sur les cellules aneuploïdes en fixant et inhibant UBA1.

L'hypothèse actuelle est que le ZMP en se fixant à UBA1 amplifierait la saturation des voies de repliement protéique déjà importante pour les cellules aneuploïdes. En effet, les cellules aneuploïdes sont en permanence en état de stress protéotoxique, du au déséquilibre protéique provoqué par les chromosomes surnuméraires (Fig. 6). La surexpression d'UBA1 permettrait ainsi de pallier à cette saturation. De plus, l'étude précédemment citée de Ly *et al.* montre que l'effet antitumoral de l'AICAR est plus important pour un lignée trisomique par rapport au contrôle euploïde ²⁷. Cette cytotoxicité passerait par l'internalisation du récepteur à l'EGF puis son adressage au protéasome par l'ubiquitination.

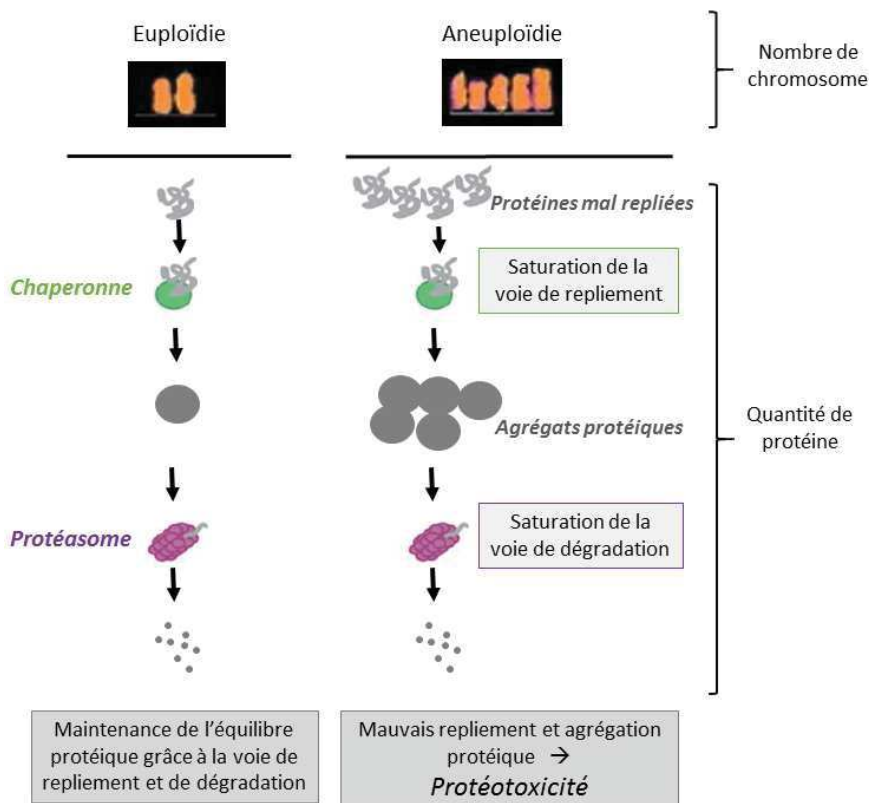


Figure 6 : Stress protéotoxique des cellules aneuploïdes.

Le déséquilibre protéique produit par l'aneuploïdie conduit à une saturation des chaperonnes et du protéasome. Les voies de repliement et de dégradation des protéines n'assurent plus entièrement leur rôle de « contrôle qualité » des protéines ce qui entraîne l'apparition de protéines mal repliées et d'agrégaions protéiques. On parle de stress protéotoxique ou protéotoxicité.

Actuellement, l'effet antitumoral de l'AICAR plus important sur les cellules aneuploïdes serait donc expliqué par son action sur la voie de dégradation des protéines, et plus précisément sur la voie de l'ubiquitine, ce qui n'exclut que l'AICAR touche d'autres voies caractéristiques des cellules aneuploïdes.

c. L'utilisation de biopsie de patient.

Campas *et al.* ont mené une étude sur des cellules de patient atteints de LLC-B (leucémie lymphoïde chronique de type B). Ce type de cancer est caractérisé par un défaut de la mort cellulaire programmée entraînant l'accumulation de lymphocyte B. Le traitement à l'AICAR engendre l'apoptose des lymphocytes B tumoraux alors que ce n'est pas le cas pour les lymphocytes T normales des mêmes patients. Ces résultats sont prometteurs dans le cadre d'une thérapie ciblée pour la LLC-B.

Le LCM (Lymphome à Cellules du Manteau) est une tumeur particulièrement insensible aux thérapies classiques. La combinaison de l'AICAR et de rituximab (anticorps monoclonal chimérique dirigé contre la molécule de surface CD20) a été testée sur des échantillons de sang de patients atteints de ce type de lymphome. L'association des effets de ces deux drogues montre une augmentation de l'inflammation, du déséquilibre du métabolisme, de l'apoptose et de la prolifération entraînant une cytotoxicité importante ²⁸.

Ces études montrent le potentiel cytotoxique de l'AICAR sur les cellules tumorales des LLC-B par rapport aux lymphocytes T normaux mais aussi sur les cellules tumorales du LCM, insensibles aux thérapies classique. Bien qu'aucune étude sur des cellules issues de biopsies de patients atteints de tumeurs solides, l'AICAR paraît efficace sur les tumeurs liquides et plus particulièrement les lymphomes.

d. L'expérimentation animale

Afin de valider ces effets sur l'organisme entier, Montraveta *et al.* ont injectés les lignées primaires issues de LCM à des souris immunodéprimées ²⁸. Ces xénogreffes ont été effectuées en sous cutanées afin de comparer visuellement l'évolution de la tumeur sans traitement *versus* avec traitement à l'AICAR. Les résultats montrent que le traitement à l'AICAR entraîne une diminution significative de l'évolution de la tumeur. L'utilisation du rituximab a le même effet antitumoral. La combinaison des deux molécules potentialise cet effet antitumoral conduisant à une inhibition presque totale de l'apparition de tumeur ²⁸.

D'autres équipes ont effectué des injections sous cutanées de cellules tumorales chez les rongeurs. Après l'injection de cellules C6 gliales, Rattan *et al.* ont montré que la taille de la tumeur est diminuée de 50% avec un traitement à l'AICAR ¹⁴. De plus, l'équipe de Guo *et al.* a montré que le traitement à l'AICAR diminue de 40% la croissance de tumeur sous cutanée suite à une xénogrefe de U87/EGFRvIII (U87 exprimant la mutation EGFRvIII, forme constitutivement active de l'EGFR ou Epidermal Growth Factor Receptor) ²⁹. La mutation de ce récepteur est fortement oncogénique dans de nombreux cas de cancer tel que le glioblastome. Par contre, aucun effet anti-prolifératif n'est observé sur les xénogreffes issues de U87 sauvages. L'équipe dirigée par A. Amon a montré un potentiel antitumoral de l'AICAR sur les xénogreffes de 2 types cellulaires pour 6 utilisés au total. Cet effet est potentialisé avec l'utilisation du composé 17-AAG (inhibiteur du repliement des protéines).

Ces études montrent que l'AICAR est antitumoral à l'échelle de l'organisme et que cet effet dépend du type cellulaire.

e. L'essai clinique

Une étude en phase clinique I/II a été menée sur des patients atteints de leucémies lymphoïdes chroniques résistants aux thérapies courantes. L'acadésine (nom pharmacologique de l'AICAR), utilisée à des concentrations sûres et tolérées, permet la diminution de la taille des ganglions lymphatiques et de la quantité des cellules de leucémies lymphoïdes chroniques périphériques ³⁰. Au vu des résultats

variables entre les différents types tumoraux, des essais cliniques doivent être menés sur d'autres types de tumeur dont les données en culture cellulaire et *in vivo* montrent un effet anti-prolifératif.

L'ensemble de ces résultats montre que l'AICAR a un haut potentiel anti tumoral. La compréhension de ces mécanismes d'action est nécessaire pour mieux appréhender cette molécule avant une éventuelle utilisation chez l'Homme.

2. Le ZMP active l'AMPK en mimant l'AMP.

Le ZMP possède une structure chimique très similaire à l'AMP (Fig. 2 B). De ce fait, beaucoup des effets imputés au ZMP sont considérés comme étant directement liés à un effet « AMP-mimétique » du ZMP. Par exemple que le ZMP est capable de mimer l'effet activateur de l'AMP sur une enzyme essentielle du métabolisme, l'AMPK³¹. Ainsi, le ZMP est utilisé depuis une vingtaine d'années en tant qu'activateur exogène de l'AMPK afin d'étudier les processus régulés par cette enzyme.

L'AMPK est une enzyme fondamentale à l'échelle cellulaire comme à l'échelle de l'organisme.

a. A l'échelle cellulaire

L'AMPK est une enzyme hétérotrimérique très conservée chez les eucaryotes. Elle est constituée d'une sous unité catalytique α et de deux sous unités régulatrice β et γ ayant chacune de multiples isoformes ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$ et $\gamma 3$). L'expression des différentes combinaisons dépend du tissu d'origine. Cette enzyme allostérique est un senseur de l'énergie cellulaire permettant de maintenir l'homéostasie énergétique. Pour ce faire, l'AMPK stimule les voies cataboliques productrices d'ATP et inhibe les voies anaboliques qui en consomment.

Une déstabilisation de l'énergie cellulaire générée par différents stress comme le déséquilibre métabolique ou un composant xénobiotique augmente les ratios AMP/ATP et ADP/ATP. La fixation de l'AMP ou du ZMP sur la sous unité γ entraînent une activation allostérique de l'AMPK. L'AMP et l'ADP peuvent aussi se fixer sur un autre site de la sous-unité γ et ainsi protègent l'enzyme de la déphosphorylation³². S'en suit une modification de la structure de l'AMPK permettant sa phosphorylation sur la Thréonine-172 par 3 kinases : liver kinase B1 (LKB1), calcium-/calmodulin-dependent kinase kinase 2 (CaMKK2); TGF β -activated kinase 1 (TAK1)^{33,34}. *A contrario*, quand la cellule est riche en énergie, l'ATP se fixe sur la sous-unité γ de l'AMPK empêchant sa phosphorylation³². Depuis une dizaine d'année, certains auteurs mettent en évidence l'existence de kinases telles qu'AKT, la PKC (protéine kinase C) modulant l'activité de l'AMPK *via* d'autres sites de phosphorylation de la sous-unité γ ^{33,34}. Des mécanismes différents tels que l'ubiquitination, la sumoylation, l'oxydation/réduction peuvent aussi réguler l'enzyme. Ces nombreux facteurs permettent de réguler plus finement cette enzyme cellulaire fondamentale.

L'équilibre de l'énergie cellulaire étant essentiel pour toutes les fonctions, cette enzyme sérine thréonine kinase a de nombreux rôles. En effet, l'AMPK régule le métabolisme des lipides en inhibant la synthèse *de novo* des acides gras, du cholestérol et des triglycérides et en activant l'entrée des acides gras dans la cellule et leur β oxydation. L'AMPK module aussi le métabolisme des glucides en activant la glycolyse et l'entrée du glucose dans la cellule ainsi qu'en inhibant la synthèse du glycogène. De plus, la synthèse de protéine est diminuée afin de conserver l'énergie nécessaire à leur fabrication. Pour finir, la stimulation de la biogénèse mitochondriale permet, à long terme, d'augmenter la capacité du catabolisme oxydatif du glucose et des acides gras. L'AMPK agit ainsi sur ces voies métaboliques en régulant directement certaines protéines ou alors en modifiant la transcription ou/et la traduction de ses cibles. Cette régulation du métabolisme permet de libérer de l'énergie sous forme d'ATP.

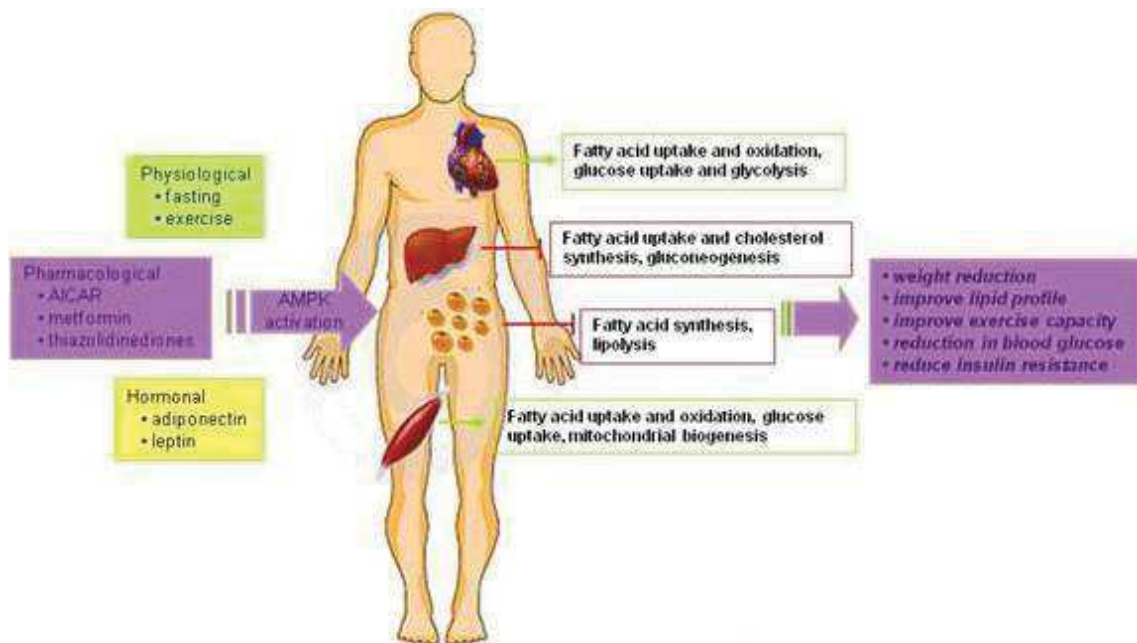


Figure 7 : L'AMPK, une cible thérapeutique pour les maladies du métabolisme.

L'activation physiologique de l'AMPK (exercices physiques, signal hormonal) aboutit à la régulation de différentes voies métaboliques. L'AMPK a donc fait l'objet d'étude afin de l'utiliser comme cible de traitements pour les maladies métaboliques. L'activation de l'AMPK par des agents pharmacologiques (AICAR, metformin, thiazolidinediones) permet de prévenir et de traiter les anomalies métaboliques. L'AMPK a plusieurs effets importants sur le métabolisme en mimant les effets bénéfiques de l'exercice physique, incluant la modulation du métabolisme des lipides, l'augmentation de l'assimilation du glucose par les muscles, l'augmentation de la biogénèse de la mitochondrie, l'augmentation de la sensibilité à l'insuline et la réduction de la concentration du glucose sanguin. L'AICAR est reconnu comme agent dopant par l'AMA. Illustration issue du laboratoire INSERM U567 de B. Viollet.

b. A l'échelle de l'organisme

Chez les mammifères, le rôle de l'AMPK ne se limite pas à une régulation de l'homéostasie énergétique cellulaire mais régule aussi l'homéostasie de l'organisme entier (Fig. 7).

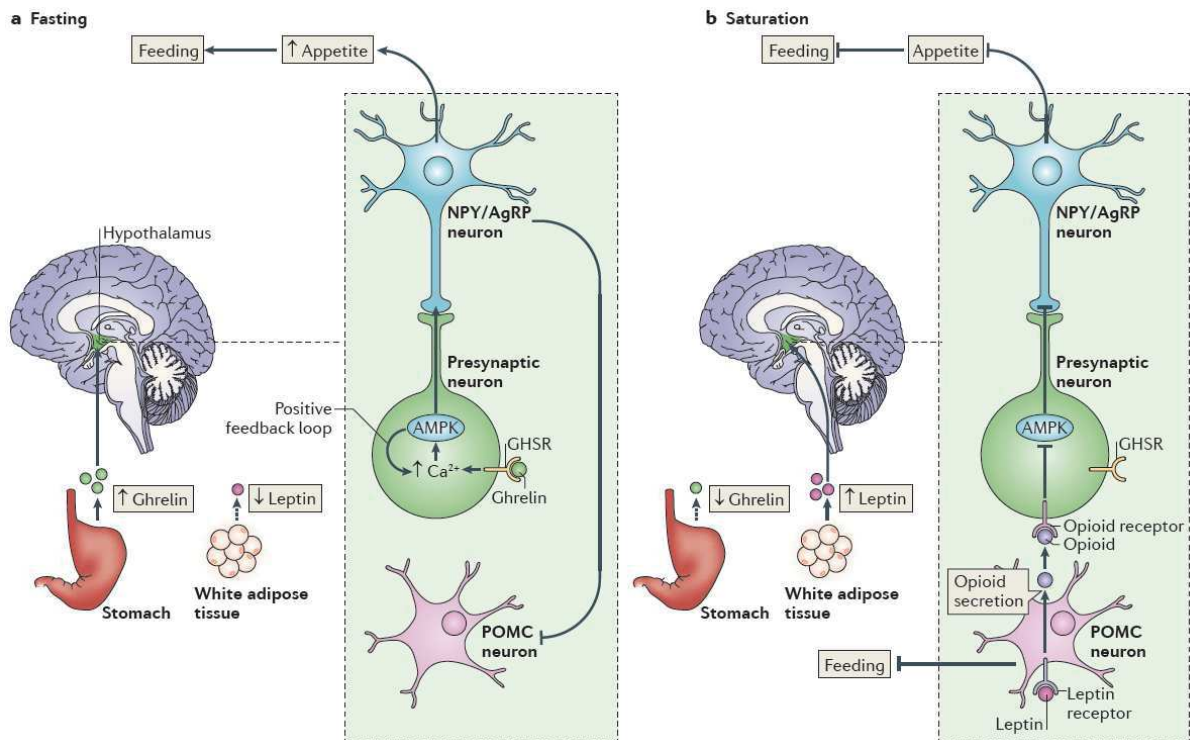


Figure 8 : L'AMPK régule le comportement alimentaire au niveau de l'hypothalamus.

Régulation du comportement alimentaire par la modulation des neurones NPY/AgRP (neurones exprimant le NeuroPeptide Y et l'Agouti Related Protein) et POMC (neurones Pro-OpiomélanoCortine) grâce à l'AMPK. a) Dans les stades précoces, la ghréline, « hormone de la faim » synthétisée par l'estomac, active l'AMPK dans les neurones présynaptiques en agissant en amont des neurones via la voie CaMKK2. Cette voie entraîne un relargage de Ca²⁺ des réserves intracellulaires ce qui permet d'obtenir une boucle de rétrocontrôle positif activant continuellement le relargage du neurotransmetteur dans les neurones NPY/AgRP même si la stimulation de la ghréline cesse. Les neurones NPY/AgRP entraînent alors la sensation de faim et inhibent les neurones POMC. b) La faim continue jusqu'à ce que les neurones POMC soient stimulés par l'« hormone de satiété », la leptine. L'activité de ces neurones inhibe la faim et entraîne le relargage de opioïdes qui inhibe l'AMPK dans les neurones présynaptique en amont des neurones NPY/AgRP. Ces neurones présynaptiques sont alors inactivés. Illustration issue de *Hardi et al.* ³⁴

L'AMPK est impliquée dans le contrôle de la satiété et de la faim au niveau de l'hypothalamus (Fig. 8). Cette région du cerveau joue un rôle central dans l'homéostasie énergétique de l'organisme en régulant la prise alimentaire et la dépense énergétique. Ainsi, l'activité de l'AMPK hypothalamique varie avec le statut nutritionnel, l'AMPK étant activée à jeun et inhibée en période de satiété ³⁵. Différentes hormones connues pour être modulées par l'état nutritionnel régulent l'activité de l'AMPK. Ainsi, la ghréline, hormone produite par l'estomac, active l'AMPK et induit la prise alimentaire alors que la leptine produite par le tissu adipeux agit de manière opposée ^{35,36}. De même, la surexpression hypothalamique d'une forme constitutivement active de l'AMPK chez la souris conduit à une augmentation sensible de sa prise alimentaire. A l'inverse, l'expression d'une forme inactive de l'AMPK ou l'injection intra-hypothalamique de composé C, un inhibiteur de l'AMPK, entraînent l'effet inverse ^{35,37}. Ces résultats montrent que l'AMPK hypothalamique constitue une cible commune à de nombreux facteurs affectant le comportement alimentaire.

Néanmoins, l'AMPK est régulée de façon différente dans l'hypothalamus et les tissus périphériques. Par exemple, la leptine active l'AMPK dans le muscle squelettique et l'inhibe dans l'hypothalamus, ce qui suggère que les mécanismes de régulation impliqués sont différents.

Au niveau du muscle squelettique, l'AMPK orchestre la reprogrammation métabolique afin que le muscle produise l'énergie nécessaire à l'organisme lors d'exercices physiques³⁸⁻⁴⁰ (Fig. 7). En effet, la réponse métabolique à l'AICAR, activateur de l'AMPK, est très similaire à celle produite par une contraction musculaire⁴¹. Une étude publiée en 2008 montre que l'administration quotidienne d'AICAR durant 4 semaines à des souris sédentaires induit, *via* l'activation de l'AMPK, une reprogrammation génétique modifiant les flux métaboliques³⁹. Ceci aboutit à une augmentation de la masse musculaire et une diminution de la masse adipeuse. L'endurance augmente alors de 44% sans exercice physique. Cette étude conduit à l'utilisation de l'AICAR comme produit dopant dans le monde du sport, particulièrement du cyclisme, ce qui aboutit à l'interdiction de ce métabolite par l'Agence Mondiale Antidopage (AMA).

3. Le ZMP ne cible pas seulement l'AMPK

Les effets anti-tumoraux de l'AICAR sont expliqués par le rôle mimétique du ZMP sur l'AMPK. Cette enzyme ainsi activée ralentit la croissance tumorale par le blocage des voies anaboliques (acide gras, cholestérol, triglycérides, ARNs et protéines) nécessaires à la prolifération. En effet, l'activation de l'AMPK par le traitement à l'AICAR inhibe la lipogénèse et la synthèse de protéine par l'inhibition des enzymes ACC (Acétyl CoA Carboxylase) et HMG-CoA (3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA réductase) dans un modèle de glioblastome les U87²⁹. En dehors de son rôle sur le métabolisme, l'AMPK agit aussi sur d'autres fonctions telles que le cycle cellulaire. Ainsi, cette enzyme permet un ralentissement du cycle avec l'augmentation de l'expression de p21, p27¹² et p53, l'inhibition la voie de signalisation PI3K-Akt¹⁴, la phosphorylation de Rb (retinoblastoma protéine) ainsi que la diminution de l'expression de la cyclin A¹⁰. De plus, la stabilisation de p27 induit l'autophagie.

La majorité des études menées sur l'effet antitumoral de l'AMPK utilisent l'AICAR comme activateur exogène de cette enzyme et assimilent hâtivement l'effet antitumoral de l'AICAR à celui de l'activation de l'AMPK. Cependant, plusieurs éléments suggèrent que l'effet antitumoral de l'AICAR est associé à des mécanismes cellulaires indépendants. Ces éléments sont comme suit :

a. Effet anti-prolifératif chez la levure *S. cerevisiae*

L'orthologue de l'AMPK, Snf1, serait activé non pas par l'AMP mais par l'ADP. De plus, Snf1 ne semble pas être affecté par l'accumulation de ZMP². Or, le ZMP étant toxique aussi pour cet organisme, nous pouvons penser que la toxicité de ce métabolite ne serait pas due à l'activation de l'AMPK mais à la modulation d'autres mécanismes indépendants.

b. Rôle discuté de l'AMPK dans l'effet cytotoxique de l'AICAR

Depuis moins de 10 ans, un nombre croissant de publications décrit les mécanismes de l'AICAR comme partiellement ou entièrement indépendant de l'AMPK. Sur des lignées cellulaires de leucémies lymphoïdes chroniques, l'effet cytotoxique de l'AICAR ne varie pas avec un *knock down* (kd) par shARN (*small interfering* ARN) de l'AMPK²¹. Pour le même type de cancer, une autre équipe a montré que l'AICAR induit l'apoptose indépendamment de p53 et de l'AMPK grâce à l'utilisation de MEFs (*mouse embryonic fibroblasts*) invalidées génétiquement pour ces protéines¹⁸. L'utilisation des MEFs ainsi mutés s'avère être un système robuste pour étudier les différents effets induits par l'AICAR. Aussi, le stress oxydatif, facteur de risque important dans carcinome hépato-cellulaire, est régulé négativement par le facteur de transcription Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2 related factor). Dans ce type de cancer, l'AICAR est un puissant modulateur du stress oxydatif. Cette molécule module l'état oxydatif *via* le facteur de transcription Nrf2 entraînant un effet cytotoxique et ce indépendamment de l'AMPK. Dans un modèle de glioblastome, les U87, l'AICAR diminue la croissance cellulaire indépendamment de l'AMPK grâce à l'augmentation de l'activité du protéasome dégradant ainsi CDC25c, protéine régulant l'entrée en mitose⁴². Ces deux dernières études sont menées grâce à l'utilisation de shARN dirigés contre l'AMPK. Toutes ces études montrent que l'accumulation de l'AICAR entraîne son effet cytotoxique indépendamment de l'AMPK.

c. Modulation directe de l'AICAR sur certaines enzymes

Plusieurs auteurs ont montré que l'AICAR module *via* une interaction directe deux enzymes du métabolisme : la PFK et la F1,6-BPase^{6,8}. En présence d'AICAR *in vitro*, l'AICAR interagit avec Hsp90 et de nombreuses protéines cibles de Hsp90 sont déstabilisées⁴³. Les deux enzymes PFK et Hsp90 sont impliqués lors d'étapes importantes de la croissance tumorale. Ainsi, les effets anti-prolifératifs de l'AICAR pourraient être dus à la modulation de ces enzymes. Cette notion a été validée pour certains types cellulaires¹⁴.

d. Chromatographie d'affinité sur colonne d'AICAR et d'AMP

Au laboratoire, des lysats protéiques issus de glioblastomes humains U87 ont été passés sur des colonnes d'affinité au ZMP. Le nombre de protéines retenues sur les colonnes et identifiées par spectrométrie de masse s'élève à environ 190 (données non publiées). En parallèle, des colonnes d'AMP ont été effectuées avec les mêmes lysats protéiques et 71 protéines ont été retenues. Le croisement des résultats donne seulement 24 protéines communes aux deux types de colonnes. Malgré les similitudes structurales AMP *versus* ZMP, les protéines retenues sur ces deux types de colonnes sont majoritairement différentes appuyant le fait que ces deux molécules ont des affinités distinctes.

L'affinité au ZMP ainsi que les liens fonctionnels avec la toxicité de l'AICAR ont été validés au laboratoire pour certaines protéines. Kap123, homologue de l'ImPortine 4 (IPO4) chez la levure, est un *binder* spécifique du ZMP. Sa surexpression permet de supprimer les effets de l'AICAR dans cet organisme (données non publiées). Il en est de même pour UBA1, *binder* spécifique du ZMP, dont la

sous expression augmente l'effet cytotoxique de l'AICAR pour deux modèles de cellules de mammifère mais aussi pour la levure ^(Puyo et al., en cours de publication). Des lysats protéiques issus de levures ont été passés sur des colonnes d'affinité au ZMP de la même manière que les cellules de mammifère. La conservation des *binders* du ZMP chez la levure et les mammifères est un argument important qu'en à l'existence *in vivo* de cette fixation *binder*/ZMP ainsi que son rôle dans la toxicité de l'AICAR. En effet, les deux cibles étudiées au laboratoire, Kap123 et UBA1, sont présentes sur les colonnes de levures et de mammifères.

Ces résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle l'effet antitumoral de l'AICAR peut être médié par des cibles AMPK-indépendantes.

C. But de la thèse

Des effets anti-prolifératifs sont observés suite à l'accumulation d'AICAR (5-amino-1-β-D-ribofuranosyl-imidazole-4-carboxamide monophosphate), intermédiaire métabolique de la voie de biosynthèse des purines. Dans la littérature, ces effets sont principalement attribués à l'AMPK, cible directe de l'AICAR. Or, plusieurs éléments nous permettent d'affirmer que les effets cytotoxiques induits par l'ajout d'AICAR ne peuvent pas être attribué exclusivement à l'activation de l'AMPK (Fig. 9). D'autres cibles seraient également impliquées dans ce phénomène.

Le premier objectif de ma thèse a été de confirmer que l'effet antitumoral de l'AICAR n'est pas seulement expliqué par l'activation de l'AMPK mais par l'existence d'une (autres) cible(s) ⁹ (article 1). Le deuxième objectif a été de mettre en évidence une(des) fonction(s) modulée(s) par l'AICAR.

Problématique

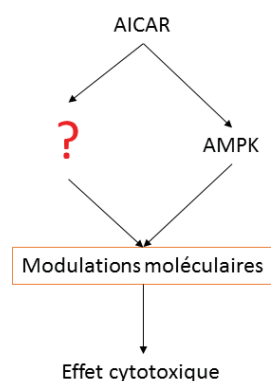


Figure 9 : L'effet cytotoxique de l'AICAR est-t-il dépendant de l'AMPK ?

Les effets de l'ajout d'AICAR sont majoritairement attribués à l'activation de l'AMPK. Or, plusieurs éléments confirment l'existence d'autres cibles responsables de l'effet cytotoxique de l'AICAR.

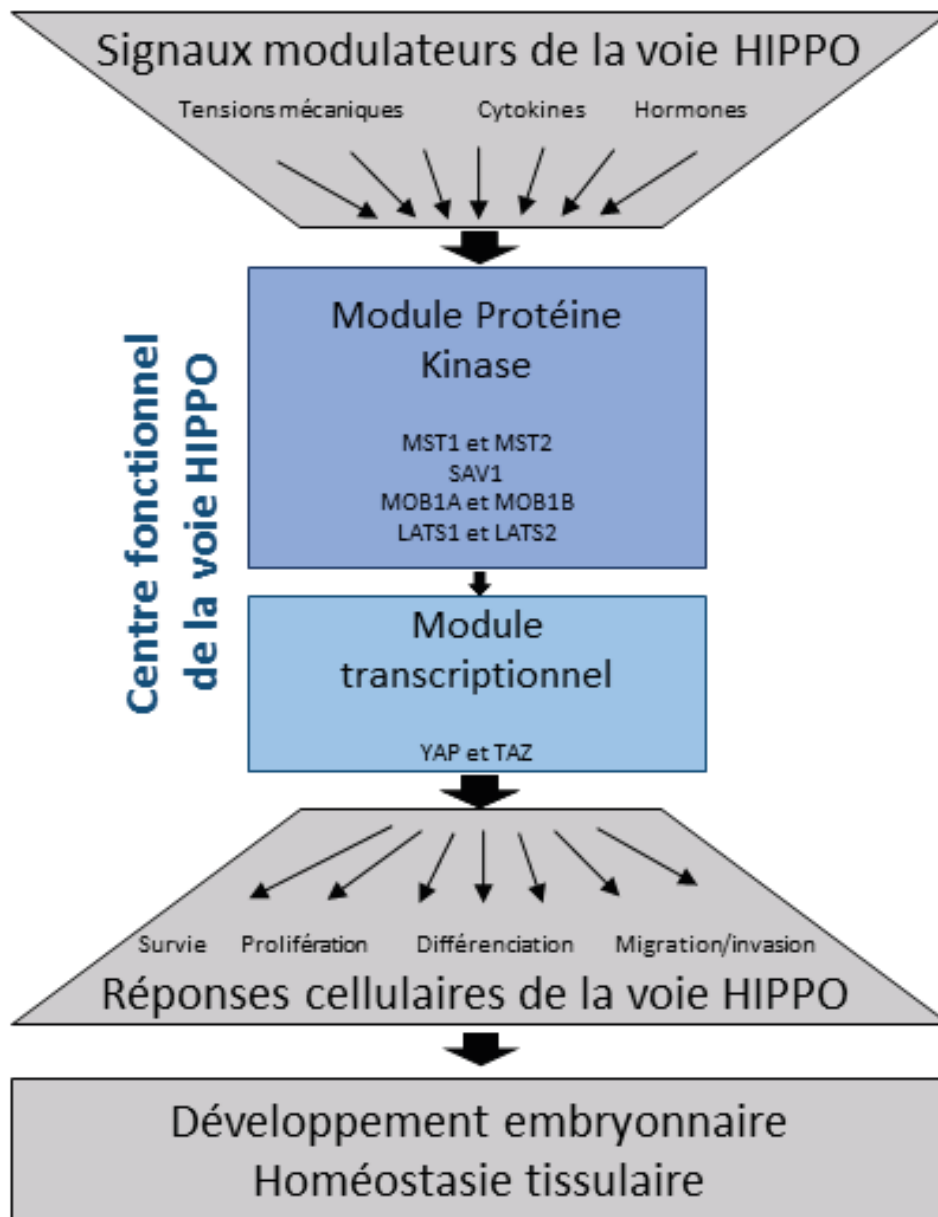


Figure 10 : La voie HIPPO est une « boîte » centralisant et envoyant des signaux.

Les signaux régulant la voie HIPPO convergent vers le centre fonctionnel de la voie HIPPO comprenant le module protéine kinase et le module transcriptionnel. Le module protéine kinase régule le module transcriptionnel, responsable de la transcription d'un grand nombre d'ARN impliqués dans la survie cellulaire, la prolifération, la différenciation, la migration et l'invasion cellulaire. Ces réponses cellulaires sont fondamentales pour le développement embryonnaire et l'homéostasie tissulaire.

II. Partie 2 – La voie HIPPO

Les biologistes du développement se demandent comment se limite la prolifération cellulaire. Le terme « limité » plutôt que « proliféré » est volontairement utilisé. Il est déjà établi que les organismes unicellulaires doivent être stimulés pour proliférer. Cette prolifération est seulement limitée par la quantité d'éléments nutritifs. Avec l'arrivée des organismes multicellulaires, les cellules acquièrent la capacité à freiner leur croissance et leur division en réponse à des signaux venant d'autres cellules et à mourir quand leur présence est dispensable. Ces propriétés permettent le développement normal de l'embryon et le maintien de l'homéostasie tissulaire chez l'adulte. Ainsi, certains mécanismes ont su évoluer pour permettre aux cellules d'évaluer leur nombre et leur densité. Ces informations sont utilisées pour réguler des processus intrinsèques incluant la croissance, la division et la survie cellulaires. L'étude de ces mécanismes est fondamentale afin de comprendre le développement embryonnaire et le processus tumoral.

Une voie de signalisation nommée « la voie HIPPO » existe chez certains organismes unicellulaires tel que *S. Pombe* (*Schizosaccharomyces Pombe*). Son rôle se limite à la régulation du cycle cellulaire par le cytosquelette d'actine. Au fil de l'évolution, cette voie a su accroître ses compétences. En effet, chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*) et les mammifères, un grand nombre de signaux extracellulaires converge vers la voie HIPPO. Cette voie orchestre ensuite la régulation transcriptionnelle d'un large panel de gènes aboutissant à des réponses cellulaires variées.

Nous abordons ici sa description car, comme nous le verrons dans cet exposé, la voie HIPPO est activée dans divers types cellulaires en réponse à l'AICAR.

A. Description globale de la voie HIPPO

1. La convergence des signaux extracellulaires

Chez les organismes multicellulaires, chaque cellule doit tirer des informations sur son microenvironnement. Pour ce faire, les contacts cellulaires, la tension mécanique de la MEC (Matrice Extracellulaire), les molécules signales extracellulaires telles que les hormones et les cytokines informent la cellule de son environnement extérieur. Ce réseau d'information passe entre autre par la modulation de la voie HIPPO (Fig. 10).

Ainsi, cette voie n'apparaît pas comme une interaction extracellulaire unique d'un ligand avec son récepteur. Un grand nombre de *stimuli* venant de l'environnement cellulaire sont récoltés par la cellule et convergent vers le centre fonctionnel HIPPO (Fig. 10). Ces principaux *stimuli* sont détaillés dans la partie II. B.

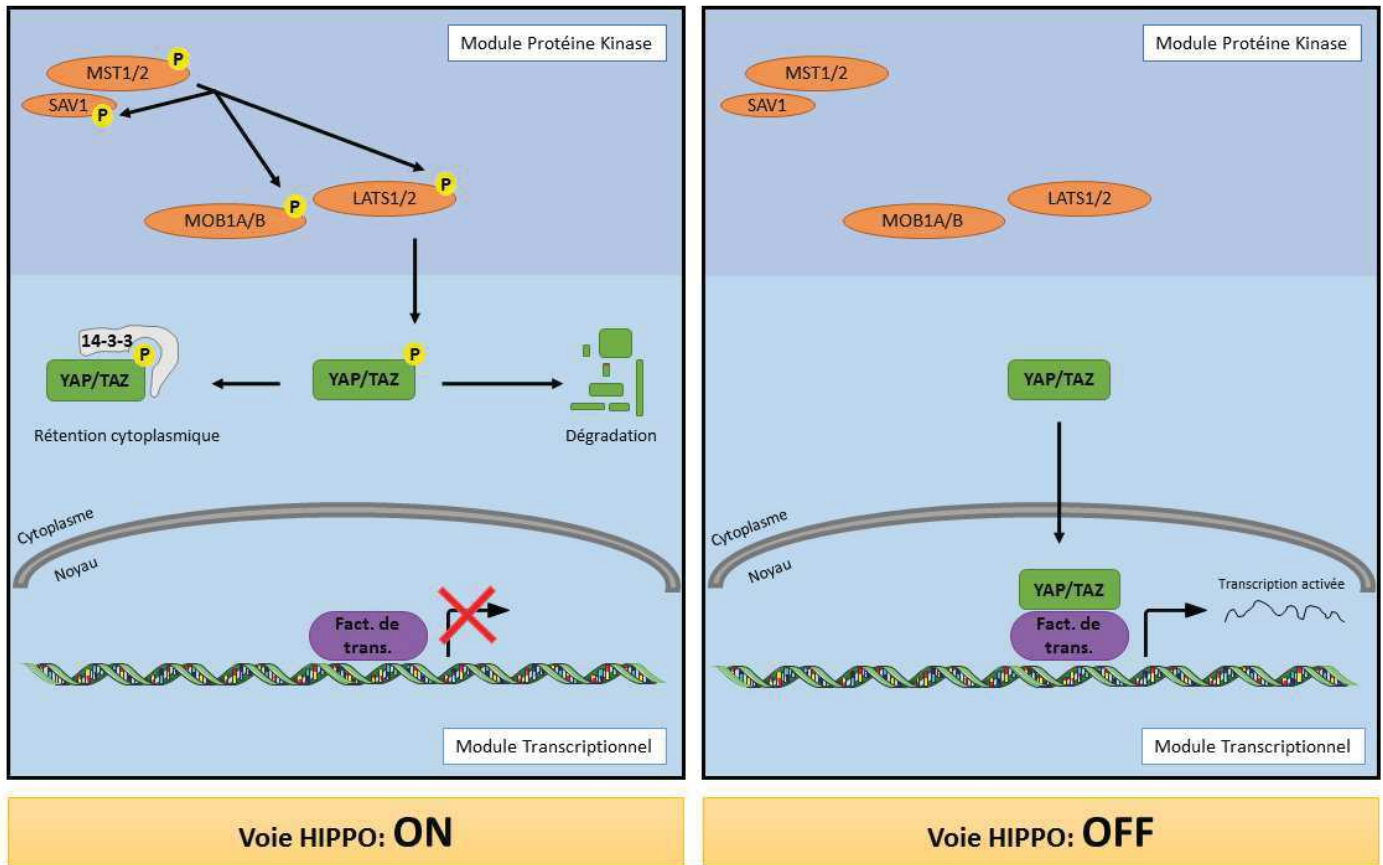


Figure 11 : Description du centre fonctionnel de la voie HIPPO.

Ce centre comprend un module Sérine-Thréonine Protéine Kinase (partie haute du schéma) et un module transcriptionnel (partie basse du schéma). Lorsque la voie HIPPO est activée (ON), MST1 et MST2 phosphorylés vont recruter et activer SAV1, MOB1A et MOB1B par phosphorylation. Ces protéines vont assister MST1 et MST2 pour l'activation de LATS1 et LATS2 par phosphorylation. In fine, LATS1 et LATS2 vont inactiver YAP et TAZ par phosphorylation, seule phosphorylation inhibitrice de la voie. Ces deux cofacteurs de transcription sont soit dégradés, soit séquestrés dans le cytoplasme par la protéine 14-3-3. L'activation de la voie HIPPO est donc permise par une cascade de phosphorylations activatrices puis inhibitrice. Lorsque la voie HIPPO est inactivée (OFF), le module Protéine Kinase n'est pas phosphorylé. LATS1 et LATS2 ne sont donc pas activés. YAP et TAZ non phosphorylés sont activés et se délocalisent dans le noyau. Ils se fixent alors aux facteurs de transcription et activent alors la transcription.

2. Le centre fonctionnel HIPPO

Ce centre fonctionnel se divise en deux modules : le module protéine kinase, constitué d'une cascade de phosphorylation, et le module transcriptionnel, constitué de deux cofacteurs de transcription (Fig. 10 et 11).

a. Les deux modules du centre fonctionnel HIPPO

Le module protéine kinase est localisé dans le cytoplasme cellulaire. Il est composé des protéines MST1 et MST2 (Mammalian STE20-Like Protein Kinase 1 et 2), SAV1 (Salvador Family WW Domain Containing Protein 1), des deux protéines MOB1A et MOB1B (Mps One Binder Kinase Activator-Like 1A et 1B), et des deux protéines kinases paralogues LATS1 et LATS2 (LArge Tumor Suppressor Kinase 1 and LArge Tumor Suppressor Kinase 2) (Fig. 11).

Le module est composé de deux cofacteurs de transcription: YAP1 (Yes Associated Protein 1) et TAZ (Transcriptional co Activator with pdZ binding motif). Ces facteurs sont cytoplasmiques quand la voie HIPPO est activée ou nucléaires quand elle est inhibée (Fig. 11).

b. La voie HIPPO activée

Les signaux en amont du centre HIPPO activent MST1 et MST2 qui vont phosphoryler et activer SAV1, MOB1A et MOB1B. Ces trois protéines vont assister MST1 et MST2 à recruter et activer LATS1/2 par phosphorylation. Cela aboutit en aval à l'inhibition du module transcriptionnel composé de YAP et TAZ grâce à leur phosphorylation par LATS1 et LATS2⁴⁴⁻⁴⁷. YAP et TAZ sont alors séquestrés dans le cytoplasme par fixation à certaines des protéines 14-3-3 et dégradés^{48,49} (Fig. 11). Ainsi, l'activation du module de protéine kinase de la voie HIPPO conduit à l'inhibition du module transcriptionnel incluant YAP et TAZ.

c. La voie HIPPO inhibée

A l'inverse, si le module de kinase n'est pas activé, YAP et TAZ non phosphorylés se localisent alors dans le noyau où ils peuvent interagir avec des facteurs de transcription. Les principaux facteurs de transcription appartiennent à famille des facteurs de transcription TEADs (TEA Domain Transcription Factors)⁵⁰ mais aussi avec les facteurs p63, RUNX, PAX et la famille des SMADs^{51,52}. Ces complexes se fixent à des séquences spécifiques modulant alors l'expression d'un grand nombre de gène. Ainsi, l'inhibition du module de protéine kinase conclue à l'activation du module transcriptionnel.

Globalement, les signaux en amont du centre fonctionnel de la voie HIPPO régule le module protéine kinase. Ce module est une cascade de phosphorylation activatrice et d'amplification du signal. La dernière phosphorylation effectuée par LATS1 et LATS2, à l'inverse, inhibe le module transcriptionnel.

3. La divergence des signaux

La voie HIPPO aboutit à la régulation transcriptionnelle de nombreux gènes. Les grands mécanismes cellulaires sont alors régulés par la transcription : la prolifération, la survie, la différenciation et la migration/invasion cellulaires (Fig. 12).

Ainsi, les signaux de la voie HIPPO sont acheminés vers deux effecteurs finaux, YAP et TAZ. Les effets de ces deux cofacteurs de transcription divergent ensuite vers les mécanismes cellulaires fondamentaux. Ces mécanismes sont détaillés dans la partie II. C.

4. Les embranchements de la voie HIPPO

En plus de cette complexité des signaux modulant la voie HIPPO, YAP et TAZ peuvent être directement régulés indépendamment du module protéine kinase^{53,54}. LATS1 et LATS2 peuvent réguler d'autres protéines indépendamment de YAP et TAZ⁵⁵⁻⁵⁷.

Comme je montre que l'AICAR régule les protéines LATS1 et LATS2, certains mécanismes spécifiques à ces kinases sont décrits dans la partie II.D.

B. Les modulateurs de la voie HIPPO

La voie HIPPO occupe une place centrale dans la physiologie cellulaire et tissulaire. Ceci justifie le fait qu'elle soit soumise à de nombreuses régulations pour sa meilleure adaptation dans un microenvironnement qui n'est pas statique. Les études des 10 dernières années sur la voie HIPPO mettent en évidence un nombre de signaux croissant qui informent la cellule de son microenvironnement *via* la modulation de cette voie.

Afin de détailler l'ensemble de ces signaux, la cellule épithéliale est prise comme exemple. La complexité de ce type cellulaire permet d'imager l'ensemble des modulateurs de la voie HIPPO. La cellule épithéliale doit être informée de son état d'adhérence aux cellules voisines ainsi que l'état de la MEC (Matrice Extracellulaire) afin d'adapter une réponse appropriée à toute modification de son statut au sein du feuillet épithélial. En cela, la voie de signalisation HIPPO sert de relai en transmettant des signaux issus de la membrane plasmique vers la machinerie de transcription pour une réadaptation selon les nouvelles contraintes imposées. La membrane plasmique est un compartiment subcellulaire important pour la transduction du signal de la voie HIPPO.

1. Polarité apico-basale

Dans un épithélium les cellules sont solidarisées en associant entre elles des complexes protéiques divers appelés jonctions intercellulaires. Leur rôle est d'assurer une cohérence tissulaire pour le maintien des fonctions physiologiques. Les cellules du tissu épithélial sont étroitement juxtaposées (feuillet épithélial) grâce à différentes jonctions d'ancrage cellulaire telles que les jonctions adhérentes (JAs) et les jonctions serrées (JSs). Les JAs permettent de lier les cellules entre elle alors que les JSs bloquent la circulation des fluides entre les cellules et assurent l'étanchéité entre deux compartiments tissulaires. Ces jonctions aidées par des complexes de polarité divisent donc la membrane plasmique en deux domaines : le domaine apical et le domaine baso-latéral. Une polarité apico-basale est alors établie⁵⁸.

Beaucoup de régulateurs en amont de la voie HIPPO sont connus comme étant des composants des JAs, des JSs et des complexes de la polarité (Fig. 12 A). La déstabilisation des JAs et JSs de cellules en culture délocalise YAP et TAZ dans le noyau⁵⁹. Certains composants des complexes de polarité cellulaires régulent aussi la voie HIPPO. Les principales protéines de la polarité apico-basale modulant la voie HIPPO sont listées ci-dessous :

- Associée aux JAs, la protéine **AJUBA** séquestre et inhibe LATS1/2. YAP et TAZ sont alors activées⁶⁰.
- Associée aux JAs, l'**α-catenine** se lie à LATS1/2 mais aussi aux complexe **14-3-3/YAP** et **14-3-3/TAZ** ce qui *in fine* inhibe la localisation nucléaire de YAP et TAZ^{61,62}.
- Associée aux JSs, **AMOT** peut lier soit à la F-actine (actine Filamenteuse) soit YAP. Ces deux protéines entrent alors en compétition pour la liaison⁶³. De manière intéressante, LATS1/2 phosphorylent AMOT ce qui potentialise la liaison d'AMOT avec YAP^{61,64-66}. Ainsi, LATS1/2 peuvent inhiber la localisation nucléaire de YAP et TAZ de manière directe et indirecte^{61,64-66}. Le rôle du cytosquelette d'actine dans la modulation de la voie HIPPO est détaillé dans la partie II. B. 4.
- La protéine **SCRIB** (Scribble) est une protéine de la jonction baso-latérale. Cette localisation facilite l'activation du module protéine kinase. Une perte de la polarité cellulaire entraîne sa délocalisation. Lors de la TEM (Transition Epithélio-Mésenchymateuse), la délocalisation de SCRIB induit l'activation de YAP et TAZ⁶⁷.
- Lorsque la polarité apico-basale est présente au sein d'une cellule, les protéines **Kibra** (Kidney and BRain Protein) et **NF2** (NeuroFibromin 2) sont associées au pôle apical de la cellule. Ces protéines vont former un complexe avec le module protéine kinase qui aboutit à l'activation de LATS1/2⁶⁸.

Ainsi, différents points de contact et de structuration de la cellule épithéliale sont capables de réguler les modules protéine kinase et transcriptionnel.

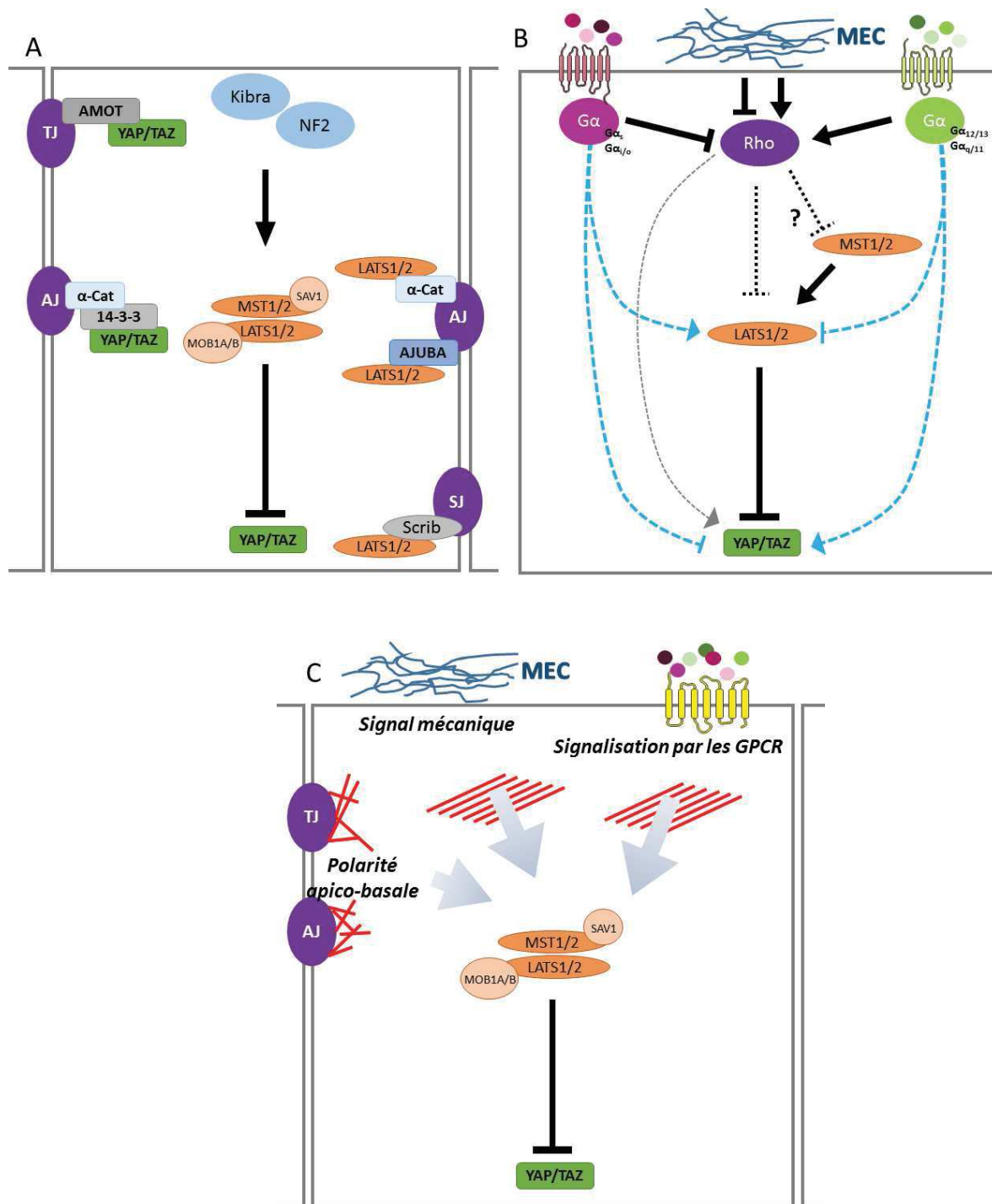


Figure 12 : Les mécanismes régulant la voie HIPPO.

La polarité apico-basale (A), les signaux mécaniques et la signalisation par les GPCR (B) ainsi que le cytosquelette d'actine (C) régulent la voie HIPPO. Les carrés gris représentent les membranes plasmiques. Les flèches dirigées et les flèches barrées indiquent l'activation et l'inhibition, respectivement. Les lignes en pointillées indiquent des mécanismes indirects ou inconnus. Les lignes rouges dans la figure (C) représentent les F-actines.

2. La MEC

Tout comme les contacts cellulaires, l'adhérence à la MEC informe la cellule épithéliale de son microenvironnement. En culture cellulaire, cet attachement est un mécanisme important pour maintenir la survie cellulaire. Lorsqu'une cellule se détache de la MEC ou du support en culture cellulaire, une mort programmée spécifique se déclenche : l'anoikis⁶⁹. Le profil d'attachement à la MEC d'une cellule peut aussi réguler la voie HIPPO : YAP est activé pour les cellules attachées mais inactivé pour les cellules détachées⁷⁰. L'expression constitutive de YAP active la survie des cellules détachées.

Au niveau moléculaire, l'attachement à la MEC module l'activité des Rho GTPase et du réseau de β -spectrin (Fig. 12 B) entraînant un remodelage du cytosquelette d'actine (Fig. 12 C)^{70,71}. Le rôle du cytosquelette d'actine dans la modulation de la voie HIPPO est détaillé dans la partie II. B. 4.

3. La signalisation hormonale et par les cytokines

La cellule épithéliale est donc maintenue au sein du tissu grâce à ses différentes adhérences cellulaires et matricielles. En plus de ce rôle de charpente, la MEC sert de support pour la circulation de molécules signales. En effet, les hormones et les cytokines sont synthétisées par différents types cellulaires tels que les cellules des glandes endocrines, les cellules du système immunitaire. Ces molécules se déplacent ensuite soit par la MEC pour informer les cellules voisines (signalisation paracrine), soit par la circulation sanguine afin de transmettre des messages à travers l'organisme (signalisation endocrine). Grâce à leur vaste champ de diffusion, ces molécules signales peuvent agir sur l'homéostasie tissulaire mais aussi de l'organisme.

Ainsi, afin de transmettre divers messages provenant du microenvironnement cellulaires, de nombreuses hormones et cytokines agissent *via* une grande famille de récepteurs membranaires nommée les GPCRs (G Protein-Coupled Receptor). Ces GPCRs transmettent le signal par l'activation de la protéine G à laquelle le récepteur est couplé. Puis, différents effecteurs peuvent être modulés par cette protéine G entraînant des réponses cellulaires telles que la prolifération, la survie, la différenciation et la migration cellulaire.

Certains ligands des GPCRs couplés aux protéines $G\alpha_{12/13}$ et $G\alpha_{q/11}$ inhibent LATS1/2 et donc activent YAP et TAZ (Fig. 12 B). Ces ligands sont l'acide lysophosphatidique, le S1P (Sphingosine-1-Phosphate), la thrombine, l'angiotensine II et l'œstrogène. *A contrario*, les ligands couplés aux protéines $G\alpha_s$ et $G\alpha_{i/o}$ tel que l'épinephrine et le glucagon peuvent activer LATS1/2 et ensuite inhiber YAP et TAZ⁷²⁻⁷⁶. Ainsi, l'activité de YAP et TAZ peut être activée ou réprimée par la signalisation des GPCRs. La transmission du signal par les protéines G α vers la voie HIPPO est peu connue. Certains auteurs ont montré que les Rho GTPases permettent la médiation du signal (Fig. 12 B)^{73,75,76}. En effet, Y27632, inhibiteur des Rho GTPases, bloque l'effet du S1P sur l'activité de YAP et TAZ⁷³. Il a aussi été montré que le cytosquelette d'actine est important dans cette transmission du signal (Fig. 12 C). Cette notion est détaillée dans la partie II. B. 4.

D'autres types de récepteurs agissent sur la localisation de YAP et TAZ. L'EGFR (EGF Receptor), régulé l'EGF, inhibe le module de protéine kinase AJUBA ce qui entraîne la localisation nucléaire de YAP et TAZ ⁷⁷. Le récepteur Frizzled au ligand Wnt est aussi un récepteur de GPCRs. Sans passer par les protéines G, l'activation par Wnt va inhiber la localisation cytoplasmique de YAP et TAZ et entraîner sa localisation nucléaire ⁷⁸.

Ainsi, un large éventail de molécule signale extracellulaire module donc la voie HIPPO à travers de nombreux récepteurs.

4. Le cytosquelette centralise les signaux de polarité cellulaire et de molécules signales

In vivo, la cellule perçoit les signaux générés par les contacts mécaniques avec les cellules voisines et la MEC ainsi que les signaux moléculaires environnants. Elle adapte ensuite ces propres signaux intracellulaires ce qui permet une réponse cellulaire globale par la prolifération, la différenciation, l'apoptose et la migration ⁷⁹.

Le cytosquelette est un ensemble organisé de polymères de protéine conférant les propriétés architecturales et mécaniques d'une cellule. Ceci est permis grâce à ces liens entre l'ensemble des constituants cellulaires. En plus de ces propriétés, ce cytosquelette peut intégrer et répondre aux signaux extracellulaires décrits ci-dessus. On parle alors de transduction mécanique du signal. Ainsi, le cytosquelette d'actine est considéré comme étant un régulateur important de la prolifération cellulaire ⁸⁰. Cette mécanotransduction n'est pas seulement impliquée dans les processus physiologiques normaux mais aussi dans la tumorigénèse et les métastases ⁸¹.

Trois études récentes montrent que YAP et TAZ sont régulés par la transduction mécanique du cytosquelette d'actine chez les cellules de mammifère ^{70,82,83}. Dupont *et al.* et Wada *et al.* ont montré que YAP et TAZ sont régulés par la forme de la cellule : YAP et TAZ sont cytoplasmiques lorsque les cellules sont étalées et nucléaires lorsqu'elles sont rondes. Dupont *et al.* ont aussi montré que l'adhésion de la cellule à la surface d'encrage module l'activité de YAP et TAZ. En effet, ces protéines sont cytoplasmiques lorsque les cellules sont peu attachées à la matrice et nucléaires lorsque l'attachement à la matrice est plus solide. Zhao *et al.* affirment que le détachement cellulaire induit l'anoïkis *via* l'inactivation de YAP et TAZ. Ces trois études mettent en évidence que la modulation de l'activité de YAP et TAZ est permise par le réarrangement du cytosquelette d'actine en réponse aux signaux mécaniques extracellulaires transmis par les cellules avoisinantes ou la matrice (Fig. 12 C). Certains auteurs suggèrent qu'une Rho GTPase, RhoA, active fortement YAP et TAZ ^{70,82}. Ces résultats vont dans le sens d'un rôle général des Rho GTPases dans la régulation du cytosquelette d'actine et dans la prolifération cellulaire ⁸⁴.

Comme décrit précédemment, les GRCPs transmettent leur signal par la modulation des Rho GTPase ⁷³. Or, ces protéines sont aussi régulées par les signaux mécaniques et les ligands extracellulaires modulant ensuite le cytosquelette d'actine ^{79,84,85}. De plus, les ligands tels que l'acide lysophosphatidique, le S1P, la thrombine activent la formation des F-actines alors que certains ligands

couplés aux protéines $G\alpha_s$ empêchent cette formation ^{73,75,76 86}. Bien que l'ensemble des données de la littérature nous permet de penser que la modulation de la voie HIPPO par les GRCPs passe par le cytosquelette d'actine, ce lien n'est pas clairement établi.

Dans les cellules épithéliales, la complexité du cytosquelette d'actine est due à la polarisation cellulaire et aux jonctions cellules-cellules. En effet, il existe différents réseaux de F-actine aux niveaux apical et basal. Certaines F-actines sont liées aux jonctions apicales grâce à des adaptateurs protéiques tels que l' α -catenin, NF2 et AMOT. Ces connections physiques créent une continuité entre le cytosquelette d'actine et les cellules voisines ⁸⁷. Ensuite, les cellules mutées n'exprimant pas l' α -catenin, NF2 ou AMOT voient l'activité de YAP et TAZ diminuée ainsi que la prolifération ^{59,62}. Les auteurs ont montré que ce phénotype est médié par le réarrangement local du cytosquelette d'actine. Pour des kératinocytes et des cellules épithéliales du sein, la chute de calcium, ion fondamental pour la dynamique des F-actines, entraîne la perturbation des jonctions adhérence et l'enrichissement nucléaire de YAP et TAZ.

Les données de la littérature indiquent les complexes de contact entre les cellules, la MEC ainsi que la signalisation GPCRs transmettent les signaux à la voie HIPPO *via* le cytosquelette d'actine (Fig. 12 C). Ce cytosquelette fonctionne comme une plateforme et permet de transmettre le signal entre les régulateurs en amont et le centre fonctionnel de la voie HIPPO.

Tous ces éléments sont interconnectés afin d'obtenir une symbiose entre les cellules mais aussi avec la MEC. En effet, les complexes d'adhésion cellulaire, les éléments de la MEC, les protéines du cytosquelette d'actine et les protéines de la voie HIPPO agissent de concert pour maintenir l'homéostasie tissulaire.

C. Effets de la voie HIPPO médiés par YAP et TAZ

La voie HIPPO intègre donc les signaux provenant d'un vaste réseau de modulateurs. Ces signaux convergent vers YAP et TAZ, deux cofacteurs de transcription. Quand ces derniers sont activés, leur localisation devient nucléaire où la transcription d'un grand nombre de gènes est modulée. Les processus cellulaires adjacents sont la survie, la prolifération, la différenciation et la migration/invasion cellulaires (Fig. 13).

1. Modulation transcriptionnelle par la voie HIPPO

Lorsque YAP et TAZ sont nucléaires, ces cofacteurs de transcription ne se lient pas directement à l'ADN, mais interagissent avec des facteurs de transcription (Fig. 13). Les TEADs constituant une grande famille de facteur de transcription sont les médiateurs majeurs de l'activité nucléaire de YAP et TAZ^{50,88}. D'autres facteurs de transcription peuvent interagir avec YAP et TAZ et entraîner d'autres réponses transcriptionnelles: p63, RUNX, PAX et la famille des SMADs^{51,52}. La transcription d'un grand nombre de gènes est activée grâce aux complexes facteurs de transcription-YAP et/ou TAZ. Ces complexes peuvent aussi aboutir dans certains cas à la répression de la transcription⁸⁹.

Les différentes combinaisons possibles de YAP et TAZ avec ces facteurs de transcription conduisent à la diversification des réponses transcriptionnelles à la voie HIPPO. La liste des gènes dont la transcription est modulée est non exhaustive.

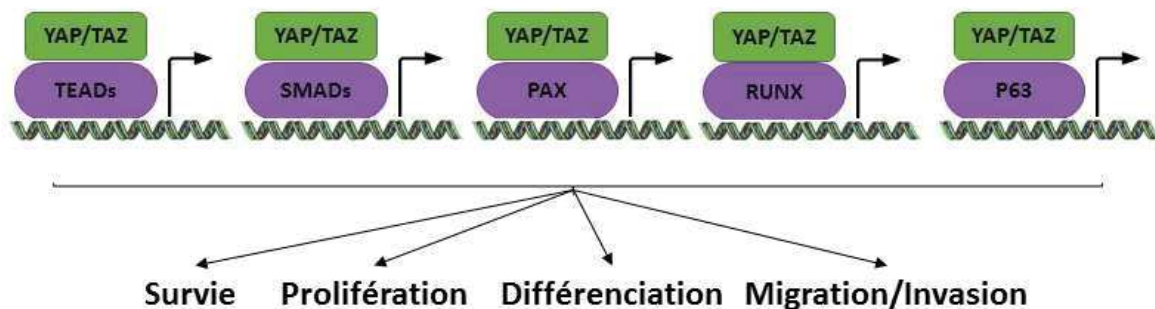


Figure 13 : Programme de transcription de la voie HIPPO.

YAP et TAZ se lient ensemble ou séparément aux facteurs de transcription au niveau des promoteurs ce qui active la transcription. Les gènes cibles sont impliqués dans une variété de mécanismes physiologiques qui sont la survie cellulaire, la prolifération, la différenciation, la migration et l'invasion. Ces processus sont fondamentaux pour le développement embryonnaire et l'homéostasie cellulaire. Illustration inspirée de Meng et al.⁹⁰

Notons que YAP et TAZ régulent l'expression de ligands extracellulaires de certaines voies de signalisations telles que les voies Wnt, de l'EGF. L'expression de ces ligands extracellulaires crée un environnement riche en différents facteurs. En plus de réguler les mécanismes cellulaires, cette voie HIPPO agit aussi sur les cellules voisines à travers une signalisation paracrine.

Globalement, la modulation de l'expression des gènes par YAP et TAZ conduit à la survie, la prolifération, la différenciation et la migration/invasion cellulaires⁹⁰. Chacun de ces processus cellulaires peuvent être prépondérant en fonction du type cellulaire et du type de signal en amont de la voie HIPPO (prolifération dans le cadre de la régénération tissulaire ; différenciation dans le cadre du développement embryonnaire).

2. Rétrocontrôle négatif sur la voie HIPPO

Un système de rétrocontrôle négatif s'effectue sur la voie HIPPO. YAP et TAZ induit la transcription de LATS2, de NF2 et probablement MST1 65,91. Cela entraîne l'activation de LATS1 et LATS2 suivie de l'inhibition de YAP et TAZ. Cette boucle de régulation est critique pour maintenir une activation transitoire de YAP et TAZ après leur stimulation. Par ces mécanismes, YAP et TAZ tamponnent les fluctuations de la voie HIPPO et assurent l'homéostasie tissulaire. Quand cette boucle est dérégulée, la suractivation de YAP et TAZ peut entraîner la tumorigénèse.

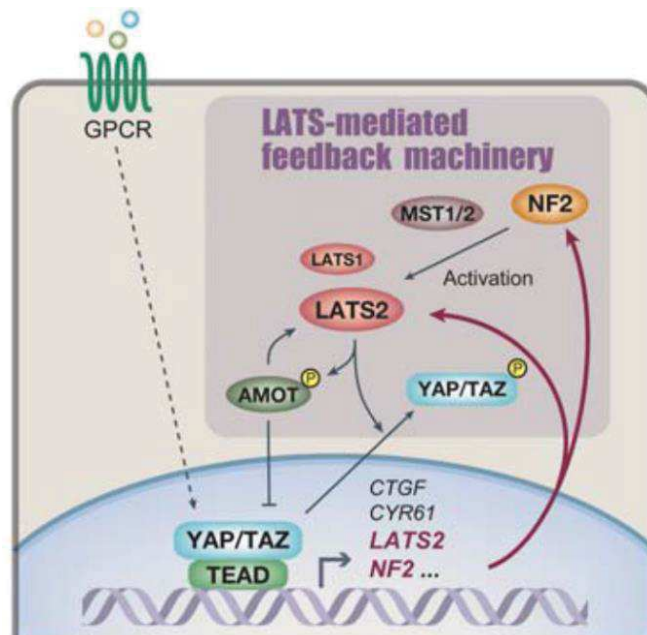


Figure 14 : Rétrocontrôle négatif transcriptionnel sur la voie HIPPO

En réponse à l'activation de YAP et TAZ, ces cofacteurs de transcription complexes avec TEAD induisent directement l'expression de LATS2. YAP et TAZ stimule aussi l'activité des kinases LATS1 et LATS2 par l'induction de NF2. Ainsi, l'activation de YAP et TAZ résulte à l'activation de leurs inhibiteurs, LATS1 et LATS2, et contribuent donc à un rétrocontrôle positif sur la voie HIPPO. Modèle et illustration proposés par Moroishi et al. 91

Toutes ces régulations cellulaires de la voie HIPPO permettent, à l'échelle de l'organisme, de jouer un rôle crucial lors du développement embryonnaire et dans la maintenance de l'homéostasie tissulaire (Fig. 15). Nous passons en revue certains de ces aspects.

3. Rôle dans le développement embryonnaire, la taille des organes et l'homéostasie

a. La voie HIPPO est fondamentale pour le développement embryonnaire précoce.

Durant les stades précoces de développement embryonnaire, les localisations sub-cellulaires de YAP et TAZ sont différentes selon le devenir de la cellule⁹³. Ces localisations permettent des signatures transcriptionnelles hétérogènes conduisant à la première étape de différenciation. Cela explique que les embryons de souris YAP/TAZ dKO (double-KnockOut), les embryons KO pour YAP et KO pour TAZ meurent rapidement avant la première étape de différenciation^{94,95}. Dans ce sens, cette étape de différenciation n'aboutit pas chez les embryons KO pour TEAD4 ainsi que les embryons dKO pour LATS1/2⁹³.

a. La voie HIPPO régule la taille des organes.

La mutation des kinases de la voie HIPPO mène à une croissance trop importante de certains organes. Cela est principalement dû à la prolifération et la survie cellulaire induites par l'activation de YAP. Par exemple, l'expression spécifique de YAP dans le foie entraîne une augmentation importante de cet organe. De manière intéressante, le foie retourne à sa taille normale *via* l'apoptose si l'expression normale de YAP est restaurée⁹⁶. La mutation d'autres protéines de la voie HIPPO entraîne aussi une augmentation de la taille d'organes⁹⁷.

a. La voie HIPPO est garante de l'homéostasie tissulaire.

L'activité élevée de YAP et TAZ est observée au sein des cellules souches de différents tissus, suggérant que YAP et TAZ ont un rôle dans la maintenance des cellules souches. Par exemple, YAP est fortement nucléaire chez les cellules souches intestinales^{96,98}. L'activation de YAP, résulte à la prolifération des cellules souches, altère la différenciation et entraîne l'hyperplasie de certains tissus tels que le tissu intestinal et le foie^{96,99,100}.

Le rôle de YAP et TAZ dans la prolifération cellulaire et la croissance des cellules souches suggèrent que YAP et TAZ ont une fonction essentielle dans l'homéostasie tissulaire. L'intestin de souris sauvages peut régénérer certaines cellules du colon après leur inflammation induite par du Dextran Sulfate de Sodium. Cette régénération est sévèrement altérée par un KO conditionnel de YAP chez la souris⁹⁹. De manière plus générale, la délétion de YAP tissu-spécifique entraîne des anomalies au niveau du cœur, de la peau et des reins^{62,101,102}.

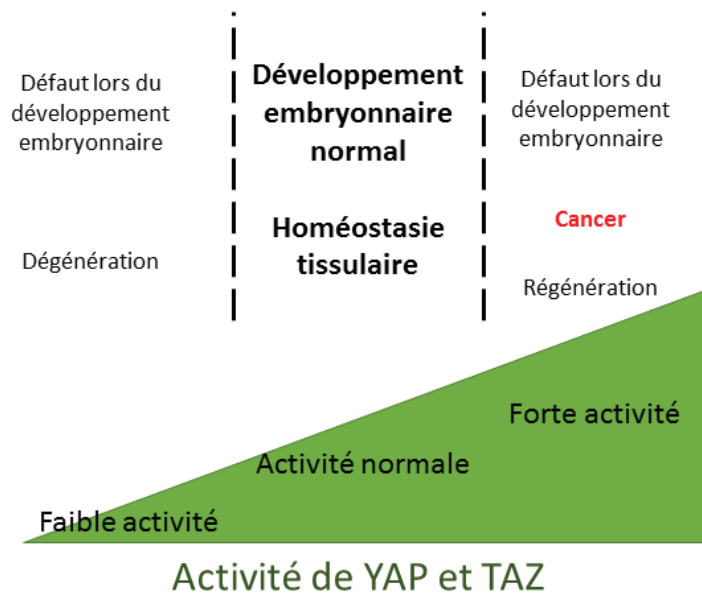


Figure 15 : Rôle potentiel de YAP et TAZ dans l'homéostasie tissulaire et le développement de maladies.

Une fenêtre d'activité normale de YAP et TAZ permet le développement normal et l'homéostasie tissulaire. La sous ou sur activité de YAP et TAZ mène à des défauts de développement embryonnaire, de turn-over tissulaire et de tumeur. Illustration inspirée de Yu et al. ⁹².

Le développement embryonnaire, la taille des organes et l'homéostasie tissulaire demandent une haute perception du microenvironnement cellulaire afin d'obtenir une coopération entre les cellules. La tension mécanique et la propagation de facteurs paracrines ou/et autocrines informent la cellule de l'état de ce microenvironnement *via* la voie HIPPO. Ainsi, cette voie transmet ces données à la machinerie de transcription. La réponse cellulaire permet d'obtenir une coopération entre les cellules et ainsi une homéostasie tissulaire grâce à la régulation de la prolifération, la survie, la différenciation et la migration/invasion cellulaire. Ces mécanismes cellulaires permettent de mener à bien le développement embryonnaire, la taille des organes et l'homéostasie tissulaire.

Des dysfonctionnements de cette voie peuvent survenir suite à des mutations ou à une mauvaise activité de certaines protéines. Cela conduit à des anomalies de développement, de dégénérescence ou de régénération tissulaire, mais aussi au développement tumoral (Fig. 13).

Dans le cadre de ma thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés au lien entre la voie HIPPO et le développement tumoral puisque le rôle antitumoral de l'AICAR passerait par une modulation de la voie HIPPO.

4. Dysfonction de la voie HIPPO : formation de tumeur

La voie HIPPO a un rôle important dans l'initiation tumorale et la progression où généralement YAP et TAZ sont des oncogènes et les composants du module protéine kinase de la voie HIPPO, des suppresseurs de tumeurs. Par exemple, l'activation de YAP, comme une expression transgénique dans le foie murin, entraîne une transformation cellulaire et le développement de tumeur ⁴⁸.

Le développement de tumeur induit par YAP est largement médié par le programme de transcription de TEAD. En effet, l'induction de YAP dans le foie est complètement bloqué par l'expression d'un dominant négatif de TEAD aussi capable de séquestrer YAP et TAZ ¹⁰³.

Au niveau cellulaire, l'activation de YAP est importante pour la survie, la prolifération, la différenciation et la migration/invasion cellulaire (Fig. 13). Une activité élevée de YAP et TAZ empêche l'inhibition de la prolifération cellulaire par contact et l'anoïkis et permet la prolifération cellulaire indépendamment de l'encrage cellulaire ^{70,104}. YAP induit l'expression ZEB1/2 et stimule la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) ^{105,106}. Cette transition induit la différenciation des cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses où les cellules perdent leur adhésion à la matrice et acquièrent des propriétés nouvelles vis-à-vis de la MEC. Ce nouveau caractère invasif permet aux cellules tumorales de migrer et induit ainsi la formation de métastase. Dans ce sens, l'expression de LATS1/2 diminue les métastases de tumeurs de la prostate ⁷⁰. De plus, YAP induit l'instabilité génétique, caractéristique capable de causer l'apparition de tumeur ¹⁰⁷. Pour finir, TAZ stimule la division des cellules souches et la capacité d'induire la prolifération tumorale des cellules souches mammaires ⁶⁷.

Ainsi, la voie HIPPO est dérégulée dans de nombreux cancers. L'augmentation de la quantité de YAP et TAZ ou l'enrichissement nucléaire de ces protéines ont été observés dans un grand nombre de cancers tel que le cancer du foie, du poumon, du colon, de l'ovaire, du sein ainsi que d'autres cancers ^{91,104,108}. Cependant, la majorité des cancers ayant une activité de YAP et TAZ importante n'est pas reliée à des mutations génétiques de la voie HIPPO. Par exemple, la connexion entre la voie HIPPO, les forces mécaniques et la signalisation des GPCRs donnent une nouvelle vision du développement tumoral (Fig. 16 A). Après la déstabilisation des jonctions cellules-cellules et de la polarité cellulaire, les cellules peuvent d'une part avoir leur activité YAP et TAZ augmentée et, d'autre part, former de nouvelles adhésions avec la MEC. Cette proximité avec la MEC augmente les chances de rencontre entre ces cellules et les ligands aux GPCRs modulant aussi la voie HIPPO.

L'ensemble des altérations génétiques touchant les gènes de la voie HIPPO est assez faible. Un exemple bien caractérisé est celui de la mutation de la voie HIPPO associée à NF2 causant des neurofibromatoses de type 2 ¹⁰⁹. Les auteurs indiquent que le mécanisme majeur permettant le potentiel oncogénique de *Nf2* mutée est l'activation de YAP. De plus, des mutations de *LATS1/2* ou des fusions entraînant l'activation de YAP et TAZ ont été identifiées dans différents cancers. Pour finir, quelques amplifications, mutations, délétions ont été répertoriés pour les gènes codant pour YAP et TAZ ⁹².

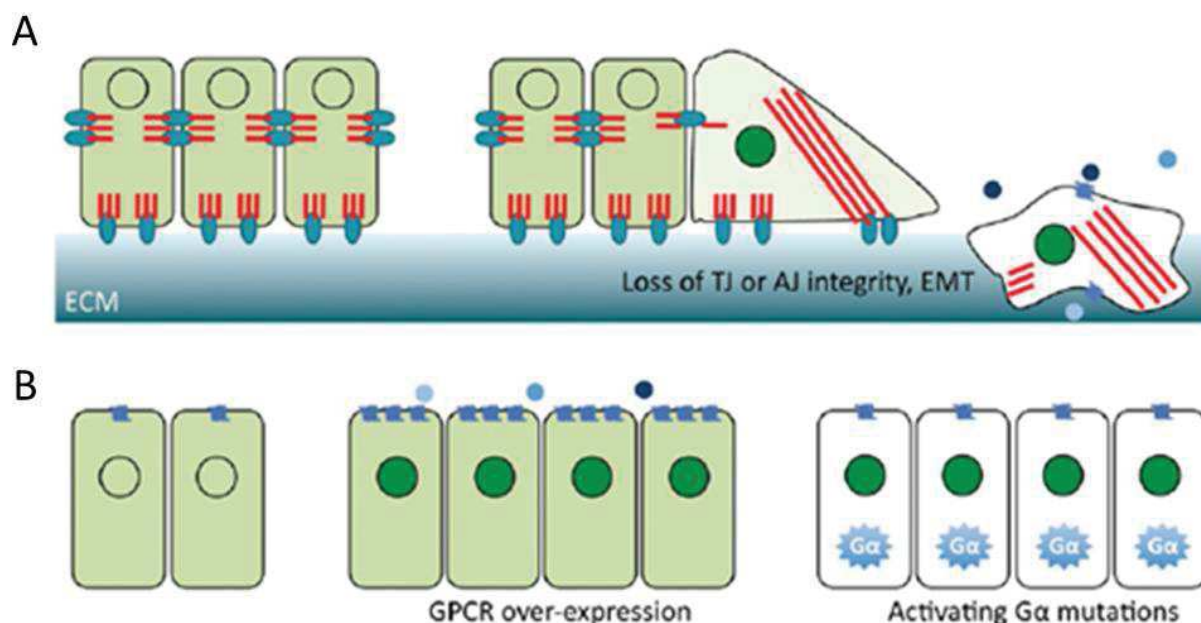


Figure 16 : Phénomènes pouvant être à l'origine de la localisation nucléaire de YAP et TAZ dans le cadre de la tumorigénèse.

A) Les cellules représentées ici sont des cellules épithéliales. La désorganisation du cytosquelette d'actine modifie la structure de la cellule ce qui augmente la localisation nucléaire de YAP et TAZ. Cette sur activation de YAP et TAZ altère l'adhérence à la MEC (ECM) par les JSs et les JAs (TJ et AJ) ce qui contribue à la transition épithélio mésenchymateuse (ou EMT) et la migration cellulaire. Les cellules qui s'échappent ainsi de l'épithélium peuvent alors rencontrer plus de ligands de GPCR. B) La surexpression des GPCR et la sur activation des protéines G conduit à une augmentation de la localisation nucléaire de YAP et TAZ. L'augmentation anormale de YAP et TAZ dans le noyau contribue aux développements de tumeur. La légende est la suivante. Trait rouge : F-actine ; forme ovoïde bleu membranaire : JSs (ou TJ), JAs (ou AJ) et complexes de polarité apico-basale ; surface bleu dégradé : MEC (ou ECM) ; boules bleus extracellulaires : ligands de GPCR ; forme carrée bleu membranaire : GPCRs ; noyau vert : localisation nucléaire importante de YAP et TAZ. Illustration issue de Yu et al.¹¹².

Bien qu'il existe des mutations oncogéniques de la voie HIPPO, son implication dans la tumorigénèse est majoritairement due à la variation de la quantité ou de l'activité des protéines de cette voie.

L'activité de YAP et TAZ est aussi liée à la résistance aux drogues antitumorales et la rechute cancéreuse. Des cellules cancéreuses du sein en culture avec une activité élevée de YAP et TAZ résistent à un certains nombres de traitement tel que le Tamoxifen^{67,110}. Or, cette drogue active YAP et TAZ en stimulant le GPER (récepteur membranaire à l'œstrogène), un GPCR. Ainsi, l'activation du GPER par le Tamoxifen ou l'œstrogène peut contribuer à la croissance tumorale et à la résistance au drogue¹¹¹.

Ainsi, une stratégie antitumorale efficace serait de toucher le core kinase de la voie HIPPO ou YAP et TAZ afin d'inhiber la survie, la prolifération, la différenciation et la migration/invasion cellulaire. Dans ce contexte, l'initiation et la progression tumorale seraient inhibées. De plus, l'inhibition de YAP et TAZ pourrait sensibiliser les tumeurs aux chimiothérapies et prévenir la rechute de cancer.

D. LATS1 et LATS2, au carrefour de plusieurs voies

LATS1 et LATS2, protéines kinases au centre de la voie HIPPO, sont des maillons essentiels pour la modulation de YAP et TAZ. Chez la levure *S. Cerevisie*, les orthologues de LATS1/2 ont un domaine kinase conservé (Fig. 17 A). Or, la communication intercellulaire n'existe pas chez cet organisme unicellulaire. Il est donc évident que ces enzymes ont aussi des rôles indépendants de la voie HIPPO et de YAP et TAZ. Malgré que certains de ces rôles soient bien connus, beaucoup d'études ne différencient pas nettement l'implication de la voie HIPPO ou de YAP et TAZ dans la fonction de LATS1 et LATS2.

1. LATS1 et LATS2 sont des suppresseurs de tumeurs

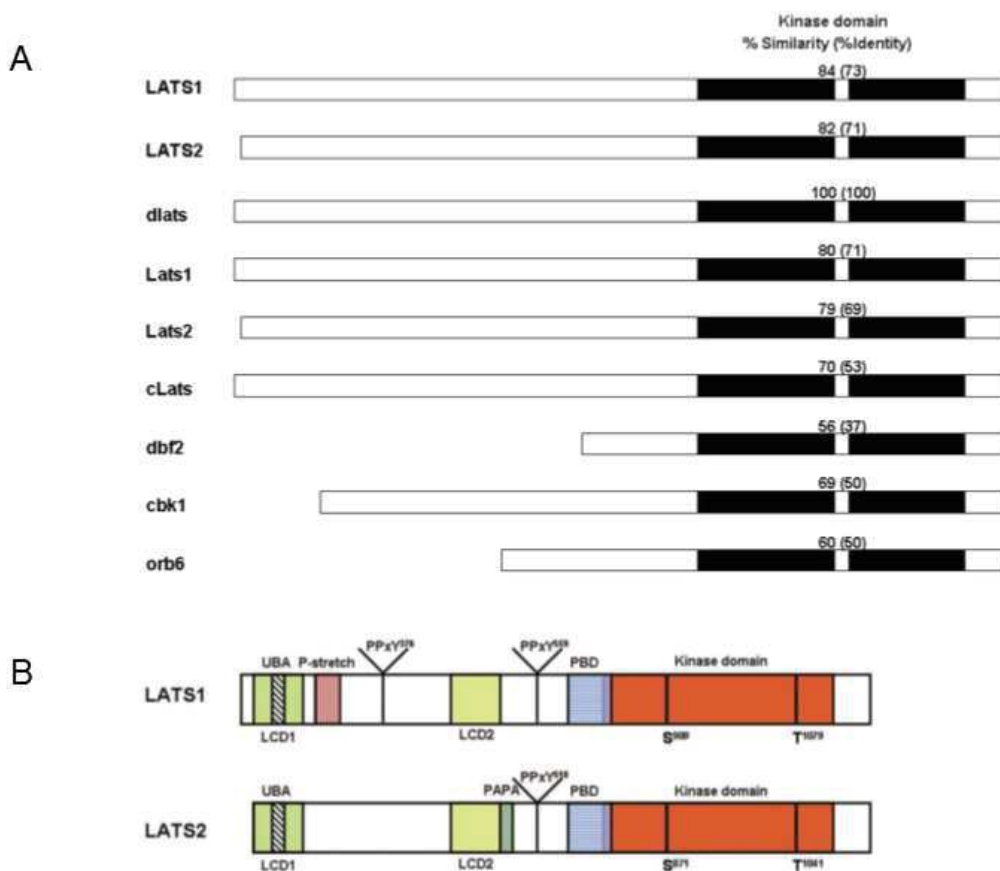


Figure 17 : Les différents domaines des protéines LATS

A) LATS est une protéine conservée au cours de l'évolution. Quelques homologues de dlats (gène de la drosophile) sont représentés avec leurs pourcentages d'identité et de similarité du domaine kinase comparés avec le gène de la drosophile. Les homologues présentés ici sont ceux de l'homme (LATS1 et LATS2), de la souris (Lats1, Lats2), du nématode (*C. elegans* : cLats) et la levure (*S. Cerevisie* : dbf2, cbk1 et *Pombe*: orb6). B) Chez l'homme, LATS1 et LATS2 partagent plusieurs domaines conservés incluant le domaine Ser/Thr kinase C-Terminal, le domaine PBD (protein binding domain), deux domaines LCD (LATS Conserved Domains), un domaine de liaison à l'ubiquitine nommé UBA et le motif PPxY qui lie les domaines protéiques WW comme YAP et TAZ. LATS1 possède un domaine distinct nommé P-stretch riche en proline qui pourrait être un domaine de liaison aux protéines alors que LATS2 possède une répétition PAPA possédant sept répétitions alternant proline/alanine qui pourrait être un domaine de liaison à différentes protéines. Illustration issue de Vissier et al. ¹¹⁸

Dans le but de mettre en évidence des suppresseurs de tumeurs, des animaux mosaïques (clone(s) de cellules homozygotes mutées au sein d'un animal hétérozygote) sont générés chez l'insecte *Drosophila melanogaster*. Les clones mutants homozygotes proliférant de manière trop importante sont alors génotypés. En 1995, deux équipes ont ainsi mis en évidence le suppresseur de tumeurs LATS (LArge Tumor Suppressor Kinase) ^{113,114}.

Au cours du développement, la migration cellulaire est altérée pour ces clones mutés aboutissant à une hypertrophie au niveau des disques imaginaux (amas cellulaire issu du blastodème fondamental pour le passage du stade larvaire au stade imagino ou adulte). Tout cela explique le taux élevé de mortalité avant le stade adulte, le développement de tumeurs et les anomalies phénotypiques des animaux adultes tels que l'œil rugueux et la stérilité.

Au niveau cellulaire, la mutation du gène n'entraîne pas seulement une prolifération anarchique, comme pour la majorité des suppresseurs de tumeurs, mais aussi des anomalies de morphologie et d'adhérence cellulaire. En effet, la taille des clones homozygotes mutés pour *lats/wts* est deux fois plus importante que les clones sauvages. Leur forme est arrondie et régulière contrairement aux clones sauvages pour lesquels la forme est irrégulière et allongée. Ces clones montrent aussi des anomalies aux niveaux des jonctions adhérentes, lesquelles sont fondamentales pour certains types cellulaires comme les cellules épithéliales.

L'expression de l'homologue humain LATS1 chez la drosophile restaure le phénotype sauvage ce qui montre la conservation fonctionnelle de ce gène ^{55,115}. De manière similaire à la drosophile, des souris mutées pour *LATS1* meurent majoritairement avant l'âge adulte, ont des problèmes de développement et présentent des tumeurs ⁵⁵. Comme il est connu que, de manière générale, les souris déficientes pour les homologues humains suppresseurs de tumeur développent des cancers, ces données nous laissent penser que le gène LATS1 chez les mammifères pourrait avoir un rôle suppresseur de tumeur.

L'ensemble de ces éléments nous montrent le rôle fondamental de LATS1 dans le développement embryonnaire et dans le contrôle de la prolifération et de la croissance cellulaire.

Bien que LATS ait été découvert chez la drosophile, sa conservation à travers l'évolution a été montrée par l'existence d'homologues chez la souris (*Lats1*, *Lats2*), la levure (*S. Cerevisiae* : *dbf2*, *cbk1* et *S. Pombe*: *orb6*) et le nématode (*Caenorhabditis elegans* ou *C. elegans* : *cLats*) (Fig. 17 A) ¹⁶.

Chez l'homme, deux homologues ont été identifiés et clonés: LATS1 ^{55,115} et LATS2 ^{116,117} (Fig. 17 B). Bien que les deux gènes se situent sur deux chromosomes différents, les structures protéiques de LATS1 et LATS2 sont très similaires dans leurs domaines sérine thréonine-kinase, leurs extrémités amino- et carboxy- terminales et leurs *Protein Binding Domain* (PBD). LATS1 et LATS2 possèdent aussi quelques caractéristiques spécifiques à chacune telles que des domaines différents de liaisons aux protéines. Ces légères différences reflètent vraisemblablement des fonctions distinctes entre ces deux protéines.

Les études de ces 20 dernières années ont permis d'attribuer à ces deux protéines un nombre exponentiel de fonctions.

2. Le rôle de LATS1 et LATS2 lors du cycle cellulaire

Comme les cellules mutées pour *LATS* prolifèrent de manière anarchique, les premières études des fonctions de LATS1 et LATS2 chez les mammifères se sont portées sur le cycle cellulaire.

Rappelons que le cycle cellulaire est composé de 4 phases : la phase G1 pour *Gap 1 phase*, la phase S pour *DNA Synthesis* durant laquelle l'ADN est répliqué, la phase G2 pour *Gap 2 phase* et la phase M pour *Mitosis*. La transition entre chacune de ces phases est régulée par les protéines cyclines et les CDKs (Cyclin Dependant Kinases). Les cyclines activent les CDKs en permettant l'avancée dans le cycle cellulaire. Par exemple, le complexe CDK1/CycB régule la transition G2→M.

Plusieurs auteurs ont montré que LATS1 bloque cette transition en se liant à CDK1 empêchant le complexe CDK1/CycB de se former⁵⁵⁻⁵⁷. Dans un modèle de cellule de cancer du sein (MCF.7), la suractivation de LATS1 conduit à une suppression du potentiel tumoral des cellules, à une accumulation des cellules en G2 et à une diminution de la quantité de CycB⁵⁶.

Comme LATS1, LATS2 régule aussi cette transition G2→M *via* un mécanisme différent. Lorsque LATS2 est surexprimé, Cdc25c, activateur de CDK1, est accumulé sous sa forme inactive empêchant la formation du complexe CDK1/CycB¹¹⁹. De plus, la surexpression de LATS2 conduit à un ralentissement de l'entrée en phase S *via* l'inhibition du complexe de régulation majeur de la transition G1→S : CDK2/CycE.

LATS1/2 agissent donc sur l'avancée de la cellule dans le cycle cellulaire *via* leurs effets sur certains complexes régulateurs des transitions entre les phases du cycle G2→M et G1→S.

3. Le rôle de LATS1 et LATS2 durant la division cellulaire

Le cycle cellulaire est aussi régulé sur certaines transitions de phases (G1→S, G2→M) au niveau de points de contrôle ou *checkpoints*. Des contrôles mal réalisés peuvent résulter en une instabilité génétique conduisant à des mutations de l'ADN et/ou à une mauvaise répartition du matériel génétique, deux caractéristiques tumorales¹²⁰.

1. Durant la mitose, les chromosomes se rassemblent aux niveaux de la plaque métaphasique avant de se diviser en deux lots. Un *checkpoints* du fuseau mitotique ou SAC (*Spindle Assembly Checkpoint*) intervient à ce niveau afin de contrôler le bon rassemblement des chromosomes. Un grand nombre de protéines sont essentielles à ce SAC telles que LATS1 et LATS2. L'absence de ces deux protéines conduit à une mauvaise répartition des chromosomes pendant la mitose^{121,122}.

En parallèle de la mitose, la cellule prépare sa paroi à se diviser lors d'un processus que l'on appelle cytokinèse. Un anneau va alors se former perpendiculairement à la plaque métaphasique. Ce processus doit être précis pour que la répartition du matériel génétique soit équitable et complète pour les deux cellules filles. Il a été montré que LATS1 et LATS2 colocalisent avec cet anneau contractile

et sont fondamentaux pour le bon déroulement de la cytokinèse. Ceci est permis par l'interaction avec LIMK1, régulateur du cytosquelette, et par l'axe Aurora A-Lats1/2- Aurora B (ALB) (Fig. 18) ¹²²⁻¹²⁴.

Lorsque la mitose ou la cytokinèse sont perturbées, la division cellulaire peut aboutir à la formation de micronoyaux, de cellules aneuploïdes ou tétraploïdes. Ces erreurs peuvent être reconnues par le *G1 tetraploidy checkpoint* qui déclenche un arrêt en phase G1. Les cellules endommagées sont soit réparées ou dirigées vers l'apoptose. LATS2 régule ce *checkpoint* arrêt grâce à l'activation de p53 (Fig. 18) ^{121,122,125}. Cette kinase est donc un régulateur essentiel pour le maintien de la stabilité génétique.

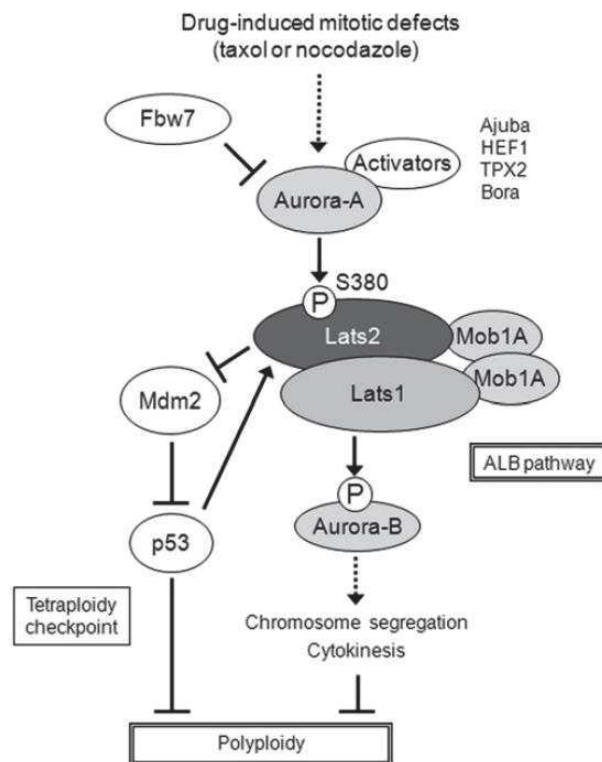


Figure 18 : Un modèle de la nouvelle voie pour la ségrégation des chromosomes et la cytokinèse via l'axe ALB.

LATS2 joue un rôle important pour la ségrégation des chromosomes et la cytokinèse (voie ALB). Durant la mitose, l'activation de Aurora A par certains activateurs (Ajuba, HEF1, TPX2 et Bora) phosphoryle LATS2 à la serine 380. Cette protéine contribue à l'activation de la phosphorylation d'Aurora B via l'activité kinase de LATS1. Si pour la ségrégation des chromosomes et la cytokinèse se déroulent mal, LATS2 peut activer le tétraploïde checkpoint. Illustration issue de Yabuta et al. ¹²²

Ainsi, LATS1 et LATS2 peuvent jouer un rôle suppresseur de tumeurs indépendamment de la fonction effectrice YAP/TAZ, d'une part en régulant les transitions G1→S et G2→M du cycle cellulaire et d'autre part en contribuant au maintien de la stabilité génétique.

TRAVAIL DE THESE

I. Article 1 :

« Identification des transporteurs membranaires de l'AICAR chez la levure et l'homme »

A. Introduction de l'article 1

L'AICAR a des propriétés antitumorales (cf. Introduction - Partie I - §B. 1.). Ses mécanismes d'action peu connus sont étudiés afin de maîtriser son utilisation pour une potentielle utilisation en thérapie anti-cancéreuse.

Lors d'un traitement à l'AICAR, le premier mécanisme mis en jeu est son entrée dans la cellule. Comme le ZMP (Fig. 4) n'est pas transporté à travers la membrane plasmique, son précurseur, l'AICA riboside, est ajouté en extracellulaire. Après son entrée dans la cellule, l'AICAR est alors métabolisé en ZMP par l'Adénosine Kinase ¹. L'utilisation d'inhibiteur de l'Adénosine Kinase tel que la 5-iodotubercidine annule l'effet cytotoxique du traitement à l'AICAR indiquant que le ZMP pourrait être la molécule active.

Il a été proposé que l'AICAR traverse la membrane plasmique grâce aux transporteurs d'Adénosine. En effet, le dipyridamole, inhibiteur des transporteurs à l'adénosine, réverse l'effet cytotoxique de l'AICAR ². Cependant, au début de cette étude, les transporteurs de l'AICAR n'avaient pas encore été clairement identifiés parmi le grand nombre existant de transporteurs de nucléosides. Dans ce travail, nous avons mis en évidence plusieurs transporteurs de l'AICAR.

L'entrée d'AICAR dans la cellule et sa métabolisation en ZMP doivent être détectés et mesurés. Pour ce faire, nous disposons au laboratoire d'une station complète CIHP (Chromatographie en phase ionique à Haute Performance) couplée à un injecteur automatique. Il s'agit d'un outil de choix permettant de détecter en une seule chromatographie un grand nombre de métabolites. Par des mesures de DO (Densité Optique), nous estimons qu'une centaine de pics identifiables peuvent être considérés pour chaque injection. Parmi ceux-ci, les pics d'intérêts correspondent aux nucléosides/nucléotides des voies des purines et pyrimidines ainsi que leurs produits dérivés incluant l'AICAR, ZMP, ZTP etc. (Fig. 21 A). Ces pics d'intérêts ont été identifiés et calibrés grâce à des standards injectés séparément.

Dans un premier temps, la levure *S. cerevisiae* a été utilisée comme modèle expérimental. Cet eucaryote unicellulaire présente de nombreux avantages : il se cultive facilement avec un cycle cellulaire court (< 2h). Il se prête également aux approches par mutagénèses aléatoires et dirigées. Dans cette étude, nous avons utilisé une approche par mutagénèse aléatoire (UV) afin de générer des

levures mutantes. Certaines d'entre elles ont été ensuite sélectionnées pour leurs caractéristiques de létalité synthétique, c'est-à-dire une hypersensibilité à l'AICAR associée à une mutation donnée. Ces levures synthétiques létales ont alors été séquencées et le gène muté provoquant l'hypersensibilité à l'AICAR identifié. Trois des mutations sélectionnées comme hypersensibles à l'AICAR conduisent à une surexpression des transporteurs de thiamines, suggérant que les transporteurs de thiamine assurent également le transport de l'AICAR. Partant de cette hypothèse, nous avons ensuite montré que l'AICAR peut effectivement être transporté par les transporteurs Thi7 et Thi72. Nous avons ensuite identifié le transporteur principal de l'AICAR qui est le transporteur Nrt1 de thiamine et de NmR (nicotinamide riboside), précurseur du NADH. L'approche génétique appliquée au modèle de la levure s'est donc avérée essentielle pour expliquer l'origine du transport membranaire de l'AICAR, fondamental dans son effet cytotoxique. En plus de ces levures mutantes, des inhibiteurs de protéines sont utilisés tel que le dipyridamole, un inhibiteur des transporteurs de l'adénosine. Les deux approches conjointes ont permis d'aborder notre problématique et de valider nos hypothèses de manière plus fiable.

Dans un deuxième temps, nous avons validé ces résultats *in vitro* sur des cellules humaines avec une perspective ouverte en thérapie antitumorale. L'entrée d'AICAR a été étudiée comparativement sur plusieurs lignées cellulaires humaines (glioblastome SF188, U87, SF126, NHA/TS ; hépatome Huh7 ; carcinome A549). L'utilisation de ces modèles humains nous a permis d'une part de valider les données obtenues chez la levure et d'autre part de montrer quelques particularités existant entre ces deux modèles. Chez l'homme comme chez la levure, des transporteurs de nucléosides permettent le transport de l'AICAR. Chez l'homme cependant, en absence d'orthologues humains des transporteurs de thiamine, l'AICAR utilise plusieurs transporteurs de nucléosides et de l'Adénosine. Ces transporteurs sont les protéines ENT1, ENT2 et CNT3 (Equilibrative Nucleoside Transporter 1,2 ; Concentrative Nucleoside Transporter 3).

Etudiant les effets de l'AICAR, nous avons également questionné dans ce travail le rôle éventuel de la présence de l'AMPK sur les effets cytotoxiques de l'AICAR. Cette question est devenue récurrente dans l'utilisation de ce composé car la kinase AMPK était alors la seule cible décrite de l'AICAR. Ainsi, de nombreux travaux justifiaient exclusivement l'effet cytotoxique de l'AICAR par son rôle mimétique de l'AMP sur l'AMPK. De fait, AICAR a été utilisé pharmacologiquement en molécule activatrice de l'AMPK, sans considération d'effets pouvant dépendre de cibles distinctes. Cependant, plusieurs arguments vont en faveur de l'existence d'autres cibles de l'AICAR et la question du rôle de l'AMPK dans la cytotoxicité de l'AICAR restait en suspens (cf. Introduction - Partie I - §B.3.).

Pour tenter de répondre à cette question, nous avons utilisé des MEFs de type sauvage (MEF-wt ; wild type) ou invalidées génétiquement pour les deux isoformes AMPK α 1 et AMPK α 2 (MEF-double Knock Out ou MEF-dKO AMPK). L'intérêt de ce modèle est de soustraire l'AMPK de la cellule afin de déterminer si la présence de l'AMPK est déterminante dans l'effet cytotoxique de l'AICAR.

L'utilisation de ces MEFs nous a permis de montrer que l'entrée d'AICAR et sa cytotoxicité est bloquée par le dipyridamole dans les deux modèles cellulaires (Fig. 8 A, C et D, article 1). Le blocage de l'entrée d'AICAR par les transporteurs de nucléosides suffit à bloquer l'effet cytotoxique de l'AICAR et ce indépendamment de la présence de l'AMPK. Ce travail a permis de montrer que la cytotoxicité de

l'AICAR est totalement indépendante de la présence de l'AMPK dans ce modèle cellulaire (Fig. 8 B, article 1).

Dans ce premier travail, nous avons déterminé que des transporteurs de nucléosides distincts sont responsables de l'entrée de l'AICAR dans ces deux modèles (*S. cerevisiae* et cellules de mammifères). De plus, nous avons démontré dans le modèle mammifère que le transport de l'AICAR et son effet cytotoxique sont indépendants de la présence de l'AMPK. Ces résultats nous ont conduit à nous demander quelles étaient les cibles de l'AICAR, indépendantes de l'activité AMPK, et responsables de cet effet cytotoxique de l'AICAR. L'approche transcriptomique réalisée dans le second article a pour objectif de répondre à cette question en utilisant le modèle cellulaire MEF-dKO (article 2).

B. Article

Identification of Yeast and Human 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAr) Transporters*

Received for publication, January 17, 2014, and in revised form, April 24, 2014. Published, JBC Papers in Press, April 28, 2014, DOI 10.1074/jbc.M114.551192

Johanna Ceschin^{†§1}, Christelle Saint-Marc^{†§1}, Jean Laporte^{†§}, Adrien Labriet^{†§}, Chloé Philippe^{†§}, Michel Moenner^{†§}, Bertrand Daignan-Fornier^{†§}, and Benoît Pinson^{†§2}

From the [†]Université de Bordeaux IBGC UMR 5095 1, F-33077 Bordeaux, France and the [§]Centre National de la Recherche Scientifique IBGC UMR 5095 1, F-33077 Bordeaux, France

Background: AICAr is a potent anti-proliferative compound, but its cellular effects are poorly characterized.

Results: Yeast and human AICAr transporters were identified and found to be critical for AICAr sensitivity.

Conclusion: AICAr uptake in yeast and mammalian cells occurs through nucleoside transport systems.

Significance: AICAr uptake occurs differently in yeast and mammalian cells.

5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAr) is the precursor of the active monophosphate form (AICAR), a small molecule with potent anti-proliferative and low energy mimetic properties. The molecular bases for AICAR toxicity at the cellular level are poorly understood. Here, we report the isolation and characterization of several yeast AICAr-hypersensitive mutants. Identification of the cognate genes allowed us to establish that thiamine transporters Thi7 and Thi72 can efficiently take up AICAr under conditions where they are overexpressed. We establish that, under standard growth conditions, Nrt1, the nicotinamide riboside carrier, is the major AICAr transporter in yeast. A study of AICAR accumulation in human cells revealed substantial disparities among cell lines and confirmed that AICAr enters cells via purine nucleoside transporters. Together, our results point to significant differences between yeast and human cells for both AICAr uptake and AICAR accumulation.

Amino-imidazole carboxamide ribonucleotide monophosphate (AICAR)³ is a precursor of AMP in the purine *de novo* biosynthesis pathway and as such is naturally present in cells at low concentrations (micro molar range) (1). At higher concentrations, AICAR is a potent low energy mimetic that stimulates AMP-activated protein kinase (AMPK) by mimicking activation by AMP (2, 3). *In vivo*, this AMPK activating effect was shown to increase the endurance of sedentary mice (4). Because of its spectacular metabolic effects, AICAR is suspected to be used as a doping agent and since 2011 appears on the list of prohibited substances of the World Anti-Doping Agency. At

high concentrations, AICAR induces cell cycle arrest and/or apoptosis (5). Importantly, it was found that AICAR-induced apoptosis was higher in trisomic mouse embryonic fibroblasts than in their euploid counterpart (6). Because most solid tumor cells are aneuploid, *i.e.* have an incorrect number of chromosomes, AICAR is a promising anti-tumor molecule.

AICAR is provided to mammalian cells in its riboside precursor form, AICAr, which is internalized and metabolized to AICAR monophosphate (7). AICAr was proposed to enter the cell through adenosine transporter(s) because its effects are reversed by dipyrindamole, an adenosine transporter inhibitor (8, 9). The cognate AICAr transporters have not yet been identified. Once it has been internalized, AICAr is converted to its 5'-monophosphate form by adenosine kinase (1, 10). Importantly, the effects of AICAr on mammalian cells are generally fully reversed by inhibition of adenosine kinase activity with drugs such as 5-iodotubercidin, establishing that, in most cases, AICAr has to be metabolized to AICAR monophosphate to be active (as expected for an AMP-mimetic). Similarly, in yeast, the AICAr-induced transcriptional effects are abolished by a mutation in the adenosine kinase gene (*ADO1*), and AICAr toxicity is eliminated when it cannot be metabolized to the monophosphate form (1).

Although many effects of AICAR are at least partially dependent on AMPK, in many cases the effects of AICAR are AMPK-independent (11–15), suggesting the existence of additional AICAR targets. Interestingly, in yeast the AMPK homolog named Snf1 appears unaffected by AICAR (16). This likely reflects the fact that Snf1, contrary to its mammalian counterparts, is activated by ADP and not AMP (17). Yeast is therefore a very promising model to identify new AICAR targets and decipher the molecular mechanisms connecting AICAR monophosphate accumulation to its toxic effects. Here, we used a genetic approach to explore the molecular bases of AICAr sensitivity in this simple eukaryotic model. Our results revealed a link between AICAr sensitivity and thiamine metabolism and allowed us to identify Nrt1 as the major AICAr transporter in yeast.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Yeast Media and Strains—SD is a synthetic minimal medium containing 5% ammonium sulfate, 0.67% yeast nitrogen base

* This work was supported by Association de la Recherche contre le Cancer Grant SFI-2012-120-5915 (to B. D.-F.) and a grant from Ligue contre le Cancer du Périgord (to M. M.).

¹ Both authors contributed equally to this work.

² To whom correspondence should be addressed: Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, CNRS UMR 5095 1 rue C. Saint-Saëns CS 61390, F-33077 Bordeaux, France. Tel.: 33-556-999-019; Fax: 33-556-999-059; E-mail: benoit.pinson@ibgc.cnrs.fr.

³ The abbreviations used are: AICAR, 5-amino-4-imidazole carboxamide ribonucleotide 5'-phosphate; AICAr, 5-amino-4-imidazole carboxamide ribonucleoside; AMPK, AMP-activated protein kinase; ATIC, AICAR-transformylase IMP-cyclohydrolase; NmR, nicotinamide riboside; MEF, mouse embryonic fibroblast.

(Difco), 2% glucose. SDcasaW is SD medium supplemented with 0.2% casamino acids (Difco) and tryptophan (0.2 mM). When indicated, adenine (0.3 mM) and/or uracil (0.3 mM) were added in SDcasaW medium, resulting in a medium named SDcasaWA (+ adenine), and SDcasaWAU (+ adenine + uracil). SC medium was prepared as described by Sherman *et al.* (18). SC complete medium is SC medium supplemented with adenine (0.3 mM), uracil (0.3 mM), histidine (0.06 mM), leucine (0.4 mM), lysine (0.06 mM), and tryptophan (0.2 mM). Yeast strains (see Table 1) belong to, or are derived from, a set of disrupted strains isogenic to BY4741 or BY4742 purchased from Euroscarf. Multimutant strains were obtained by crossing, sporulation, and micromanipulation of meiosis progeny.

Cell Culture and Proliferation Assay—U87 (HTB-14) and A549 (CCL-185) cells were from ATCC. SF188 and SF126 cells were a generous gift from M. Czabanka (Charité Universitätsmedizin, Berlin, Germany). NHA/TS cells were kindly provided by K. Sasai and S. Tanaka (Hokkaido University, Sapporo, Japan). Huh7 cells were given by E. Chevet (University of Bordeaux, France). Wild-type or knock-out mouse embryonic fibroblasts (MEFs) for both AMPK α 1 and AMPK α 2 subunits (AMPK α 1/ α 2 KO) were generously provided by B. Viollet (Cochin Institute, INSERM, Paris, France). The cells were grown at 37 °C, 5% CO₂ in complete medium: DMEM containing 4.5 g/liter glucose and supplemented with 10% FBS, L-glutamine, and antibiotics. The WST-1 cell proliferation assay was performed in 96-well plates according to the manufacturer's instructions (Roche). Briefly, the cells were plated at 5,000 cells/cm² in 100 μ l of complete culture medium. After 24 h of incubation, AICAr and/or inhibitors were added in fresh medium at the indicated concentrations. WST-1 assay was performed after 3 days.

Plasmids—The *THI80* centromeric plasmid (p4878) was obtained by PCR amplification of the *THI80* gene using S288C genomic DNA as template and oligonucleotides 3730 (5'-CGCGGATCCCAACAAATTAAGCGGAGATC-3') and 3731 (5'-CCGCTCGAGCCTTACTTTAGAATGATGACTT-TAC-3'). The PCR product was digested with BamHI and XhoI and cloned in the pRS316 vector (19) digested with the same restriction enzymes. Plasmids allowing expression of the *THI7* or *THI72* genes under the control of a tetracycline repressible promoter were obtained by PCR amplification of the *THI7* or *THI72* coding regions using S288C genomic DNA as template and oligonucleotides 3176 (5'-CGCGGATCCAATATGAGT-TTCGGTAGTAAAG-3') and 3177 (5'-CCAATGCATCTAAGCAGCTTTTTTCACTGGC-3') for *THI7* or oligonucleotides 3178 (5'-CGCGGATCCATTATGAGTTTCGGTACGAGATC-3') and 3179 (5'-CCAATGCATTTAGGCAATTTGTT-TTTCCTACTGG-3') for *THI72*. PCR products were digested with BamHI and NsiI and were cloned in the pCM189 vector (tet_{Prom}, *CEN*, *URA3*) (20) digested with BamHI and PstI, resulting in the tet-*THI7* (p4678) and tet-*THI72* (p4680) plasmids. The *NRT1* overexpression plasmid p4926 (2 μ , *URA3*) was constructed by PCR amplification of *NRT1* using S288C genomic DNA as template and oligonucleotides 3825 (5'-CGCGGATCCCAAGACGGTTGGCAATAGGAG-3') and 3826 (5'-CCGGAATCCCCACCGGATTCTCTTGC-3'). The PCR product was digested with BamHI and EcoRI and cloned in

the YEpLac195 vector (21) digested with the same restriction enzymes. The *NRT1* centromeric plasmid p4980 (*CEN*, *URA3*) was obtained by transferring the BamHI/EcoRI fragment containing *NRT1* gene into YCpLac33 centromeric plasmid (21) opened with the same restriction enzymes. Finally, the *THI7prom*-LacZ fusion used for β GAL experiments (p4884) was obtained by PCR amplification of the *THI7* promoter using S288C genomic DNA as template and oligonucleotides 3625 (5'-CGCGGATCCTATGACCGTGTCAAGGCATCC-3') and 3626 (5'-ACGTCTGCAGCATATTGATATAATGCAATTG-GCTC-3'). The PCR product was digested with BamHI and PstI and was cloned in the Yep367 vector (2 μ , *LEU2*) (22) digested with the same restriction enzymes.

Isolation of AICAr Hypersensitive Mutants—To obtain AICAr-hypersensitive mutants, two *ade16 ade17 ade8 his1* strains (Y6986 and Y7242) were plated on SD casa WAU medium, mutagenized with UV light for 20 s, and then grown for 72 h at 30 °C. The resulting clones (64,000) were then transferred by replica plating on the same medium containing various AICAr concentrations (1 or 2 mM at 30 °C and 0.5 or 1 mM at 37 °C). Thereby, 27 AICAr hypersensitive mutants were isolated from the two yeast strains (17 from Y6986 and 10 from Y7242), and 3 of these mutants were further studied. Each mutant was crossed with an *ade16 ade17 ade8 his1* strain, and the meiotic progeny of the cross was phenotypically characterized. Genomic DNA extraction from pools of AICAr-resistant and -sensitive spores (see text for details) was carried out on cells grown to a final density of 5 \times 10⁷ cells/ml, as recommended by the genomic tips 100G kit supplier (Qiagen). Yeast genome resequencing and bioinformatics analyses were done by GATC Biotech (Konstanz, Germany). Once identified, mutations of interest in the mutant pools were verified on individual spores by Sanger sequencing (GATC Biotech).

Metabolite Extraction and Separation by Liquid Chromatography—Extraction of yeast metabolites was performed by the rapid filtration and ethanol boiling method as described (23). For mammalian cells, each extraction was done from one 78.5-cm² Petri dish containing subconfluent cells (< 10⁵ cells/cm²) grown in the complete medium. The cells were rapidly washed with 5 ml of ice-cold PBS, and then extraction was performed by incubation of cells for 5 min in 5 ml of ethanol (80%). The suspension was then transferred into a glass tube and incubated for 3 min at 80 °C. Samples were evaporated using a rotavapor device. The residue was suspended in sterile water (100 μ l/10⁷ cells), and insoluble particles were eliminated by centrifugation (1 h, 4 °C, 21,000 \times g). For both yeast and mammalian cells, metabolite separation was performed on an ICS3000 chromatography station (Dionex, Sunnyvale, CA) using a CarboPac PA1 column (250 \times 2 mm; Dionex) with the 50–800 mM acetate gradient in 50 mM NaOH described in Ref. 1. Peaks were identified by their retention time as well as by co-injection with standards and/or their UV spectrum signature. Of note, intracellular AICAr concentration is hardly measurable when adenosine kinase is present, and furthermore it is often contaminated by external AICAr (especially true for mammalian cells), so we routinely used AICAR accumulation as readout of AICAr entry.

AICAr Uptake in Yeast and Human Cells

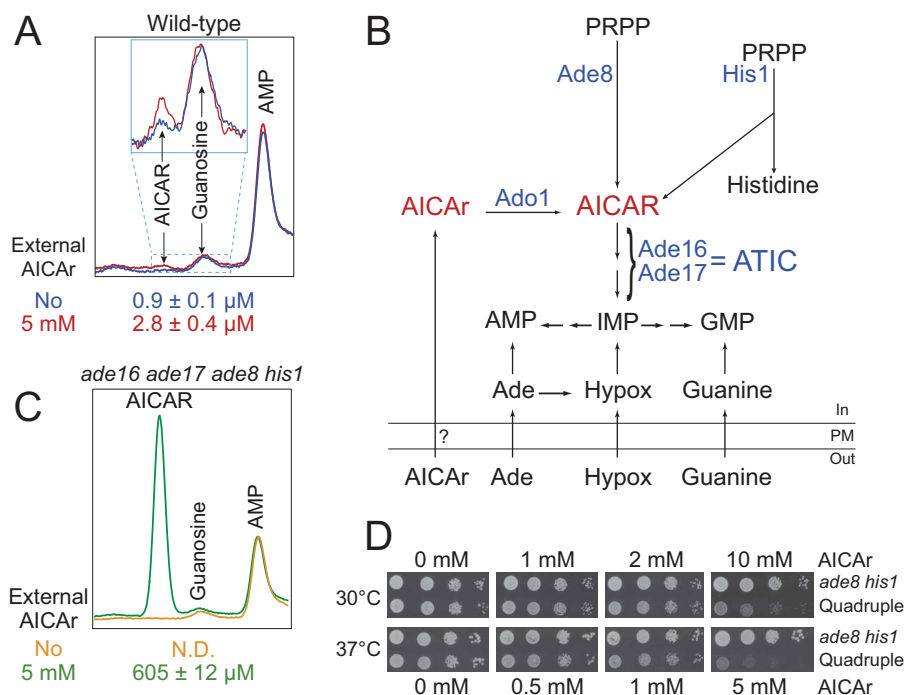


FIGURE 1. AICAR accumulation and toxicity in yeast. *A*, addition of extracellular AICAr does not result in a massive intracellular AICAR accumulation in yeast. After an overnight preculture, wild-type cells (Y175) were diluted and kept in exponential phase for 24 h in SDCasaWU medium. External AICAr (5 mM) was then added (red line) or not (blue line) for 20 min, and metabolites were extracted and separated by liquid chromatography (only the 60–65-min elution time region of the chromatogram is presented). AICAR intracellular concentration was determined by measuring yeast cell volume as described (1). The inset corresponds to a zoom of the indicated region. Internal AICAR values correspond to three independent extractions, and standard deviation is indicated. *B*, schematic representation of purine and histidine pathways in yeast. Ade, adenine; Hypox, hypoxanthine; PM, plasma membrane; PRPP, 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate. Only the enzymes mentioned in the text are shown (in blue). *C*, intracellular AICAR accumulation is strongly increased in the *ade16 ade17 ade8 his1* mutant. The cells (Y6986) were grown in SDCasaWU medium, treated (green line) or not (orange line) with AICAr (5 mM, 20 min), and the metabolites were extracted and separated as in Fig. 1A. Internal AICAR values correspond to three independent extractions, and standard deviation is indicated. N.D., not detectable. *D*, effect of external AICAr on growth of the *ade8 his1* (Y2660) or *ade16 ade17 ade8 his1* (Quadruple; Y6986) strains. The cells were grown overnight, serially diluted, and spotted on SDCasaWU medium containing external AICAr. Plates were imaged after an incubation of 2 days at the indicated temperature.

TABLE 1
Yeast strains

Strain name	Genotype
BY4741	MA Ta <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>
BY4742	MA Tα <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>
Y175	MA Ta <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0</i>
Y2660	MA Ta <i>ade8::kanMX4 his1::kanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0</i>
Y2950	MA Tα <i>ade16::kanMX4 ade17::kanMX4 ade8::kanMX4 his1::kanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0</i>
Y3188	MA Tα <i>ade16::kanMX4 ade17::kanMX4 ade8::kanMX4 his1::kanMX4 ado1::LEU2 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0</i>
Y6986	MA Tα <i>ade16::kanMX4 ade17::kanMX4 ade8::kanMX4 his1::kanMX4 his3Δ1::HIS3-LEU2 leu2Δ0 ura3Δ0</i>
Y7242	MA Ta <i>ade16::kanMX4 ade17::kanMX4 ade8::kanMX4 his1::kanMX4 his3Δ1::HIS3-URA3 leu2Δ0 ura3Δ0</i>
Y7314	MA Tα <i>pdcc2 (L634S) ade16::kanMX4 ade17::kanMX4 ade8::kanMX4 his1::kanMX4 his3Δ1::HIS3-LEU2 leu2Δ0 ura3Δ0</i>
Y7321	MA Tα <i>thi3 (S402F) ade16::kanMX4 ade17::kanMX4 ade8::kanMX4 his1::kanMX4 his3Δ1::HIS3-LEU2 leu2Δ0 ura3Δ0</i>
Y7506	MA Ta <i>thi80 (L90P) ade16::kanMX4 ade17::kanMX4 ade8::kanMX4 his1::kanMX4 his3Δ1::HIS3-URA3 leu2Δ0 ura3Δ0</i>
Y8750	MA Ta <i>thi7::KanMX4 ade16::kanMX4 ade17::kanMX4 ade8::kanMX4 his1::kanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0</i>
Y8755	MA Ta <i>thi72::KanMX4 ade16::kanMX4 ade17::kanMX4 ade8::kanMX4 his1::kanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0</i>
Y8843	MA Ta <i>pdcc2 (L634S) ade16::kanMX4 ade17::kanMX4 ade8::kanMX4 his1::kanMX4 his3Δ1::HIS3-URA3 leu2Δ0 ura3Δ0</i>
Y8845	MA Tα <i>thi80 (L90P) ade16::kanMX4 ade17::kanMX4 ade8::kanMX4 his1::kanMX4 his3Δ1::HIS3-URA3 leu2Δ0 ura3Δ0</i>
Y8848	MA Ta <i>thi3 (S402F) ade16::kanMX4 ade17::kanMX4 ade8::kanMX4 his1::kanMX4 his3Δ1::HIS3-URA3 leu2Δ0 ura3Δ0</i>
Y9116	MA Tα <i>nrt1::KanMX4 ade16::kanMX4 ade17::kanMX4 ade8::kanMX4 his1::kanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0</i>
Y9188	MA Ta <i>nrt1::KanMX4 thi7::KanMX4 thi72::KanMX4 ade16::kanMX4 ade17::kanMX4 ade8::kanMX4 his1::kanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0</i>
Y9437	MA Ta <i>thi80 (L90P) nrt1::KanMX4 ade16::kanMX4 ade17::kanMX4 ade8::kanMX4 his1::kanMX4 his3Δ1::HIS3-URA3 leu2Δ0 ura3Δ0</i>

AICAr Uptake—Yeast cells were exponentially grown ($<2 \times 10^7$ cells/ml) for 24 h before being harvested by centrifugation ($3,200 \times g$, 2 min, 30 °C). The cells were then suspended ($4\text{--}5 \times 10^7$ cells/ml) in 1 ml of uptake buffer (50 mM sodium citrate, pH 4.5, containing 2% glucose) prewarmed at 30 °C and were kept under agitation at this temperature. Uptake was started by the addition of [3 H]AICAr (100 μM final concentration; 925 MBq/mmol; Hartmann analytic). As a function of time (up to 15 min),

aliquots (300 μl of cell suspension) were harvested by filtration (nitrocellulose membranes, 0.8 μm; Millipore), filters were then washed twice with 3 ml of cold water and dried, and the retained radioactivity was determined by scintillation counting. AICAr uptake (pmol/min/ 10^7 cells) was calculated by linear regression of the [3 H]AICAr incorporated as function of time.

Miscellaneous Methods—Yeast growth test and βGAL assays were performed as described in Refs. 24 and 25, respectively.

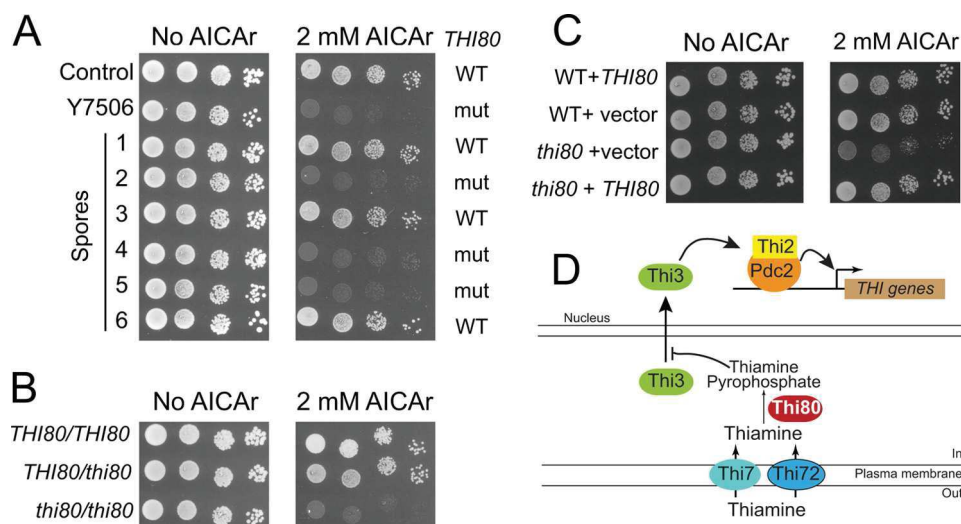


FIGURE 2. The S90P recessive mutation in the *THI80* gene is responsible for AICAr hypersensitivity of the Y7506 mutant strain. *A*, the *thi80* mutation is genetically linked to AICAr sensitivity. The cells were grown overnight, serially diluted, and spotted on SDcasaWAU medium containing external AICAr. Parental strains *ade16 ade17 ade8 his1* either mutated (Y7506) or not (control, Y7242) in the *THI80* gene, and six derived spores are shown. The plates were imaged after 3 days at 37 °C. WT and mut, respectively, stand for wild-type (*THI80*) and mutated (*thi80*) versions of thiamine pyrophosphate kinase gene, as determined by sequencing. *B*, the *thi80* (S90P) mutation leading to AICAr sensitivity is recessive. Diploid *ade16 ade17 ade8 his1* strains mutated (*thi80*) or not (*THI80*) in thiamine pyrophosphate kinase gene were grown, diluted, and spotted on SDcasaWAU medium as in Fig. 2*A*. *C*, complementation by the wild-type *THI80* gene. Haploid *ade16 ade17 ade8 his1* strains (WT, Y7242; or *thi80*, Y7506) were transformed with a centromeric plasmid expressing (*THI80*) or not (vector) a wild-type copy of *THI80*. Transformants were grown, diluted, and spotted on SDcasaWAU medium as in Fig. 2*A*. In *A*–*C*, the plates were imaged after 3 days at 37 °C. *D*, schematic representation of thiamine metabolism and resulting regulation of *THI* gene expression.

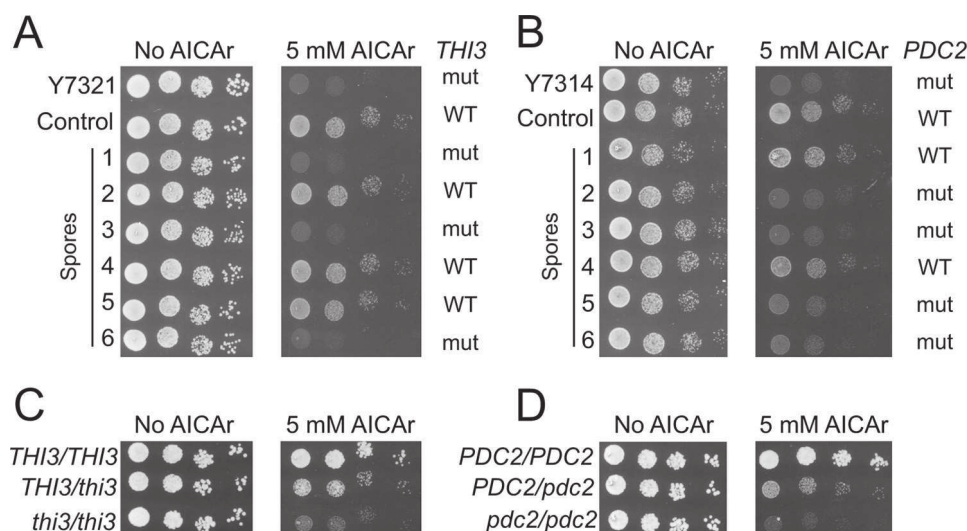


FIGURE 3. Mutations in *THI3* and *PDC2* lead to AICAr sensitivity. *A* and *B*, mutations in *THI3* (*A*) and *PDC2* (*B*) are linked to AICAr hypersensitivity. The cells were grown overnight, serially diluted, and spotted on SDcasaWAU medium containing external AICAr. Strains correspond to *ade16 ade17 ade8 his1* parental cells mutated (*thi3*, Y7321; or *pdc2*, Y7314) or not (control, Y6986) and to derived spores. The plates were imaged after 3 days at 30 °C. WT and mut, respectively, stand for wild-type and mutated versions of either *THI3* or *PDC2* gene as determined by sequencing of the corresponding gene. *C* and *D*, mutations in *THI3* (*C*) and *PDC2* (*D*) are haploinsufficient or semidominant. Diploid *ade16 ade17 ade8 his1* strains each carrying the indicated combination of mutated (*thi3* or *pdc2*) and wild-type (*THI3* or *PDC2*) alleles were grown, diluted, and spotted on SDcasaWAU medium. The plates were imaged after 48 h at 30 °C.

Nicotinamide riboside (NmR) was prepared by dephosphorylation of nicotinamide mononucleotide (Sigma-Aldrich) as described (26).

RESULTS

Accumulation of Intracellular AICAR in Yeast—We first aimed at identifying experimental conditions allowing AICAR accumulation in yeast. Clearly, addition of AICAr (the riboside form) to the growth medium did not result in massive intracellular AICAR (the monophosphate form) accumulation in a wild-type yeast strain (Fig. 1*A*). This could be due to poor

uptake of AICAr, inefficient metabolism to the monophosphate form by Ado1 and/or to highly active metabolism of AICAR to IMP by ATIC (AICAR transformylase IMP cyclohydrolase) (Fig. 1*B*). The latter possibility was evaluated by monitoring AICAR accumulation in a quadruple *ade16 ade17 ade8 his1* mutant unable to synthesize AICAR and to further metabolize it to IMP, because it is blocked upstream and downstream in the pathway (Fig. 1*B*). By contrast to the wild-type strain, in the quadruple *ade16 ade17 ade8 his1* mutant AICAr feeding led to robust AICAR accumulation (Fig. 1*C*). This result shows that yeast cells can take up external AICAr and accumulate

AICAR Uptake in Yeast and Human Cells

AICAR in strains lacking ATIC activity. Accordingly, AICAR was toxic at high concentration in the *ade16 ade17 ade8 his1* mutant but not in the *ade8 his1* mutant that has wild-type ATIC activity (Fig. 1D). Of note, for an unknown reason, AICAR was significantly and reproducibly more toxic at 37 °C than at 30 °C (Fig. 1D). At low concentrations (up to 2 mM at 30 °C and 1 mM at 37 °C), the quadruple *ade16 ade17 ade8 his1* mutant was resistant to AICAR (Fig. 1D). These subtoxic concentrations were hereafter used to isolate and characterize yeast mutants that are hypersensitive to AICAR. The *ade16 ade17 ade8 his1* yeast strain, which can accumulate AICAR, was mutagenized, and several AICAR hypersensitive mutants that grew poorly in the presence of low concentrations of AICAR were isolated (see “Experimental Procedures” for details). Three of these mutants, corresponding to strains Y7314, Y7321, and Y7506 (Table 1), were further studied and are presented below.

AICAR-hypersensitive Mutants Are Affected in Thiamine Metabolism—The Y7506 mutant strain, presenting a severe growth defect in the presence of AICAR (Fig. 2A) was backcrossed to an *ade16 ade17 ade8 his1* strain. Among the spores resulting from meiosis, AICAR hypersensitivity segregated 2:2 in nine tetrads, indicating that AICAR sensitivity of this mutant is a monogenic character. Genomic DNA extracted from 10 AICAR hypersensitive spores was mixed and sequenced. In parallel, the genomes of a mix of 7 spores showing wild-type AICAR sensitivity were sequenced. Comparison of these genome sequences to the S288c reference genome allowed us to identify one single-nucleotide polymorphism only found in the genome mix from AICAR sensitive spores. This single-nucleotide polymorphism corresponded to a T269C mutation in the *THI80* gene, resulting in a leucine to proline substitution at position 90 in the Thi80 protein. Sequencing of the *THI80* gene in the parental strain and in the AICAR-sensitive mutant confirmed that this mutation was indeed present in the mutant and absent in the control and was the only mutation in this open reading frame. This L90P substitution was found in all 10 hypersensitive AICAR segregants and in none of the 7 spores showing wild-type resistance to AICAR (see examples spores 1–6 in Fig. 2A). The mutation was clearly recessive (Fig. 2B), and AICAR hypersensitivity could be complemented by the wild-type *THI80* gene carried on a centromeric plasmid (Fig. 2C). We conclude that the L90P substitution in Thi80 results in hypersensitivity to AICAR in yeast cells. *THI80* is an essential gene encoding thiamine pyrophosphokinase the enzyme synthesizing thiamine pyrophosphate from thiamine (Fig. 2D). Because *THI80* is essential for viability and because the mutation is recessive, the L90P substitution most probably results in a partial loss of function that confers hypersensitivity to AICAR.

Two additional AICAR hypersensitive mutants were characterized by analogous methods. Genome sequencing revealed that the Y7321 mutant strain carried a C1205T mutation located in the *THI3* gene that co-segregated perfectly with AICAR hypersensitivity in 14 spores and in none of the 13 AICAR-insensitive spores (Fig. 3A). This mutation resulted in a S402F substitution in Thi3, a regulatory protein that binds and activates the Pdc2p and Thi2p transcription factors (Fig. 2D). Finally, the Y7314 mutant strain was found to carry a T1901C

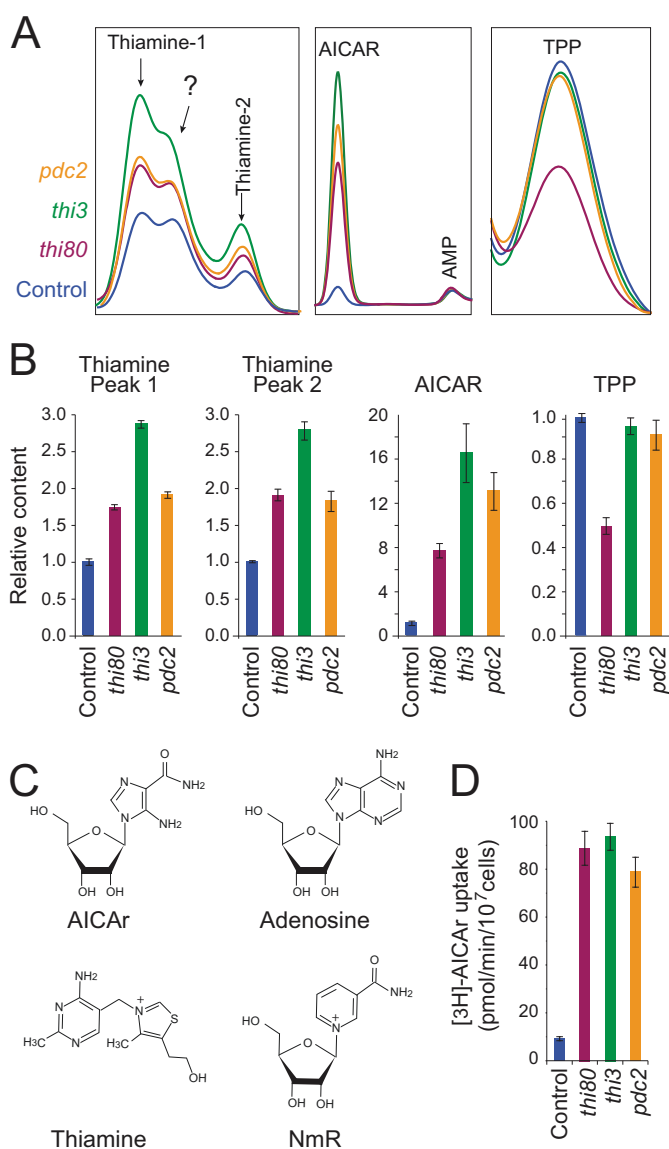


FIGURE 4. Intracellular concentration of thiamine and AICAR are higher in the AICAR-hypersensitive mutants. A, metabolic analysis of AICAR and thiamine derivatives in the AICAR-sensitive mutants. After an overnight preculture, cells were diluted and kept in exponential phase for 24 h in SDcasaWU medium containing AICAR (0.5 mM). Metabolites were then extracted and separated by liquid chromatography. TPP, thiamine pyrophosphate. The question mark corresponds to an unidentified peak. B, relative intracellular content of thiamine and AICAR derivatives. Quantifications were determined from at least three independent metabolite extractions and separations for each strain (control, Y6986; *thi80*, Y7506; *thi3*, Y7321; *pdc2*, Y7314), and error bars indicate variations to the mean. For each metabolite, content of the control strain (blue bar) was set at 1. C, chemical structure of adenosine, AICAR, NmR, and thiamine. D, AICAR uptake is strongly enhanced in the AICAR-hypersensitive mutants. The cells were exponentially grown for 24 h in SDcasaWU medium, and [³H]AICAR uptake was determined from at least two independent kinetics, as described under “Experimental Procedures.” The error bars indicate variations to the mean. Control, Y6986; *thi80*, Y8845; *thi3*, Y7321; *pdc2*, Y7314.

mutation in the *PDC2* gene co-segregating with AICAR hypersensitivity in 7 spores and in none of the 7 AICAR-insensitive spores (Fig. 3B). This mutation resulted in a L634S replacement in Pdc2, a transcriptional factor activating the thiamine metabolism regulon when thiamine pyrophosphate (the product of Thi80) is scarce (Fig. 2D). Importantly the *thi3* and *pdc2* heterozygote strains were still partially sensitive to AICAR, sug-

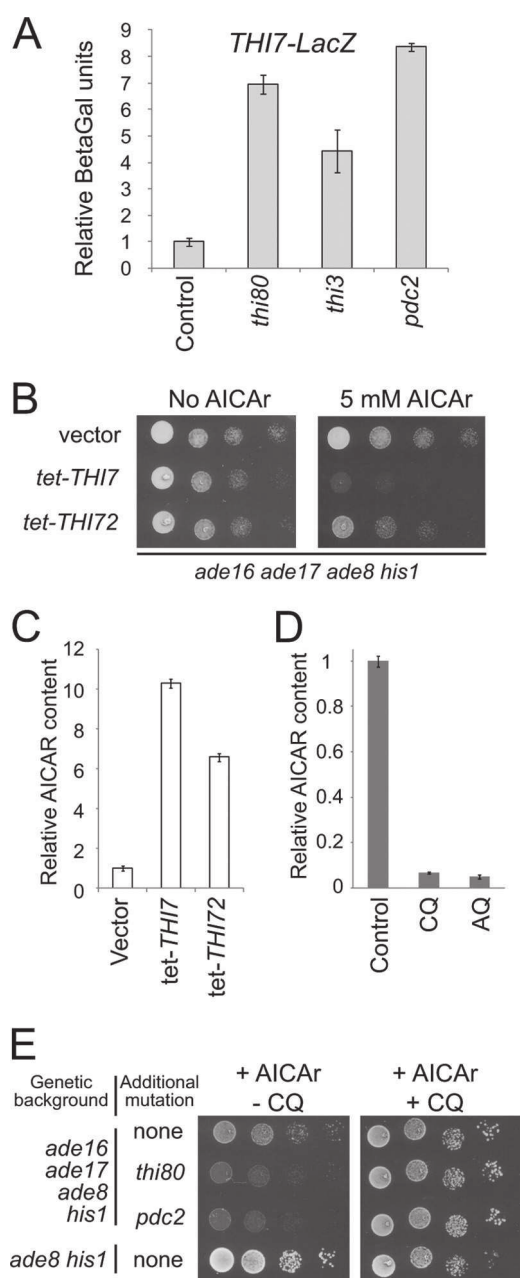


FIGURE 5. AICAr accumulation and toxicity correlates with thiamine transporter expression and activity. *A*, *THI7* expression is increased in AICAr-sensitive mutants. The *ade16 ade17 ade8 his1* cells (control, Y7242; *thi80*, Y8845; *thi3*, Y8848; *pdc2*, Y8843) transformed with a *THI7-LacZ* fusion plasmid (p4884) were grown in SC-U-L medium to $A_{600\text{ nm}} = 1$. Relative β -Gal activities were measured as described under experimental procedures and are given using the Y7242 strain as reference (set up at 1). *B*, overexpression of thiamine transporter genes leads to AICAr hypersensitivity. The *ade16 ade17 ade8 his1* (Y6986) strain was transformed with a plasmid allowing or not (vector) the overexpression of either *THI7* (p4678) or *THI72* (p4680) gene. Transformants were diluted and spotted on SDcasaWA medium containing or not AICAr. The plates were imaged after 2 days at 30 °C. *C*, intracellular AICAr accumulation is enhanced by overexpression of thiamine carriers. Transformants from Fig. 5*B* were grown and treated with AICAr (5 mM) for 20 min, and metabolites were extracted and separated as in Fig. 1*A*. Internal AICAr values correspond to three independent determinations, and *error bars* indicate variations to the mean. AICAr content in the strain containing the empty vector was set up at 1. *D*, treatment with inhibitors of thiamine transporters severely affects AICAr accumulation. Intracellular AICAr content was determined on metabolites extracts from *ade16 ade17 ade8 his1* cells (Y6986) grown in SDcasaWAU medium and incubated for 20 min with external AICAr (5 mM) as in Fig. 1*A*. Chloroquine (CQ, 2 mM) or amodiaquine (AQ, 100 μ M) were added 1 min before AICAr addition. The results correspond to at least four

gesting haploinsufficiency or semidominance (Fig. 3, *C* and *D*). Identification of these three mutations thus revealed a strong connection between thiamine metabolism and AICAr sensitivity.

Accumulation of AICAr and Thiamine in the AICAr-hypersensitive Mutants—To get a better understanding of the mechanisms leading to AICAr hypersensitivity in these mutants, the effects of AICAr on the *thi80*, *thi3*, and *pdc2* mutant strains were further examined by analytical chromatography. Mutant and control strains showed similar metabolic profiles except for intracellular content of AICAr and thiamine derivatives (Fig. 4, *A* and *B*). The major effect associated with AICAr addition in the mutants compared with the control strain was accumulation of AICAr monophosphate (Fig. 4, *A* and *B*). This result indicates that the hypersensitivity of the three mutants to AICAr is likely to be due to increased accumulation of the monophosphate derivative, which is likely to be the toxic form, as previously suggested by the absence of toxicity of AICAr in an adenosine kinase mutant (1). Remarkably, the three mutants accumulated thiamine (Fig. 4, *A* and *B*), whereas the thiamine pyrophosphate level was reduced in the *thi80* mutant in good consistence with the role of Thi80 in thiamine metabolism (Fig. 2*D*). Together, these results indicated that both thiamine and AICAr uptake could be enhanced in these mutants. Thiamine is known to strongly interfere with adenosine uptake in yeast (27), and AICAr is structurally close to adenosine (Fig. 4*C*) and is metabolized by adenosine kinase (1). Hence, AICAr-hypersensitive mutations could somehow increase AICAr uptake, thereby exacerbating sensitivity to AICAr. Indeed, AICAr uptake was strongly enhanced in the three mutant strains (Fig. 4*D*). We thus further examined how mutations affecting Thi80, Thi3, and Pdc2 could impact on this process.

Overexpression of Thiamine Transporters Results in AICAr Hypersensitivity—It should be stressed that thiamine pyrophosphate (the product of Thi80), Thi3, and Pdc2 play a major regulating role on the transcriptional expression of the thiamine regulon (Fig. 2*D*), including the *THI7* gene encoding the major thiamine transporter (28). Mutations isolated in our AICAr-hypersensitive mutant screen could therefore affect expression of the thiamine regulon. Indeed, a *lacZ* fusion driven by the *THI7* promoter was found up-regulated in all three *thi80*, *thi3*, and *pdc2* AICAr-hypersensitive mutants (Fig. 5*A*). Together our results showing stimulation of Thi7 expression and concomitant accumulation of AICAr and thiamine in the mutant cells pointed to a connection between thiamine and AICAr uptake by Thi7. Accordingly, constitutive overexpression of the thiamine transporter Thi7 enhanced AICAr sensitivity of the *ade16 ade17 ade8 his1* yeast strain (Fig. 5*B*) and AICAr monophosphate accumulation (Fig. 5*C*). Similar results were obtained, although to a lesser extent, by overexpressing Thi72, a paralog of Thi7 (Fig. 5, *B* and *C*). Finally, AICAr accumulation was severely reduced in yeast cells treated with thia-

independent metabolite extractions, and *error bars* indicate variations to the mean. AICAr content found in absence of inhibitor was set up at 1. *E*, chloroquine abolishes AICAr sensitivity of *thi80* and *pdc2* mutants. The cells were grown overnight, serially diluted, and spotted on SDcasaWAU medium containing external AICAr (5 mM) and supplemented or not with chloroquine (2 mM). The plates were imaged after 2 days at 30 °C.

AICAr Uptake in Yeast and Human Cells

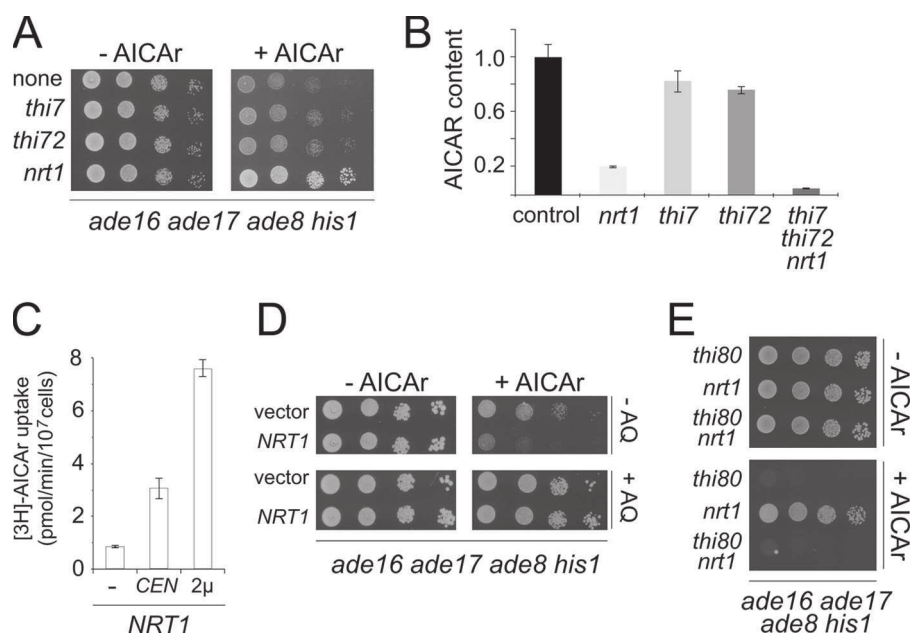


FIGURE 6. Nrt1 is the major AICAr transporter in yeast. A, deletion of *NRT1* alleviates the growth defect of an *ade16 ade17 ade8 his1* strain on AICAr. The cells were grown overnight, serially diluted, and spotted on SDcasaWU medium containing or not external AICAr (5 mM). All strains are in an *ade16 ade17 ade8 his1* genetic background and carry the indicated additional knock-out (none, Y2950; *thi7*, Y8750; *thi72*, Y8755; *nrt1*, Y9116). The plates were imaged after 2 days at 37 °C. B, AICAr accumulation is severely decreased in the absence of *NRT1*. Relative intracellular AICAr contents were determined on metabolite extracts from strains grown in SD casaWU medium and treated with external AICAr as in Fig. 1A. The amounts of AICAr found in the *ade16 ade17 ade8 his1* strain (control, Y2950; content set up at 1) and isogenic mutant strains *nrt1* (Y9116), *thi7* (Y8750), *thi72* (Y8755), and *thi7 thi72 nrt1* (Y9188) are presented. C, AICAr uptake correlates with Nrt1 expression level. Triple mutant cells (*thi7 thi72 nrt1*; Y9188) were transformed with vectors allowing or not (–) expression of the *NRT1* gene (CEN, centromeric plasmid: p4980; 2μ, multicopy plasmid: p4926). Transformants were exponentially grown for 24 h in SDcasaWA medium, and [³H]AICAr uptake was calculated from at least two independent kinetics. The error bars indicate variations to the mean. D, overexpression of *NRT1* increases AICAr sensitivity. The *ade16 ade17 ade8 his1* strain (Y2950) was transformed with a multicopy plasmid (p4926) allowing overexpression of *NRT1*. Transformants were grown overnight, serially diluted, and spotted on SDcasaWA medium containing external AICAr (5 mM) and in the presence or not of amodiaquine (AQ, 100 μM). The plates were imaged after 2 days at 37 °C. E, AICAr hypersensitivity of *thi80* mutant is independent of the presence of *NRT1* gene. The cells were grown overnight, serially diluted, and spotted on SDcasaWU medium containing or not external AICAr (2 mM). All strains are in an *ade16 ade17 ade8 his1* genetic background and carry the indicated additional knock-out (*thi80*, Y7506; *nrt1*, Y9116; *thi80 nrt1*, Y9437). The plates were imaged after 2 days at 37 °C.

mine uptake inhibitors (chloroquine and amodiaquine) (29) (Fig. 5D), and AICAr toxicity *in vivo* was abolished by chloroquine (Fig. 5E). Together, our data show that increased expression of the thiamine transporters Thi7 and its paralog Thi72 results in robust stimulation of AICAr uptake in yeast cells. In addition, our results establish that AICAr uptake is limiting for AICAr toxicity in yeast cells and that the thiamine carriers are involved in AICAr uptake in the AICAr-hypersensitive mutants.

The Nicotinamide Riboside Transporter Nrt1 Is the Major AICAr Transporter in Yeast—Because our results indicated that AICAr sensitivity of the *thi80*, *pdc2*, and *thi3* mutants was linked to enhanced AICAr uptake through Thi7 and Thi72, we evaluated the effect on AICAr toxicity of mutations in the thiamine transporter genes. Surprisingly, knock-out of *thi7* or *thi72* only very slightly increased resistance to AICAr (Fig. 6A), thus suggesting that AICAr could be taken up by other means. We hence explored the possible involvement of Nrt1 (previously identified as Thi71), a third transporter structurally related to Thi7, capable of taking up thiamine with low affinity (30) and known to be sensitive to chloroquine (29). Nrt1 is the major transporter of NmR (31), a precursor of NAD(H). Knock-out of *nrt1* efficiently protected *ade16 ade17 ade8 his1* cells from toxic effects of AICAr (Fig. 6A), thus suggesting that Nrt1 is responsible for most AICAr uptake under thiamine replete conditions (classical yeast growth media). This prediction was

directly assayed by comparing AICAr accumulation in mutants lacking Thi7, Thi72, Nrt1, or all three transporters. Although AICAr accumulation was only slightly affected by the *thi7* or *thi72* mutations, it was strongly diminished in the *nrt1* mutant and almost fully abolished in the triple mutant (Fig. 6B), thus pointing to a major role for Nrt1 in AICAr uptake.

The role of Nrt1 in AICAr uptake was established by showing that reintroduction of the *NRT1* gene carried on a centromeric plasmid in the septuple *ade16 ade17 ade8 his1 thi7 thi72 nrt1* mutant resulted in a robust enhancement of AICAr uptake, which was even further stimulated by overexpression of *NRT1* on a multicopy plasmid (Fig. 6C). Consistently, increased AICAr sensitivity was associated with overexpression of *NRT1* (Fig. 6D), an effect that was fully reversed by amodiaquine (Fig. 6D). Finally, we established that the hypersensitivity of the *thi3*, *thi80*, and *pdc2* mutants was not dependent on Nrt1, because these mutants were still sensitive to AICAr even in the absence of the *NRT1* gene (Fig. 6E and data not shown). Together, these experiments establish that Nrt1 is the major AICAr transporter in yeast.

AICAr Uptake in Mammalian Cells—Based on our results obtained in yeast, we wished to investigate AICAr uptake in human cells. We first showed that addition of AICAr was sufficient to trigger AICAR monophosphate accumulation in several cells lines, although substantial disparities among them were observed (Fig. 7A). We then used SF188 cells, in which

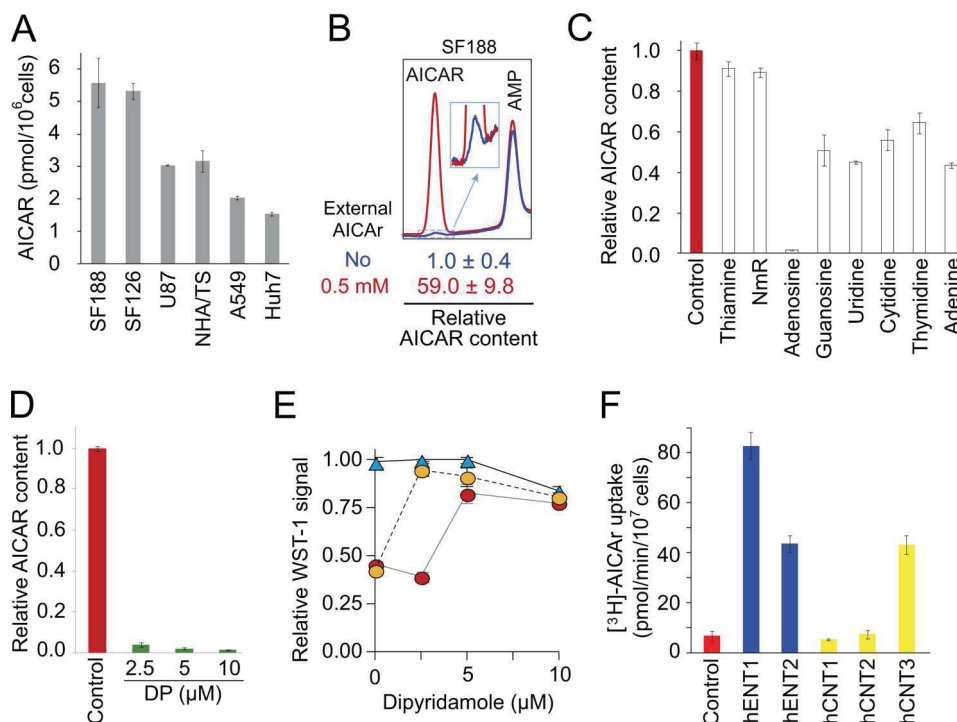


FIGURE 7. AICAr uptake occurs through adenosine transport systems in human cells. *A*, AICAr accumulation in various human cell lines. The cells grown in complete medium were treated with external AICAr (250 μM) for 12 h, and metabolites were extracted and separated by liquid chromatography as described under "Experimental Procedures." The tissular origin of the different human cell lines is as follows: SF188, pediatric glioblastoma; U87 and SF126, adult glioblastomas; NHA/TS, immortalized astrocytes; A549, lung carcinoma; Huh7, hepatocellular carcinoma. *B*, SF188 cells accumulate AICAr when incubated with AICAr. The cells were treated (red line) or not (blue line) with external AICAr (500 μM) for 20 min, and metabolites were extracted and separated by liquid chromatography. The inset corresponds to a zoom of the indicated region. AICAr content in the absence of external AICAr was set up at 1. *C*, effect of various compounds on intracellular AICAr accumulation. Relative AICAr content was determined in SF188 cells grown and treated with external AICAr as in Fig. 7*B* and in the presence or the absence (control, set up at 1) of potential AICAr uptake competitors (100 μM each) added 1 min before AICAr treatment (500 μM, 20 min). *D*, dipyridamole alleviates AICAr accumulation in SF188 cells. Relative AICAr content was determined after metabolite extractions of cells grown and treated with AICAr (500 μM, 20 min) as in Fig. 7*B*, but in the absence (control, set up at 1) or presence of increasing concentrations of the nucleoside transporter inhibitors dipyridamole (DP) added 1 min before AICAr. *E*, dipyridamole protects SF188 cells against AICAr toxicity. Cell proliferation was determined by using the WST-1 colorimetric assay on SF188 cells grown for 3 days in the absence (blue triangles) or in the presence of 0.3 mM (orange circles) or 1 mM (red circles) of external AICAr and in the presence or not of dipyridamole. WST-1 signal obtained in the absence of both AICAr and inhibitors was set up at 1. *F*, expression of the human nucleoside transporters hENT1, hENT2, and hCNT3 enhances AICAr uptake in yeast. Yeast cells (KY114 (38) expressing or not (control) the various human nucleoside transporters (hENT1, SLC29A1; hENT2, SLC29A2; hCNT2, SLC28A2; hCNT3, SLC28A3)) were exponentially grown for 24 h in SD_{case}WA medium prior to [³H]AICAr uptake measurements determined as in Fig. 4*D*. *A–F*, in all panels, values correspond to at least three independent determinations, and error bars indicate variations to the mean.

AICAr addition resulted in a 60-fold increase in intracellular AICAr level (Fig. 7*B*), to examine whether AICAr accumulation was competed by addition of thiamine or NmR, which are the substrates of yeast AICAr transporters. Clearly, neither thiamine nor NmR affected AICAr accumulation in SF188 cells (Fig. 7*C*). By contrast, nucleosides and in particular adenosine strongly affected AICAr accumulation (Fig. 7*C*), suggesting that nucleoside transporters could be involved in AICAr uptake in human cells. Previous work showed that dipyridamole, an inhibitor of nucleoside uptake, could abolish the effects of AICAr addition on neuroblastoma cells (8, 9). Indeed, we found that dipyridamole strongly inhibited AICAr accumulation (Fig. 7*D*). Accordingly, dipyridamole alleviates AICAr-induced cytotoxic effect on SF188 cells in a dose-dependent manner (Fig. 7*E*). Yeast strains each expressing one single type of human nucleoside transporter were then used to evaluate the ability of individual transporters to take up AICAr. Clearly, hENT1, hENT2, and hCNT3 could efficiently take up AICAr (Fig. 7*F*). These results strongly substantiate the conclusion that AICAr uptake is mediated by nucleoside transporters in mammalian cells.

Importantly, neither AICAr accumulation (Fig. 8*A*) nor AICAr effects on cell proliferation (Fig. 8*B*) were affected in AMPK α 1/ α 2 double knock-out murine embryonic fibroblasts, when compared with wild-type cells. Accordingly, AICAr toxicity in these cell lines was comparable and was similarly suppressed by dipyridamole treatment (Fig. 8, *C* and *D*). Together, these results demonstrate that the anti-proliferative effects of AICAr are not AMPK-dependent.

DISCUSSION

Our screen for AICAr hypersensitive mutants in yeast revealed that three mutations affecting the regulation of thiamine metabolism strongly impact on AICAr accumulation in yeast cells. Importantly, all three mutations result in up-regulation of *THI7* encoding the thiamine high affinity transporter. Our results establish that overexpression of *THI7* under control of a heterologous promoter indeed mimics these mutants by increasing sensitivity to AICAr and resulting in higher AICAr intracellular concentration, yet we also show that knock-out of *THI7* or *THI72* only slightly affects AICAr sensitivity in yeast, indicating that, under standard growth conditions (when thia-

AICAR Uptake in Yeast and Human Cells

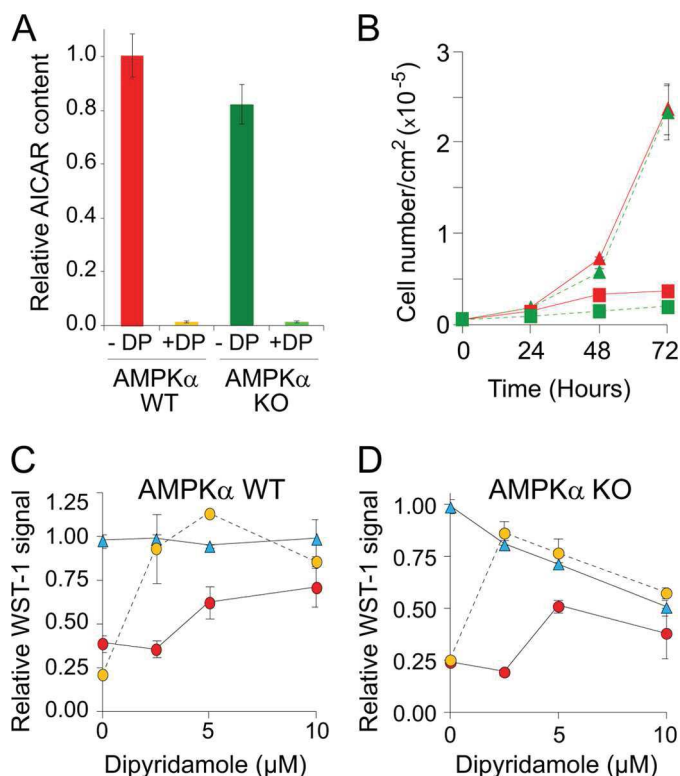


FIGURE 8. AICAR uptake and AICAR toxicity are AMPK-independent in mouse fibroblasts. *A*, the AMPK catalytic subunits $\alpha 1$ and $\alpha 2$ are not required for AICAR accumulation in MEFs. Relative AICAR content was determined in MEF double knock-out (AMPK α KO stands for AMPK $\alpha 1/\alpha 2$ KO) or not (AMPK α WT) in AMPK α genes. The cells were grown and treated with external AICAR as in Fig. 7B and in the presence (+DP) or the absence (-DP) of dipyrindamole (2.5 μ M) added 1 min before AICAR treatment (500 μ M, 20 min). AICAR content was set up at 1 for WT MEF in the absence of DP. *B*, AICAR effect on cell proliferation is not altered in the absence of AMPK- $\alpha 1$ and - $\alpha 2$ catalytic subunits. Cell proliferation was measured using WT cells (red curves) or AMPK $\alpha 1/\alpha 2$ KO cells (green curves) MEF grown for 3 days in the presence (squares) or the absence (triangles) of AICAR (1 mM). *C* and *D*, dipyrindamole protects MEF against AICAR toxicity in an AMPK-independent manner. Cell proliferation was determined using the WST-1 test on wild-type and AMPK α KO MEFs grown for 3 days in the absence (blue triangles) or in the presence of either 0.3 mM (orange circles) or 1 mM (red circles) of external AICAR and in the presence or not of dipyrindamole. *A–D*, in all panels, values correspond to at least three independent determinations, and errors bars indicate variations to the mean.

mine is replete), these transporters are most probably poorly expressed and marginally contribute to AICAR uptake. We thus tested a third transporter, named Nrt1, suspected to contribute to thiamine uptake (30) and also identified as sensitive to chloroquine (29), a drug that we have shown to inhibit AICAR uptake in yeast (Fig. 5D). Clearly, deletion of *NRT1* resulted in robust resistance to AICAR and impaired AICAR accumulation, suggesting that Nrt1, by opposition to Thi7, is functional under standard growth conditions. We conclude that Nrt1, the main NmR transporter in yeast (31), is also the major AICAR transporter under standard growth conditions.

Accumulation of intracellular AICAR in yeast and mammalian cells was clearly very different. Indeed, by contrast to human SF188 cells (Fig. 7A), no significant intracellular AICAR accumulation was observed in wild-type yeast cells after addition of AICAR to the growth medium (Fig. 1A). This difference between species could be due to poor AICAR uptake in yeast, to

its inefficient phosphorylation to AICAR by adenosine kinase, and/or to vigorous AICAR metabolism to IMP by ATIC. Indeed, mutations in the yeast ATIC coding genes resulted in a drastic enhancement of AICAR accumulation (Fig. 1C), thus indicating that the low AICAR accumulation in the wild-type strain was, in part, due to its efficient metabolism to IMP by ATIC. By contrast, this also suggested that AICAR accumulation in mammalian cells results from the fact that ATIC was not active enough to metabolize all the AICAR synthesized from the precursor. The steady state AICAR accumulation, which reflects the balance between AICAR entry and utilization, varied significantly from one cell line to another (Fig. 7A). Importantly, in human SF188 cells, AICAR uptake was not affected by thiamine or NmR but instead was decreased in the presence of nucleosides in the growth medium. Accordingly AICAR accumulation was inhibited by dipyrindamole, an inhibitor of adenosine transport, and dipyrindamole significantly reduced the effect of AICAR on cell proliferation, as previously reported for undifferentiated human neuroblastoma cells (SH-SY5Y) (9). We identified three nucleoside transporters, namely hENT1, hENT2, and hCNT3, as AICAR transporters. The nucleoside transporters constitute a multiprotein family with two subgroups (32): SLC28A (three members, hCNT1–3) and SLC29A (four members, hENT1–4), with each transporter presenting various substrate specificity and sensitivity to inhibitors (32). The remaining members of the family were not able to stimulate AICAR uptake in yeast (hCNT1 and hCNT2, Fig. 7F) or are unlikely to play a major role in AICAR uptake. Indeed, hENT3 is a lysosomal protein, and hENT4 is highly resistant to dipyrindamole (33). By contrast, yeast cells do not have a dedicated adenosine transport system and can only inefficiently take up adenosine (34). Interestingly thiamine is known to strongly interfere with adenosine uptake in yeast (27), as well as with entry of the nucleoside analog cordicepin (27). Thus, yeast thiamine transporters are thought to be responsible for most of adenosine uptake and are also involved in AICAR uptake (Fig. 6B). Importantly, AICAR uptake in yeast is far less efficient than it is in mammalian cells. Indeed, a 10-fold higher concentration of extracellular AICAR was required in yeast cells (5 mM) compared with human and mouse cells (0.5 mM) to achieve comparable levels of intracellular AICAR accumulation. The yeast and human AICAR uptake systems thus appear clearly distinct. In addition, the yeast AICAR transporter Nrt1 does not have any identified ortholog in human cells (31), and neither the SLC19A2 nor the SLC19A3 human thiamine transporters (35, 36) enhanced AICAR uptake when expressed in yeast.⁴ However, despite these differences, AICAR uptake occurs through adenosine transport systems in both yeast and human cells.

Importantly, our results also demonstrate that AICAR accumulation is normal in AMPK $\alpha 1/\alpha 2$ KO embryonic fibroblasts. In addition, the anti-proliferative effects of AICAR are not affected in the same cells. Thus, these effects are not AMPK-dependent. This result is in good agreement with recently published work by others (37) and uncovers the acute necessity to

⁴ M. Moenner and B. Pinson, unpublished results.

identify the AICAR targets that are critical for its anti-proliferative effects.

Acknowledgments—We thank Drs. Cass, Damaraju, and Sawyer for providing the yeast strain expressing the human nucleoside transporters. We also thank J. E. Gomes for helpful discussions and J. Tissot-Dupont for technical support.

REFERENCES

- Hürlimann, H. C., Laloo, B., Simon-Kayser, B., Saint-Marc, C., Couplier, F., Lemoine, S., Daignan-Fornier, B., and Pinson, B. (2011) Physiological and toxic effects of purine intermediate 5-amino-4-imidazolecarboxamide ribonucleotide (AICAR) in yeast. *J. Biol. Chem.* **286**, 30994–31002
- Sullivan, J. E., Carey, F., Carling, D., and Beri, R. K. (1994) Characterisation of 5'-AMP-activated protein kinase in human liver using specific peptide substrates and the effects of 5'-AMP analogues on enzyme activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **200**, 1551–1556
- Day, P., Sharff, A., Parra, L., Cleasby, A., Williams, M., Hörer, S., Nar, H., Redemann, N., Tickle, I., and Yon, J. (2007) Structure of a CBS-domain pair from the regulatory γ 1 subunit of human AMPK in complex with AMP and ZMP. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **63**, 587–596
- Narkar, V. A., Downes, M., Yu, R. T., Emblar, E., Wang, Y. X., Banayo, E., Mihaylova, M. M., Nelson, M. C., Zou, Y., Juguilon, H., Kang, H., Shaw, R. J., and Evans, R. M. (2008) AMPK and PPAR δ agonists are exercise mimetics. *Cell* **134**, 405–415
- Rattan, R., Giri, S., Singh, A. K., and Singh, I. (2005) 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside inhibits cancer cell proliferation *in vitro* and *in vivo* via AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **280**, 39582–39593
- Tang, Y. C., Williams, B. R., Siegel, J. J., and Amon, A. (2011) Identification of aneuploidy-selective antiproliferation compounds. *Cell* **144**, 499–512
- Corton, J. M., Gillespie, J. G., Hawley, S. A., and Hardie, D. G. (1995) 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur. J. Biochem.* **229**, 558–565
- Nakamaru, K., Matsumoto, K., Taguchi, T., Suefuji, M., Murata, Y., Igata, M., Kawashima, J., Kondo, T., Motoshima, H., Tsuruzoe, K., Miyamura, N., Toyonaga, T., and Araki, E. (2005) AICAR, an activator of AMP-activated protein kinase, down-regulates the insulin receptor expression in HepG2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **328**, 449–454
- Garcia-Gil, M., Pesi, R., Perna, S., Allegrini, S., Giannechini, M., Camici, M., and Tozzi, M. G. (2003) 5'-aminoimidazole-4-carboxamide riboside induces apoptosis in human neuroblastoma cells. *Neuroscience* **117**, 811–820
- Sabina, R. L., Patterson, D., and Holmes, E. W. (1985) 5-Amino-4-imidazolecarboxamide riboside (Z-ribose) metabolism in eukaryotic cells. *J. Biol. Chem.* **260**, 6107–6114
- Guigas, B., Bertrand, L., Taleux, N., Foretz, M., Wiernsperger, N., Vertommen, D., Andreelli, F., Viollet, B., and Hue, L. (2006) 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside and metformin inhibit hepatic glucose phosphorylation by an AMP-activated protein kinase-independent effect on glucokinase translocation. *Diabetes* **55**, 865–874
- Guigas, B., Taleux, N., Foretz, M., Demaille, D., Andreelli, F., Viollet, B., and Hue, L. (2007) AMP-activated protein kinase-independent inhibition of hepatic mitochondrial oxidative phosphorylation by AICA riboside. *Biochem. J.* **404**, 499–507
- Jacobs, R. L., Lingrell, S., Dyck, J. R., and Vance, D. E. (2007) Inhibition of hepatic phosphatidylcholine synthesis by 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside is independent of AMP-activated protein kinase activation. *J. Biol. Chem.* **282**, 4516–4523
- Kuo, C. L., Ho, F. M., Chang, M. Y., Prakash, E., and Lin, W. W. (2008) Inhibition of lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expression by 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside is independent of AMP-activated protein kinase. *J. Cell Biochem.* **103**, 931–940
- López, J. M., Santidrián, A. F., Campàs, C., and Gil, J. (2003) 5-Aminoimidazole-4-carboxamide riboside induces apoptosis in Jurkat cells, but the AMP-activated protein kinase is not involved. *Biochem. J.* **370**, 1027–1032
- Pinson, B., Vaur, S., Sagot, I., Couplier, F., Lemoine, S., and Daignan-Fornier, B. (2009) Metabolic intermediates selectively stimulate transcription factor interaction and modulate phosphate and purine pathways. *Genes Dev.* **23**, 1399–1407
- Mayer, F. V., Heath, R., Underwood, E., Sanders, M. J., Carmena, D., McCarty, R. R., Leiper, F. C., Xiao, B., Jing, C., Walker, P. A., Haire, L. F., Ogrodowicz, R., Martin, S. R., Schmidt, M. C., Gamblin, S. J., and Carling, D. (2011) ADP regulates SNF1, the *Saccharomyces cerevisiae* homolog of AMP-activated protein kinase. *Cell Metab.* **14**, 707–714
- Sherman, F., Fink, G. R., and Hicks, J. B. (1986) *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor, New York
- Sikorski, R. S., and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**, 19–27
- Gari, E., Piedrafita, L., Aldea, M., and Herrero, E. (1997) A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 837–848
- Gietz, R. D., and Sugino, A. (1988) New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **74**, 527–534
- Myers, A. M., Tzagoloff, A., Kinney, D. M., and Lusty, C. J. (1986) Yeast shuttle and integrative vectors with multiple cloning sites suitable for construction of lacZ fusions. *Gene* **45**, 299–310
- Laporte, D., Lebaudy, A., Sahin, A., Pinson, B., Ceschin, J., Daignan-Fornier, B., and Sagot, I. (2011) Metabolic status rather than cell cycle signals control quiescence entry and exit. *J. Cell Biol.* **192**, 949–957
- Saint-Marc, C., Pinson, B., Couplier, F., Jourden, L., Lisova, O., and Daignan-Fornier, B. (2009) Phenotypic consequences of purine nucleotide imbalance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **183**, 529–538, 521SI–527SI
- Pinson, B., Sagot, I., Borne, F., Gabrielsen, O. S., and Daignan-Fornier, B. (1998) Mutations in the yeast Myb-like protein Bas1p resulting in discrimination between promoters *in vivo* but not *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* **26**, 3977–3985
- Bieganski, P., and Brenner, C. (2004) Discoveries of nicotinamide riboside as a nutrient and conserved NRK genes establish a Preiss-Handler independent route to NAD⁺ in fungi and humans. *Cell* **117**, 495–502
- Iwashima, A., Kawasaki, Y., Nosaka, K., and Nishimura, H. (1992) Effect of thiamin on cordycepin sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **311**, 60–62
- Singleton, C. K. (1997) Identification and characterization of the thiamine transporter gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **199**, 111–121
- Huang, Z., Srinivasan, S., Zhang, J., Chen, K., Li, Y., Li, W., Quiocho, F. A., and Pan, X. (2012) Discovering thiamine transporters as targets of chloroquine using a novel functional genomics strategy. *PLoS Genet.* **8**, e1003083
- Mojzita, D., and Hohmann, S. (2006) Pdc2 coordinates expression of the THI regulon in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Genet. Genomics* **276**, 147–161
- Belenky, P. A., Moga, T. G., and Brenner, C. (2008) *Saccharomyces cerevisiae* YOR071C encodes the high affinity nicotinamide riboside transporter Nrt1. *J. Biol. Chem.* **283**, 8075–8079
- Young, J. D., Yao, S. Y., Baldwin, J. M., Cass, C. E., and Baldwin, S. A. (2013) The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. *Mol. Aspects Med.* **34**, 529–547
- Wang, C., Lin, W., Playa, H., Sun, S., Cameron, K., and Buolamwini, J. K. (2013) Dipyridamole analogs as pharmacological inhibitors of equilibrative nucleoside transporters. Identification of novel potent and selective inhibitors of the adenosine transporter function of human equilibrative nucleoside transporter 4 (hENT4). *Biochem. Pharmacol.* **86**, 1531–1540
- Thomas, D., Becker, A., and Surdin-Kerjan, Y. (2000) Reverse methionine biosynthesis from S-adenosylmethionine in eukaryotic cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 40718–40724
- Oishi, K., Hofmann, S., Diaz, G. A., Brown, T., Manwani, D., Ng, L., Young, R., Vlassara, H., Ioannou, Y. A., Forrest, D., and Gelb, B. D. (2002) Targeted disruption of Slc19a2, the gene encoding the high-affinity thiamin transporter Thtr-1, causes diabetes mellitus, sensorineural deafness and mega-

AICAr Uptake in Yeast and Human Cells

- loblastosis in mice. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 2951–2960
36. Reidling, J. C., Lambrecht, N., Kassir, M., and Said, H. M. (2010) Impaired intestinal vitamin B1 (thiamin) uptake in thiamin transporter-2-deficient mice. *Gastroenterology* **138**, 1802–1809
37. Liu, X., Chhipa, R. R., Pooya, S., Wortman, M., Yachyshin, S., Chow, L. M., Kumar, A., Zhou, X., Sun, Y., Quinn, B., McPherson, C., Warnick, R. E., Kendler, A., Giri, S., Poels, J., Norga, K., Viollet, B., Grabowski, G. A., and Dasgupta, B. (2014) Discrete mechanisms of mTOR and cell cycle regulation by AMPK agonists independent of AMPK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, E435–E444
38. Visser, F., Vickers, M. F., Ng, A. M., Baldwin, S. A., Young, J. D., and Cass, C. E. (2002) Mutation of residue 33 of human equilibrative nucleoside transporters 1 and 2 alters sensitivity to inhibition of transport by dilazep and dipyrindamole. *J. Biol. Chem.* **277**, 395–401

Identification of Yeast and Human 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -d-ribofuranoside (AICAr) Transporters

Johanna Ceschin, Christelle Saint-Marc, Jean Laporte, Adrien Labriet, Chloé Philippe, Michel Moenner, Bertrand Daignan-Fornier and Benoît Pinson

J. Biol. Chem. 2014, 289:16844-16854.

doi: 10.1074/jbc.M114.551192 originally published online April 28, 2014

Access the most updated version of this article at doi: [10.1074/jbc.M114.551192](https://doi.org/10.1074/jbc.M114.551192)

Alerts:

- [When this article is cited](#)
- [When a correction for this article is posted](#)

[Click here](#) to choose from all of JBC's e-mail alerts

This article cites 37 references, 16 of which can be accessed free at <http://www.jbc.org/content/289/24/16844.full.html#ref-list-1>

C. Conclusion

Afin de mettre en évidence les mécanismes d'action de l'AICAR responsables de son effet cytotoxique, nous avons isolé et caractérisé plusieurs mutants de levures hypersensibles à l'AICAR (principe de létalité synthétique). Trois mutations affectant le métabolisme de la thiamine se sont avérées hypersensibles à l'AICAR (Fig. 2 B et Fig. 3 C et D, article 1), et conduisent à la surexpression du transporteur THI7. Ces résultats suggèrent que le transport membranaire de l'AICAR par le transporteur de thiamine pouvait être à l'origine de l'effet cytotoxique accru. De fait, la surexpression des deux transporteurs principaux de thiamine THI7 et THI72 a effectivement pour conséquence une accumulation plus importante de ZMP (Fig. 5 C, article 1). THI7 et THI72 permettent donc le transport membranaire de l'AICAR.

Cependant, des expériences complémentaires montrent que l'accumulation d'AICAR chez les levures KO pour *thi7* et *thi72* n'est que faiblement diminuée (Fig. 6 B, article 1). THI7 et THI72 ne sont donc pas les transporteurs principaux de l'AICAR et au moins un autre transporteur d'AICAR existe.

Nous avons donc étudié le rôle d'un transporteur NRT1, transporteur principal de NmR, précurseur du NAD. Les levures KO pour *nrt1* accumulent peu de ZMP et sont par conséquent résistantes à l'AICAR (Fig. 6 A et B, article 1). De plus, la surexpression de NRT1 aboutit à l'accumulation d'AICAR (Fig. 6 C, article 1). Pour finir, la levure KO pour *nrt1* et les levures traitées par des inhibiteurs du transport de la thiamine (Chloroquine et Amodiaquine) ont le même effet sur l'accumulation de ZMP (Fig. 5 D et 6B, article 1). Le transporteur NRT1 de levure est donc le principal transporteur de l'AICAR pour cet organisme.

Afin de vérifier ces données chez l'homme, nous avons utilisé plusieurs lignées cellulaires capables d'accumuler du ZMP (Fig. 7 A et B, article 1). Nous montrons que la thiamine et le NmR n'ont aucun effet sur l'accumulation intracellulaire de ZMP, indiquant que le mode de transport de l'AICAR sur les cellules humaines pouvait être différent. Par des études de compétition, nous montrons également que plusieurs nucléosides (adénosine, guanosine, uridine cytidine thymidine) bloquent ou limitent fortement l'entrée de l'AICAR dans les cellules (Fig. 7 C, article 1). L'AICAR entre donc en compétition avec l'adénosine et les autres nucléosides suggérant que l'entrée d'AICAR se fait par des transporteurs de nucléosides. Cette hypothèse est renforcée par le fait que le traitement au dipyradamole (inhibiteur des transports de nucléoside) bloque l'accumulation intracellulaire de ZMP en présence d'AICAR, et diminue fortement son effet cytotoxique (Fig. 7 D et E, article 1). Afin d'établir plus clairement quels sont les transporteurs de nucléosides impliqués dans le transport de l'AICAR, plusieurs de ces transporteurs humains ont été exprimés chez la levure (Fig. 7, article 1). Les expressions de trois d'entre eux (hENT1, hENT2 et hCNT3) entraînent une forte augmentation de l'entrée d'AICAR dans la cellule. Ainsi, chez l'homme, trois transporteurs de nucléosides au moins sont également responsables du transport de l'AICAR.

L'AICAR entre donc dans la cellule en utilisant les transporteurs de nucléosides pour la levure (NRT1, Thi7, et Thi72) et pour l'homme (ENT1, ENT2 et CNT3) (Fig. 19).

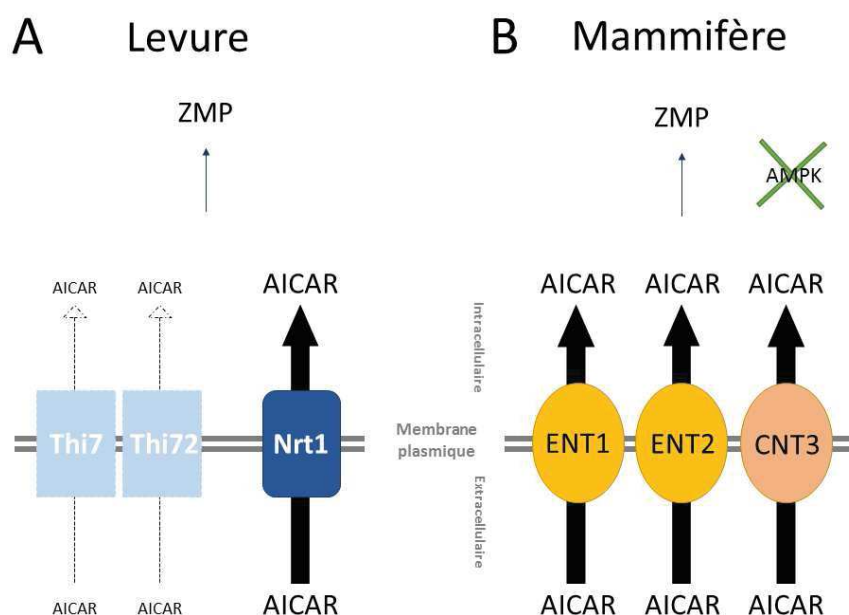


Figure 19 : Les transporteurs de nucléosides permettent le transport de l'AICAR chez la levure et l'homme.

A) Chez la levure, le transporteur principal d'AICAR est un transporteur de thiamine et de NmR, un précurseur du NAD, nommée *Nrt1*. Deux autres transporteurs de thiamine, *Thi7* et *Thi72*, permettent aussi le transport de l'AICAR. B) Chez l'homme, l'AICAR entre dans la cellule via les transporteurs de nucléoside *ENT1*, *ENT2* et *CNT3* (*Equilibrative Nucleoside Transporter 1,2* ; *Concentrative Nucleoside Transporter 3*) et ce indépendamment de la présence de l'AMPK.

Nous montrons aussi dans cet article que les mécanismes de transports de l'AICAR précédemment décrits sont indépendants de la présence de l'AMPK. Nous avons pour cela utilisé des MEF-wt et MEF-dKO AMPK (Fig. 8A et B, article 1). Dans ces deux modèles, le dipyrindamole abolit l'effet cytotoxique de l'AICAR, indiquant que le modèle cellulaire murin, les transporteurs de nucléosides sont également impliqués dans l'entrée de l'AICAR (Fig. 8C et D, article 1).

Chez l'homme, la voie de recyclage des nucléosides utilise ces transporteurs pour faire rentrer les nucléosides extracellulaires afin d'approvisionner la cellule en bases azotées. De par sa ressemblance avec les nucléosides, l'AICAR utilise donc ces transporteurs afin d'entrer dans la cellule. Comme l'utilisation de nucléosides est fondamentale pour le fonctionnement cellulaire et tissulaire, l'expression de ces transporteurs ENT et CNT doit être finement régulée. Il a été publié que son expression dépend du type cellulaire considéré, de la phase du cycle cellulaire, de la présence d'hormones et de cytokines ^{126,127}.

D'autres molécules antitumorales que l'AICAR utilisent ces transporteurs, tels que le tiazofurine et le benzamide riboside ¹²⁸. La présence de ces transporteurs au niveau membranaire est donc requise dans le cadre de thérapies antitumorales utilisant ces composés. Des dérégulations de l'expression de ces transporteurs par les cellules tumorales peuvent conduire à l'émergence de résistances à ce type de traitement. C'est ce qui a été effectivement observé avec le fait qu'une faible expression d'ENT1 dans les cellules tumorales de patients atteints de LAM (Leucémies Aiguës Myéloïdes) diminuait l'effet cytotoxique de l'Ara-C, agent antitumoral analogue de la cytosine arabinoside ¹²⁹. Dans le même ordre

d'idée, il a été montré que certains allèles du gène polymorphique ENT1 favorisent des rémissions complètes de patients sous traitement à l'Ara-C ¹²⁹. Pour finir, Bo *et al.* montrent que l'effet de l'AICAR sur le stress du RE (réticulum endoplasmique) est atténué pour le KO du gène du transporteur CNT3 ¹³⁰.

Ces données nous conduisent à penser que l'activité de transporteurs de nucléosides dans les cellules tumorales est nécessaire afin d'obtenir l'effet antitumoral escompté de l'AICAR. Cependant, l'AICAR entre dans toutes les cellules testées jusqu'à présent, puis est métabolisé dans tous nos modèles (Fig. 7 A, article 1). Notons que l'augmentation de l'AICAR n'est pas identique selon nos modèles, pouvant expliquer les différentes réponses à l'AICAR. Considérant ces résultats, nous pensons que l'approche antitumorale est donc possible en utilisant l'AICAR. (Fig. 7 A, article 1).

Enfin, un objectif majeur de ce travail était de confirmer l'existence d'autre(s) cible(s) de l'AICAR que l'AMPK et pouvant être responsable de son effet cytotoxique. Nous avons pu montrer que l'effet antiprolifératif de l'AICAR n'est pas dépendant de son effet mimétique sur l'AMPK.

II. Article 2 :

« L'AICAR module la voie HIPPO en activant les protéines LATS1 et LATS2 »

A. Introduction de l'article 2

Le but de ce travail a été de déterminer quelles sont les fonctions cellulaires indépendantes de l'AMPK pouvant être modulées par l'AICAR. Pour cela, nous avons utilisé une approche globale transcriptomique sur des cellules invalidées génétiquement pour l'AMPK.

1. Méthodologie

Dans ce travail, j'ai utilisé les MEFs (Murine Embryonic Fibroblasts) de type sauvage (MEF-wt ; wild type) ou invalidées génétiquement pour les deux seules isoformes catalytiques existantes de l'AMPK : AMPK α 1 et AMPK α 2 (MEF-dKO AMPK) (Fig. 20). L'intérêt de ce modèle est de dégager des effets de l'AICAR strictement AMPK-indépendants.

Nous avons précédemment montré que l'AICAR interfère à plusieurs niveaux avec le métabolisme normal d'une cellule (cf. Introduction - Partie I - §B. 1.). Des modifications de l'expression de gènes en réponse à l'AICAR ont été décrites mais pas de manière systématique et le plus souvent en présence d'AMPK. Nous avons choisi d'étudier ces modifications de manière globale et non biaisée (Fig. 20). L'utilisation de puces à ADN nous a permis de quantifier les variations de la présence des ARNs entre les conditions traitées à l'AICAR et la condition contrôle sans traitement (Utilisation de puce à ADN *Affymetrix® MG-430 PM Array Strip* par la Plateforme du transcriptome de l'Institut de Médecine Régénérative et Biothérapies IMRB à Montpellier). Après analyse bioinformatique, l'analyse des variations des transcripts nous a conduit à analyser les réseaux transcriptionnels modulés par l'AICAR.

2. Démarche expérimentale

a. Culture des lignées cellulaires MEF wt et MEF-dKO AMPK

Les MEF-wt et MEF-dKO AMPK nous ont été données par le Dr Benoit Viollet (INSERM U567, CNRS UMR8104, Institut Cochin, Paris)(laderoute 2006). Les deux lignées sont de fond génétique

C57BL/6J. Comme attendu, la présence de l'AMPK est uniquement détectée dans les MEF-wt (Supplementary Fig. 1 B).

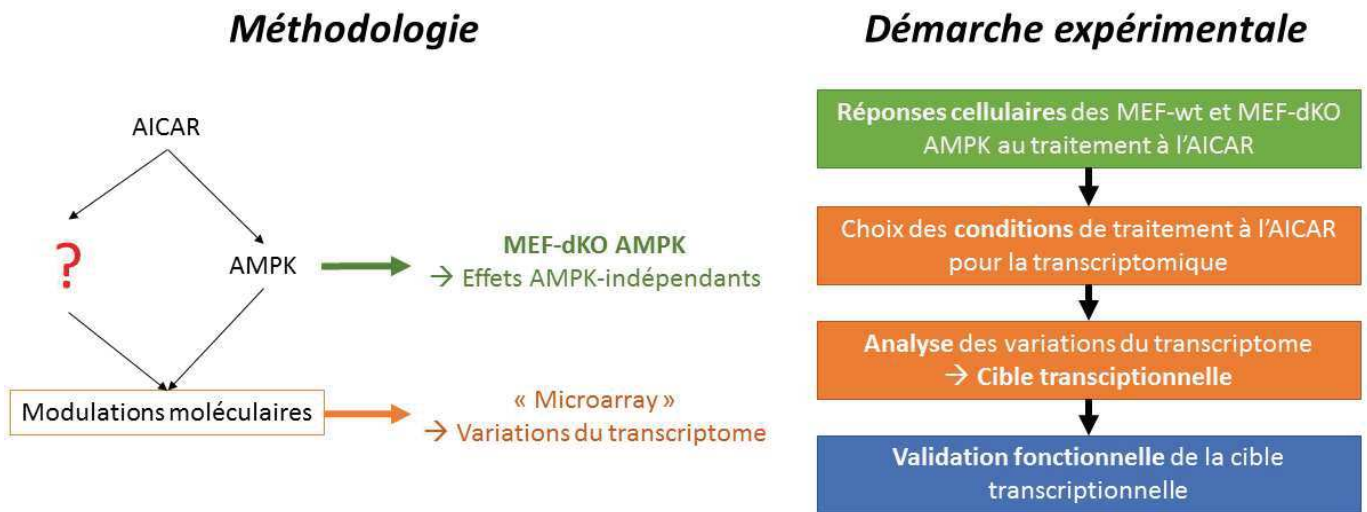


Figure 20 : Mise en évidence de fonctions cellulaires modulées par l'AICAR et responsables de son effet cytotoxique indépendamment de l'AMPK

A) Dans ce travail, nous cherchons à mettre en évidence des fonctions cellulaires indépendantes de l'AMPK modulées par l'AICAR. Nous avons utilisé une lignée cellulaire invalidée génétiquement pour les deux isoformes AMPK α 1 et AMPK α 2 (MEF-dKO AMPK). Les effets de l'AICAR ont été ensuite étudiés grâce aux variations des transcrits mises en évidence par Microarray. B) La démarche expérimentale a conduit au départ à étudier les réponses cellulaires des MEF-wt et de MEF-dKO AMPK à l'AICAR afin de choisir les meilleures conditions pour la transcriptomique. Une analyse des résultats de transcriptomique doit conduire à dégager le(s) cible(s) transcriptionnelle(s) de l'AICAR.

Les souris mutantes pour les deux sous-unités catalytiques α 1 et α 2 de l'AMPK ne sont pas viables. Cependant, les MEF-dKO AMPK peuvent être maintenues en culture et comparées aux MEF-wt. Les MEF-dKO AMPK sont obtenues par croisement de deux lots de souris. Le premier lot est muté pour la sous-unité α 1 de l'AMPK et l'autre pour la sous-unité α 2. Les MEF-wt et les MEF-dKO AMPK sont obtenues à partir d'embryons de 10.5 jours post-coïtum¹³¹. Ces cellules ont été ensuite immortalisées par transduction et expression de l'antigène grand-T du virus SV40 (Simien Virus 40). Les cellules nous ont été fournies à passage 2. Nos expériences ont été réalisées entre les passages 6 et 13 pour une meilleure reproductibilité expérimentale.

La première étape fut de caractériser les deux lignées. Les phénotypes de ces lignées sont similaires, typiquement fibroblastiques (Fig. 1 A, article 2), à l'exception du fait que les MEF-dKO AMPK sont plus réfringentes que les MEF-wt, témoignant probablement d'une diminution de leur capacité d'adhérence (Fig. Sup. 1, article 2). Leur temps de division en culture est d'environ 15h pour chaque lignée (Fig. 1 A, article 2). L'absence d'AMPK n'affecte donc pas notablement leur prolifération dans nos conditions standards de culture.

b. Etude des réponses cellulaires des lignées MEF-wt et MEF-dKO AMPK à l'AICAR

Lors du travail présenté dans l'article 1, nous avons mis en évidence les transporteurs membranaires de l'AICAR chez les cellules de mammifère et la levure. De plus, nous avons montré que l'entrée de l'AICAR et sa métabolisation en ZMP sont identiques entre les MEF-wt et les MEF-dKO AMPK.

Nous avons analysé de manière plus approfondie chez les MEF-wt et les MEF-dKO l'impact du traitement à l'AICAR sur la variation du ZMP et de ses dérivés tels que le sZMP, le ZTP ainsi que les nucléotides puriques et pyrimidiques (Fig. 21 ; Fig. 2, article 2). Cette métabolisation de l'AICAR a été étudiée en cinétique à des temps courts (Fig. 21 B) et temps long (Fig. 2, article 2). Des traitements à différentes concentrations d'AICAR nous ont permis d'étudier l'effet dose-réponse de la métabolisation de l'AICAR (Fig. 21 C). La réponse métabolique au traitement à l'AICAR est caractérisée en utilisant au laboratoire une station de chromatographie ionique de haute performance.

L'effet anti-prolifératif de l'AICAR sur les MEF-wt et les MEF-dKO a été étudié en utilisant un test de viabilité cellulaire qui est également un indicateur de la cytotoxicité d'un composé (test au WST-1 ; cf. Article - Material and Methods - Reagents). D'autres tests par comptage des cellules adhérentes, études de cycle cellulaire et de mort cellulaire ont complété ce test de viabilité (Fig. 1, article).

Ces études en cinétique et dose réponse nous ont permis de définir les conditions d'application les plus appropriées pour l'étude transcriptomique. Ces tests m'ont permis en particulier de montrer que les comportements de réponse à l'AICAR sont similaires pour les MEF-wt et les MEF-dKO AMPK (Fig. 21 ; Fig. 1 et 2, article 2).

c. Choix des conditions pour l'étude transcriptomique

Nous avons choisi à partir des tests décrits ci-dessus d'étudier la réponse cinétique à l'AICAR pour la concentration de 1 mM (Fig. 21 ; Fig. 1 et 2, article 2). Cette concentration correspond également à celle utilisée par d'autres auteurs sur des types cellulaires différents^{13,14,18,27,29}. Cette dose est compatible avec les doses thérapeutiques tolérables utilisées lors de tests précliniques³⁹ ou chez des patients souffrant de leucémies myéloïdes chroniques¹². Chaque mesure a été effectuée en triplicat. Les manifestations morphologiques de la cytotoxicité de l'AICAR sont observées environ après 1 jour de traitement. Nous avons donc choisi des temps courts d'incubations allant jusqu'à 24h afin de mettre en évidence les cibles transcriptionnelles précoces (cibles primaires) et plus tardives (cibles secondaires). Deux analyses ont été réalisées, la première portant sur des temps inférieurs à 1h, la seconde pour des temps allant jusqu'à 24h.

Enfin, les MEF-dKO AMPK ont été utilisées afin, comme indiqué précédemment, de dégager les cibles de l'AICAR strictement AMPK-indépendantes.

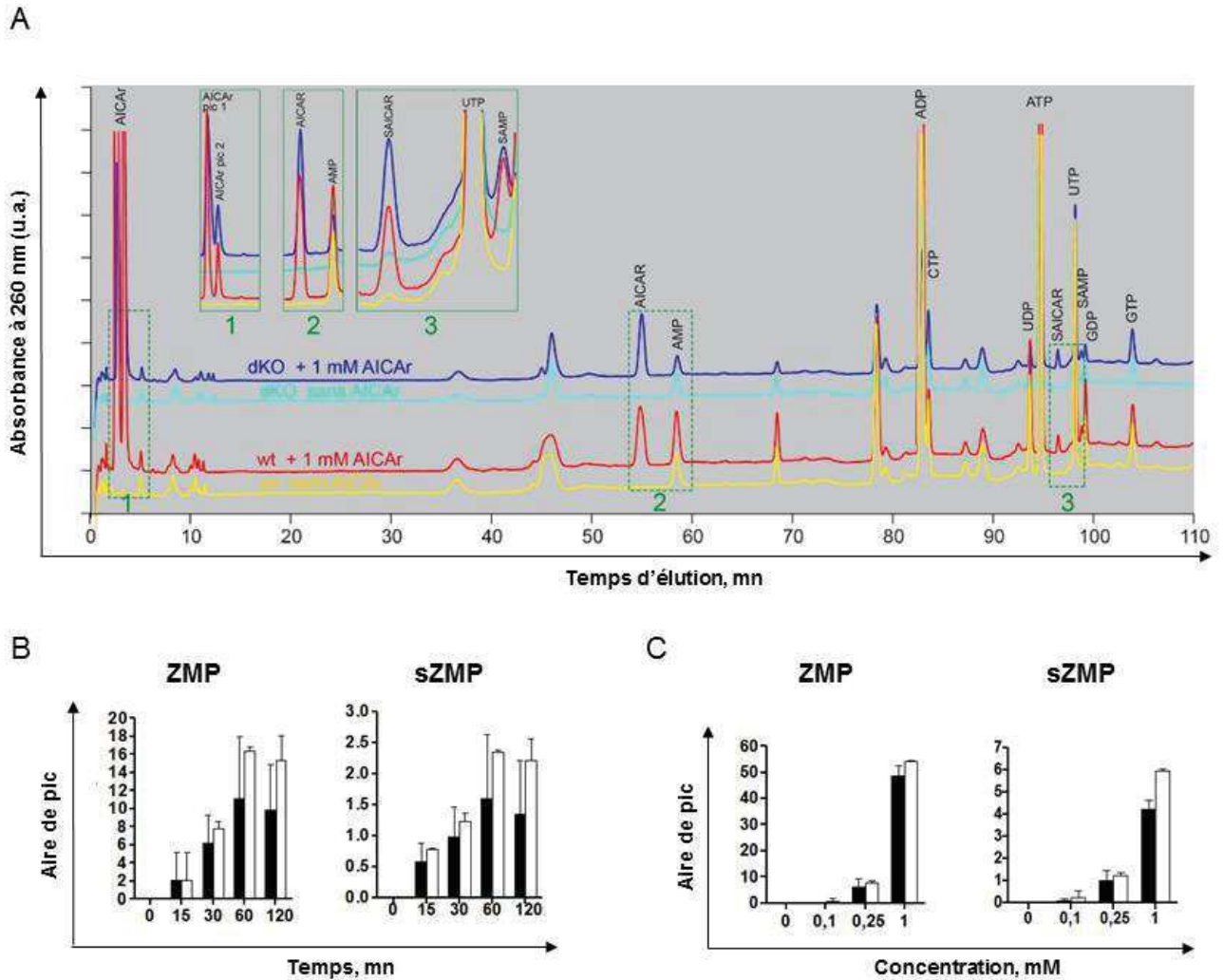


Figure 21 : Métabolisme de l'AICAR en dérivés intracellulaires ZMP et sZMP.

A) Chromatogramme représentant les métabolites extraits à partir des MEF-wt (jaune et rouge) et des MEF-dKO AMPK (bleu clair et foncé). Les MEFs ont été traités à 1 mM d'AICAR durant 15 mn à l'AICAR (bleu foncé et rouge) ou non traités (bleu clair et jaune) (B-C). Apparition des composés ZMP et sZMP. Les MEF-wt (barres noires) et les MEF-dKO AMPK (barres blanches) sont traitées à l'AICAR à différents temps (B) et à différentes concentrations (C). Les temps croissants de traitement vont de 0 à 120 mn pour une concentration unique de 250 μ M (B). Les concentrations croissantes de traitement vont de 0 à 1 mM pour un temps unique de 30 mn (C). Les résultats sont donnés en aire de pic.

d. Analyse des résultats

Après traitement à l'AICAR des MEF-dKO, les ARNs ont été extraits et envoyés à la plateforme du transcriptome de Montpellier (Puces et analyses Affymetrix). Les résultats nous ont été renvoyés sous forme de tableau Excel contenant les différents nécessaires à notre analyse : répertoire des sondes utilisées, nom des gènes correspondant aux transcrits variant d'au moins deux fois dans les conditions traitées à l'AICAR par rapport aux conditions normales : sur expression (up-régulation ; valeurs supérieures à 2) et sous expression (down-régulation, valeurs inférieures à 0,5). Sur les deux études menées, un total de 1182 sondes sont modulées par l'AICAR (Fig. 3, article 2). Plusieurs d'analyses ont ensuite été effectuées à partir des bases de données suivantes :

- KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes): cette base de donnée établit un classement des gènes/ARN/protéines en voies de signalisation au sein desquels ils sont impliqués (site web: <http://www.genome.jp/kegg/>).
- DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) cette base de donnée propose un classement des gènes/ARN/protéines par regroupement (« clusters ») selon les grandes fonctions biologiques dans lesquels ils sont impliqués (site web: <https://david.ncifcrf.gov/>).

La comparaison de ces analyses pour chaque temps d'incubation nous a permis de classer les gènes modulés par l'AICAR en groupes fonctionnels et de dégager les voies de signalisations potentiellement impliquées dans l'effet anti-prolifératif de l'AICAR.

Une seconde analyse a été effectuée de manière plus subjective en utilisant des critères de sélection suivants:

- 1) Expression précoce. Nous avons sélectionné les gènes dont l'expression était modulée le plus précocement possible de manière à nous rapprocher des cibles primaires de l'AICAR.
- 2) Recherche de gènes régulateurs clefs. Nous avons recherché les gènes aux fonctions régulatrices centrales dans la physiologie cellulaire
- 3) Redondance d'expression. Gènes dont la variation d'expression est redondante dans le temps. Cette recherche a permis de d'identifier environ 300 gènes modulés sur au moins deux points de cinétique différents.
- 4) Forte variation. Recherche des ARNs dont les quantités varient de manière importante. Une soixantaine d'ARN ont un taux d'expression variant de plus de quatre fois.

Ces différentes analyses ont abouti à une convergence des données et nous ont conduits à sélectionner une quinzaine de gènes d'intérêt. Après recherche bibliographique, nous avons focalisé notre attention sur les ARNm LATS1 et LATS2 (Fig. 3, article 2) pour les raisons supplémentaires suivantes :

- LATS1 et LATS2 font partie des rares gènes qui augmentent précocement dans notre analyse. En effet, sur les 1182 gènes modulés en réponse à l'AICAR, 57 voient leur quantité augmentée jusqu'à 4 heures de traitement à l'AICAR et 89 jusqu'à 8h.
- L'augmentation de leur expression est redondante dans le temps (4, 8 et 24 heures pour LATS1 ; 2, 4, et 8 heures pour LATS2).
- LATS1 et LATS2 sont des sérines/thréonines kinases faisant partie du centre fonctionnel de la voie de signalisation HIPPO. Celle-ci module l'expression d'un grand nombre de gènes (cf. Introduction – Partie II). Nous observons que la signature transcriptionnelle de la voie HIPPO ⁸⁸ croise avec celle de l'AICAR puisqu'environ 200 gènes sont communs aux les deux signatures. La quasi-totalité de ces gènes considérés comme dépendants de la voie HIPPO sont modulés dans nos expériences au temps 24 heures de traitement à l'AICAR.

- LATS1 et LATS2 sont considérés comme des suppresseurs de tumeur, et leur activation pourrait éventuellement justifier en partie l'effet antitumoral de l'AICAR.

Pour conclure, nous observons que l'AICAR induit une variation précoce (à partir de 2h) des ARNm de LATS1 et LATS2 (≤ 12 h), ainsi qu'une variation tardive de cibles transcriptionnelles sous la dépendance de la voie HIPPO (24 h).

Notre hypothèse à l'issue de cette analyse des variations du transcriptome en réponse à l'AICAR est que la première vague d'induction des transcrits codants pour LATS1 et LAST2 pourrait donc à l'origine de la seconde vague plus tardive de modulation des cibles transcriptionnelles de la voie HIPPO.

e. Validation protéique et fonctionnelle des cibles transcriptionnelles

Dans le but de valider l'étude transcriptomique, nous avons étudié par des approches techniques différentes (Western blot, qPCR et tests de prolifération) l'effet de l'AICAR sur l'expression des protéines LATS1 et LATS2 (Fig. 4, article 2) ainsi que sur les deux effecteurs connus de LATS1 et LATS2 : les co-facteurs de transcription YAP et TAZ (Fig. 4 et 5, article 2). Enfin, dans une démarche de validation fonctionnelle, nous avons montré que les variations de LATS1 et LATS2 sont effectivement impliquées dans l'effet cytotoxique de l'AICAR (Fig. 6, article 2).

B. Article

AICAR inhibits YAP/TAZ through AMPK-independent activation of the Hippo-pathway.

Chloe Philippe,^{1,2} Benoit Pinson,^{1,2} Jim Dompierre,^{1,2} Veronique Pantesco,³ Raphael Pineau,⁴ Benoit Viollet,^{5,6} Bertrand Daignan-Fornier^{1,2} and Michel Moenner^{1,2}

¹Univ. Bordeaux, IBGC UMR-5095, 1 rue Camille Saint-Saëns, Bordeaux France; ²Centre National de la Recherche Scientifique IBGC UMR-5095, 1 rue Camille Saint-Saëns, Bordeaux, France. ⁴Univ. Bordeaux, Animalerie Mutualisee, Talence, France; ⁵Institut Cochin, Universite Paris Descartes, CNRS (UMR 8104), Paris, France; ⁶INSERM U1016, Paris, France

Running title:

Key words: AICAR, transcriptome analysis, MEF, AMPK-independent signaling

Correspondence to: B. Daignan-Fornier, Tel: (33) 556 999 055. Fax: (33) 556 999 059; E-mail:

Abbreviations: AICAR, 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside; AMPK: Adenosine Monophosphate activated protein kinase; CTGF: connective tissue growth factor (CCN2); Cyr61: cysteine-rich angiogenic protein 61; FBS: fetal bovine serum; HPRT: Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase; Lats: Large Tumor Suppressor kinase; MEFs: Murine Embryonic Fibroblasts; SAICAR: succinyl-AICAR; S-AMP: succinyl-AMP; YAP1: Yes-associated protein 1; TAZ: Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif ; ZMP: AICAR monophosphate; ZTP: AICAR triphosphate.

Abstract

AICAR (Acadesine) is a natural metabolite with anti-tumoral properties. Although well recognized as an AMP mimetic activator of the protein kinases AMPK, AICAR was also recently shown to mediate AMPK-independent cytotoxic effects. In order to unveil its AMPK-independent functions, we carried out a transcriptomic analysis in AMPK α 1/ α 2 double knock-out murine embryonic cells. Kinetic signature of the cellular response to AICAR pointed to the up-regulation of Lats1/2 transcripts, followed by the repression of numerous genes downstream of the transcriptional regulators YAP1 and TAZ. The Hippo signaling pathway was activated by AICAR, in keeping with the observation of increased levels in phosphorylation of Lats1 and Yap1 proteins. Fibroblasts and epithelial cells both responded to AICAR by activating the Hippo pathway. However, the physiological relevance of this activation under AICAR treatment was best evidenced in epithelial cells. Double knock-down of Lats1/2 in retinal pigment epithelial (RPE-1) cells prevented the cytoplasmic delocalization of YAP/TAZ proteins in response to AICAR treatment and also conferred a higher resistance to the drug. These effects were independent of AMPK. These results suggest that the downstream activation of the Hippo signaling cascade participates to the anti-tumor effects of AICAR.

Introduction

AICAR (5-amino-1- β -D-ribofuranosyl-imidazole-4-carboxamide; acadesine) is a pharmacological compound entering cells through purine transporters, and a precursor of ZMP, a natural intermediate of the "de novo" purine biosynthetic pathway (1, 2). ZMP mimics the low-energy charge signal AMP by activating the heterotrimeric protein AMP-dependent protein kinase (AMPK), which expresses integrated regulatory functions at the cellular and tissular levels (3).

In the presence of AICAR, its active derivative ZMP accumulates intracellularly and a cytotoxic response is observed both in yeast and mammal cells (2), and reported to be dependent of apoptotic (4-7) as well as non-apoptotic signalings (8-10). Interestingly, AICAR was reported to be more cytotoxic for transformed cell than for normal cells (9, 11). One reported explanation for this relates to its higher cytotoxic effect for aneuploid cells than for their euploid counterparts (6, 12, 13). This activity may represent a high therapeutic opportunity since aneuploidy is observed in 70% of hematopoietic cancer cells up to 90% cells in solid tumors.

Numerous effects mediated by AICAR at the concentration range of 0.1-1 mM are independent of AMPK (14), including inhibition of proliferation and limited tumor growth *in vivo* (2, 5, 15, 16). Moreover, AICAR is well tolerated in mice and human at elevated doses, even when repeatedly administered (see refs. (17, 18) and this work) and has been subjected to Phase I/II clinical trials for treating chronic lymphocytic leukemia (18, 19). This property allows the research of alternative targets of interest, distinct from AMPK, and amenable to preclinical approaches. Particularly, AICAR presents a marked higher cytotoxic efficiency against aneuploid cells than against their euploid counterparts (6, 12), UBA1 being one identified target linked to an AMPK-independent mechanism (13). Since aneuploidy is a characteristic of a large majority of transformed cells, a further understanding of AICAR's properties for the selective targeting of cancer cells is of a great interest.

In order to get insight on the AMPK-independent activities of AICAR, we carried out a transcriptome analysis of AICAR effects on murine embryonic fibroblasts invalidated for AMPK (α 1 and α 2 subunits). We provide a transcriptome database that may prove useful for deepening our knowledge on AICAR's cellular effects, and confirmed that a rather large alteration of the expression of transcripts was observed under AICAR treatment, irrespectively of AMPK. We identified the anti-tumor Lats1/2 transcripts and proteins as activated transducers of AICAR activity. The pluripotency of Lats1/2 signals, especially acting as downstream transducers of the core Hippo pathway, suggests that part of the heterogenous causes of cell death induced by AICAR, as well as the complex effects of AICAR of the cell cycle may result of alterations of central mechanisms that control critical transduction pathways. Lats1/2 play pivotal roles in the cell homeostasy by inhibiting the two related co-transcriptional factors Yap (Yes-associated protein) and Taz (Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif), which represent central actors of the cell cycle, as nuclear effectors of the Hippo signaling pathway. These findings further justify the exploitation of AICAR or derivatized compounds as therapeutic agents for the treatment of various types of cancers.

Material and Methods

Reagents – Culture media was from Invitrogen. Specific antibodies were purchased as follows: Taz (#560235) (BD Pharmingen); actin (#A2668) (Sigma); AMPK α/β (#2532), phospho-(Thr172)-AMPK α (#2531), PARP (#9542), Lats2 (#13646), Lats1 (#3477), phospho-(Thr1079)-Lats1 (#8654), LC3A/B (#4108), cleaved-(Asp175)-caspase-3 (#9604 and 9664), Yap/Taz (#8418), Yap (#14074 and #4912), phospho-(Ser127)-Yap (#4911) were from Cell Signaling; Lats2 (#NB200-199, NovusBio); DAPI and secondary antibodies labeled with FITC, AlexaFluor488, or AlexaFluor546 were from Invitrogen. Primers and siRNA (Sigma) were as indicated in Table S1. Control siRNA was from Cell Signaling (#6568). AICAR was purchased from Toronto Research Chemicals (Canada) and was solubilized in water and filtered at 0.22 μm . Its concentration was determined spectrophotometrically (A_{268} ; $\epsilon_M = 12700 \text{ M}^{-1}/\text{cm}^{-1}$).

Cell culture experiments – Wild-type U87-MG (U87wt) glioma cells (ATCC; HTB- 14), and RPE-1 (ATCC; CRL-4000) cells were grown in DMEM, 4.5 g/L glucose supplemented with 10% FBS, L-glutamine, and antibiotics. Wild-type or knock-out mouse embryonic fibroblasts (MEFs) for both AMPK α 1 and AMPK α 2 subunits (AMPK α 1/ α 2 dKO) were obtained as reported (20). CUX1^{+/+}, Cux1^{+/-} MEFs and Cux1^{-/-} MEFs were a generous gift from A. Nepveu (Univ. Mc Gill, Montreal, Canada). The WST-1 cell viability assay was performed in 96-well plates as previously reported (2). Cell proliferation assays were performed in 24-well plates. Cells were trypsinized and counted using a Multisizer 4 coulter Counter (Beckman). Each time point was done in triplicate, and the averages \pm standard deviations were calculated. Experiments were repeated three times.

Metabolite analysis – The general procedure has been reported previously (2). Exponentially growing cells were incubated with or without 1 mM AICAR. They were washed in ice-cold PBS and metabolites were extracted in a solution EtOH 20%, HEPES 10mM. Metabolite separation was then performed on an ICS3000 chromatography station (Dionex, Sunnyvale, CA) using a CarboPac PA1 column (250 x 2 mm; Dionex) and a 50 – 800 mM acetate gradient in 50 mM NaOH. Total amounts of the different metabolites were determined by measure of their corresponding peak areas on chromatograms. Calibration curves were obtained by injection of known quantities of each compound. Intracellular concentrations of the different metabolites were obtained by measure of the cell volumes using a Multisizer 4 coulter Counter (Beckman).

Transcriptomic analysis

MEF-dko were grown in the complete medium and harvested at the final density of 15,000 cells/cm². Total RNA was extracted using the RNeasy kit (Qiagen). Biotinylated cRNAs were then prepared according to the Affymetrix standard labeling protocol. cRNAs from subconfluent MEF-wt and MEF-dko cells in culture were generated from 10 μg of total RNA and hybridized to Mouse MG-430 PM Array Strip Kit and 3' IVT Express Kit Bundle (#901580 ; Affymetrix UK) at the Affymetrix transcriptome platform (Inserm U1040, Montpellier France). Analyses were performed in triplicates. Analysis of CEL files was performed by using the Limma package available through Bioconductor with R statistical software and the OneChannelGUI graphical interface. Probe set intensities were obtained by means of GCRMA and were selected by using a corrected P value threshold of 0.05 and fold change threshold of ± 2 or above. Annotation of genes was performed using NetAffx (<http://www.affymetrix.com>). Affymetrix IDs were submitted to the DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) analysis tool (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) as well as the Netaffx Analysis Center (Affymetrix database) to depict biological processes associated with the functions of regulated genes. The data have been deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO) database (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo) and will be released upon publication (accession numbers. xxx).

Small interfering RNA knockdown experiments - U87 cells were plated at a density of 105 cells per well in six-well plates. Small interfering RNA (siRNA) were from Sigma. Non-targeting siRNA (#D-001810- 01-20) was from Dharmacon (Lafayette, CO). Transfection was performed for 15h using lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol, with total amounts of

siRNA at a final concentration of 15-45 nM.

Intracranial implantations – U87 glioma cells (5×10^4 cells, $1 \mu\text{l}$) were implanted in 8-9 weeks of age RAG2/ γ_c mice as previously described (21). Mice were randomized and were injected intraperitoneally six days a week from day 3 after implantation until the end of the experimentation. Kaplan–Meier analysis was used for survival analysis. Experiments were performed at the animal facility, University of Bordeaux, according to approved animal welfare guidelines and with the consent of the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR).

Immunoblot analysis - Glioma tissues and cellular extracts were snap frozen before analysis. Proteins were extracted at 4°C with RIPA buffer containing 1 mM Na_3VO_4 , 5 mM NaF, and protease inhibitors (P8340, Sigma). Protein content was determined by using a BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Villebon, France). Proteins were resolved on 7 or 10% SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane and probed using anti-phospho-proteins and anti-total proteins, as indicated in figure legends. Primary antibodies were revealed with secondary antibodies coupled to HRP. Densitometric analyses of Western blots were carried on using ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>) and the results were normalized to the loading control.

PCR analysis – Frozen tissues were homogenized at 4°C using a Polytron® blender in the presence of Trizol (Life Technologies). RNA extraction, quantification and gene expression analyses by RT-qPCR were performed as previously reported (22). Primers were designed to recognize specifically human transcripts and gene expression was normalized to actin, S16 or HPRT1 genes. Homogeneity of PCR products was controlled by melting point analysis and gel electrophoresis. Results were the mean of triplicate determinations \pm SD for each glioma sample ($n=5$ mice per condition).

Flow cytometry – MEFs were cultured in 10 cm dishes up to the final density of 20,000 cells/ cm^2 . After trypsinization, cells were stained with propidium iodide or with Annexin V using the ApoAlert Annexin V-FITC Apoptosis Kit (Clontech Lab Inc) and analyzed by flow cytometry following the manufacturer's instructions. Data were collected and analyzed on an Accuri C6 Flow Cytometer (BD Biosciences).

Immunofluorescence analysis – RPE-1 and MEF cells were grown at low densities on glass coverslips. After one day of incubation, cells were washed with PBS and incubated with the indicated concentrations of AICAR for increasing periods of time. Cells were then washed twice with PBS and then fixed with a 4% solution of paraformaldehyde for 10 min at room temperature and then incubated with Tris-buffered saline and Tween 20 solution containing 1% bovine serum albumin. Incubation with antibodies against Yap and Taz was performed for 1h at room temperature. Cells were then washed and incubated with FITC, AlexaFluor488, or AlexaFluor546- conjugated second antibodies. Cell nuclei were labeled by using the DAPI labeling. Coverslips were finally mounted onto glass slides with anti-fade solution and visualized on a Nikon (???) microscope. Image analyses were carried out using a ImageJ software. Statistical analyses were performed by quantification of the fluorescent signal on a total of at least 10 different slides (>150 cells for each condition).

Results

AICAR inhibits glioblastoma growth in an orthotopic model – AICAR has been previously reported to express antitumoral properties *in vivo* in different animal models (6, 23-25). Here, we evaluated its activity in an orthotopic glioblastoma model (Fig. 1SA). We observed that daily *i.p.* injection with AICAR increased by 15% the median survival of mice, as compared to controls (median 38 vs. 33 days; $p < 0.004$). The EGFR-targeted antibody cetuximab had no detectable effect in the same model (22). Thus, significant differences in animal survival were observed in the intracerebral implantation model using AICAR, with low side effects. Similar results were reported using subcutaneous implantation of GBM cells both in mice (15) and rats flanks (26).

Cytotoxic effects of AICAR in MEF cells are AMPK-independent – MEF-wt and the same cells invalidated for the AMPK- $\alpha 1$ and - $\alpha 2$ catalytic subunits grew at the same rate over 21 days of culture (7 passages) (Fig. 1A). Thus, AMPK had no significant effect on the propagation of MEFs in standard culture conditions, even though MEF-dKO were slightly more refringent and less spread on the plastic surface than control cells (see Fig. S2A). Both isogenic cells also responded similarly to AICAR as measured by using a WST-1 colorimetric assay after 48h or 72h of incubation (Fig. 1B) (see also (2)). However, MEF-dKO cells were more prone to detach from their substrate in the presence of AICAR, as measured by counting cell in the conditioned medium (Fig. 1C). MEFs that had detached from the plastic dishes were unable to grow in a renewed medium after removal of AICAR, and had therefore entered irreversible death processes. The higher sensitivity of MEF-dKO to AICAR was also apparent by using the Annexin V labeling (Fig. 1D). In keeping with this, the apoptotic process was more important in MEF-dKO cells than in wild-type cells after 24h of incubation, as monitored by cleavage of the apoptosis markers caspase 3 and of its substrate PARP upon treatment with AICAR (Fig. 1F). Finally, autophagy also increased slightly, but not differently, in both cell types (Fig. 1E). Thus, AMPK exerts a protective effect in the wild type cells in response to AICAR (see also (14)).

Cell cycle analyses indicated that both MEF-WT and MEF-dKO cells accumulated in the S phase under AICAR treatment for 24h, with a strong decrease in cell percentages in the G1 and G2/S phases (Fig. 1G). Such an effect of AICAR has also been reported in other cell types (26-28). Moreover, an increasing population of cell in the sub-G1 area was also observed at 24h and 48h of incubation as a result of cell death. Thus, several mechanisms independent of AMPK could contribute to the cytotoxic effect of the AICAR.

Analysis of AICAR metabolism in MEF-wt and MEF-dKO cells - AICA-riboside (AICAR) enters mammalian cells using purine nucleoside transporters and is then enzymatically converted to its monophosphorylated form ZMP (1, 2). We monitored in both MEF-wt and MEF-dKO the intracellular phosphorylation of AICAR to ZMP as a function of time, and identified its further transformation into related metabolites (Fig. 2A). AICAR entered cells and ZMP accumulated intracellularly to reach millimolar amounts (~8 mM after 24h of incubation) (Fig. 2B). Increasing concentrations of SAICAR, the immediate precursor of AICAR in the purine pathway, as well as of the downstream products ZTP (AICAR triphosphate) and S-AMP (succinyladenosine monophosphate) were also detected. Consistent with results obtained previously in human tumor cells (29), concentrations of both adenosine and guanosine triphosphates increased by 2 to 3 fold from basal levels, whereas a dramatical and parallel decline was observed for pyrimidine triphosphates (CTP and UTP) (Fig. 2B). AICAR entry in MEFs was therefore followed by its derivatization in several by-products and this effect was essentially independent on the presence of AMPK.

The intracellular increase of AICAR did not modify the ratio of adenylates, as assessed by the the adenylate energy charge (AEC, see (30)), which ranged from 0,91 to 0,95 in the different assays and were not clearly different in the two cell types (Fig. S3A). Thus, AICAR did not notably interfere with the activity of adenylate kinases. Rather, the large imbalance observed in the purine/pyrimidine ratios of nucleotide triphosphates under AICAR treatment (Fig. 2B) could participate to the cytotoxic effects of AICAR as suggested p^{\wedge} previously (7, 31). Indeed, we observed that high and sub-cytotoxic concentrations of exogenous uridine significantly, but incompletely, rescued the viability of both MEF-wt and MEF-dKO upon AICAR treatment (Fig. S3B). Overall, MEF-dKO and MEF-wt

responded similarly to AICAR and thus represent a convenient model to investigate its AMPK-independent effects.

Transcriptomic analysis in MEF-dKO provides clues to the AMPK-independent response to AICAR – Kinetic transcriptome analysis was carried out in MEF-dKO AMPK in order to provide an overview of the AMPK-independent cell response to AICAR (Fig. 3A). Cells were studied at a low density. Assessing the transcriptome across all time points, significance analysis of microarray (SAM) revealed that 1325 probes for 1071 genes (19.1% redundancy), corresponding to ~2,9 % of the total number of the probes available on the chips, were selected in response to AICAR (FDR (%) < 0.009). The number of genes modulated under AICAR treatment increased with time (Fig. 3B), with a majority of genes down regulated at early times (100% at t=1h). From 8 to 24h of incubation, a similar number of genes were up- and down- regulated. The time-course variation of the gene expression pattern appeared coherent, as 627 of the selected genes (47%) were strictly upregulated, whereas most of the others (693 genes, 52%) were consistently downregulated. Only five probes corresponding to three distinct genes (Egr1, Luc7l2 and Rbm39) provide both positive and negative signals depending on the time incubation (TAB. S2, sheet 1). Functional classification clustering performed by using the DAVID Bioinformatic Resources uncovered functions related to the regulation of gene expression, mRNA processing, cell motion, mitosis and phosphorylation/dephosphorylation processes (Table S3).

An early and sustained upregulation of transcripts encoding the large tumour suppressor proteins Lats1 and Lats2 was detected along the time-course experiment (Fig. 3C). Interestingly, Lats1 and Lats2 (referred hereafter as to Lats1/2) are Ser/Thr protein kinases and members of the Hippo pathway core involved in mammals in several physiological processes including growth inhibition, survival, epithelial to mesenchymal transition and response to stressors. Interestingly, active Lats1/2 phosphorylate and inhibit the two highly related oncoproteins Yap (Yes-associated protein) and Taz (transcriptional co-activator with PDZ-binding motif) (32, 33). When comparing our data with available transcriptome signatures of human orthologues of Yap and Taz (see (34)), we highlighted an overlap of 197 genes belonging to the Yap/Taz signature and that were also modulated under AICAR treatment (Fig. 3D and TAB. S2, sheet 2). Notably, most of these genes were detected lately (12 and 24h) upon AICAR treatment, well after Lats1/2 up-regulation. In addition, a number of these genes, including Cyr61, Ctgf, Jak1, Irs1, Cited2, Ccnd1, IL6, Socs3, Myc and others are well-recognized Hippo targets (TAB. S2, sheet 3; (35)). Since our comparisons were carried out between mice (AICAR signature) and human (YAP/TAZ), one may expect that these reported overlaps were underestimated. Overall, expression profiling pointed to the Hippo signaling pathway as a possible target of AICAR in MEF-dKO (Fig. 3E).

Notably, AICAR had also significant and coordinated effects on several members of the EGF-family of growth factors and receptors, which may impact on cell proliferation. Ereg, Hbegf and Nrg1 were downregulated (Fig. 3F). In comparison, the EGF receptor Erbb3, whose kinase activity is defective and involved in the negative regulation of the others EGF receptors (36) was upregulated. These regulations occurred lately in kinetics and represent likely secondary events associated to the stimulation with AICAR. Noticeably, several other genes involved in EGF signaling were also modulated, including the transcription factor Egr1. Thus, one important effect of AICAR would be the inhibition of functions linked to the EGF/EGFR signaling, in keeping with the fact that YAP and AICAR were functionally linked to the EGF/EGFR pathway in various cancer cells (12, 37).

Activation of the Hippo pathway under AICAR treatment – Activation of the Hippo pathway following incubation with AICAR in MEF-dKO was first confirmed by the increased phosphorylation of the proteins LATS1/2 using an antibody directed against phospho-(Thr1079)-LATS1 (a marker of LATS1 activation) and cross-reacting with p-LATS2. As shown in figure 4A, p-LATS1/2 were detected after 4h of incubation and this effect was readily observed at the minimum concentration of 500 μ M AICAR. Both LATS1 and LATS2 proteins and mRNA levels were also increased in MEF-dKO, as measured by Western blot and qPCR, respectively (Fig. 4Ba, 4Bb). Similar effects were detected in MEF-wt cells (Fig. 4Ca, 4Cb). Phosphorylation of Lats1/2 was accompanied in both cell lines by the increase of Yap phosphorylation using an anti phospho-YAP antibody (p-127-YAP in human; p-S112-YAP in mice) (Fig. 4Bc, 4Cc), which is a marker of Yap inhibition by LATS1/2. The total amounts of Yap and Taz proteins were also increased. These effects were associated to the

progressive decrease in the expression of both *Cyr61* and *Ctgf* mRNAs (Fig. 4Bd, 4Cd), two surrogate markers of the activation of the Hippo pathway and inhibition of YAP/TAZ (33, 38). Together, these results indicate that *Lats1/2* were upregulated at both the mRNA and protein levels and their protein kinases activated upon AICAR treatment. These events occurred in MEF-dKO as well as in MEF-wt cells (Fig. 4B compared to Fig. 4C) and can thus be triggered independently of AMPK.

Sub-cellular localization of YAP/TAZ proteins by immunofluorescence

One possible consequence of the activation of the Hippo pathway by AICAR is the cytoplasmic delocalization and increased degradation of Yap/Taz proteins. In order to examine this point, we performed immunofluorescence analyses on MEF-wt and MEF-dKO cells grown at low density, which represents an optimal condition for the nuclear localization of Yap and Taz proteins under the control of the Hippo pathway (39, 40). Although both Yap and Taz immunoreactivities were predominantly nuclear, no extensive loss of the signals in nuclei or cytoplasm could be measured using different concentrations of AICAR and at different incubation time (Fig. S5A, S5B). We reasoned that this could result from the initial immortalization of these cells by the SV40 TAg (20) and loss of contact inhibition. Notably, the Hippo pathway is perverted by viral oncoproteins (41, 42) and MEFs immortalized by SV40, but not RPE1 cells, indeed failed to translocate YAP from the nucleus to the cytosol at confluence (Fig. S5C). We therefore used normal MEF that have retained their ability to stop dividing at confluence and observed that, in these conditions, YAP unambiguously translocated in the cytosol under AICAR treatment (Fig. S5A, S5B). This effect of AICAR was confirmed in human retinal epithelial cells (RPE-1), which express YAP/TAZ translocation capabilities under confluence (40). Again, AICAR induced a time-dependent redistribution of YAP and TAZ from the nucleus to the cytoplasm (Fig. 5A, 5B) due to a rapid ($t < 4$ h) decrease of the corresponding signals in the nucleus, followed by their late ($t > 8$ h) extinction in the cytosol (Fig. 5B). This effect was consistent with a higher amount of *Lats1* protein in these cells after 4h of treatment (Fig. 5A, bottom panel), and is also in agreement with data from transcriptomic analysis in MEFs cells (Fig. 3C).

Next, we analyzed the possible implication of *Lats1/2* and of *AMPK α 1/ α 2* in the AICAR-mediated translocation of YAP/TAZ in RPE-1 cells. We performed similar experiments in RPE-1 cells that were subjected to siRNA knockdown of *Lats1/2*, *AMPK α 1/ α 2*, or *Lats1/2* plus *AMPK α 1/ α 2*. We then examined the cytoplasmic enrichment of YAP immunoreactivity after 8h of incubation. As shown in figure 5C, AICAR treatment induced the delocalization and decrease of YAP immunoreactivity in cells either treated with the non-targeting siRNA (Fig. 5Ca, 5D) or treated with the siRNA *AMPK α 1/ α 2* (Fig. 5Cb, 5D). In comparison, when treated with siRNA targeting *Lats1/2* mRNAs, or with the mix siRNA *Lats1/2* plus siRNA *AMPK α 1/ α 2* (Fig. 5Cd, 5D), no delocalization was apparent (Fig. 5Cc and 5D). Thus, activation of the Hippo pathway as well as the decrease of the nuclear fraction of YAP under AICAR treatment could be observed independently of AMPK.

Lats1/2 rescued proliferation of MEFs under AICAR treatment

In order to evaluate the possible impact of *Lats1/2* activation on the AICAR-mediated cytotoxicity, MEFs and RPE-1 cells were transfected with small interfering RNAs targeting *Lats1/2*, *AMPK α 1/ α 2*, or both. siRNAs were shown to decrease the intracellular level of the corresponding proteins (Fig. 5E and S6). Cells were then grown in culture in the presence or absence of AICAR and the final number of cells was evaluated by using the WST-1 metabolic assay. Results indicated that the siRNA knockdown against *Lats1/2*, and to a lesser extent against *AMPK α 1/ α 2*, restored significantly the growth of MEFs and RPE-1 cells in the presence of AICAR (Fig. 6). The higher resistance of these cells to AICAR treatment is consistent with the expected effect of *Lats1/2*, these protein kinases acting as potent repressors of proliferation through phosphorylation and inhibition of the YAP and TAZ oncogenes.

Discussion

AICAR is a purine precursor endowed with therapeutic properties (1). This compound enters mammalian cells through nucleoside transporters and is converted to its active-monophosphorylated form ZMP by adenosine kinase (1, 2). As a competitive ligand of the low energy sensor AMP, ZMP binds to, and activates AMPK. For this reason, AICAR is a widely used energy-stress mimicking compound. The metabolic functions of AMPK in response to the energy charge have been described in comprehensive reviews (3, 43).

Recent studies pointed to the fact that AICAR also modulates AMPK-independent functions in mammals. Numerous reported effects converge towards the inhibition of cell growth and induction of cell cytotoxicity (2, 5, 14, 15). Interestingly, a higher sensitivity of aneuploid cells *versus* euploid cells to AICAR treatment was evidenced in different cell models, offering appealing perspectives in cancer therapy (6, 12). The property of ZMP, but not of AMP, to physically interact with UBA1 contributes significantly to the exacerbated sensitivity of aneuploid cells to AICAR (13).

In this study, we aimed at discovering new functions that could be modulated by AICAR independently of AMPK. We therefore carried out a transcriptomic approach using murine embryonic fibroblasts invalidated for the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ subunits of the AMPK. Time-course analysis under AICAR treatment indicated that mammalian cells responded by the upregulation of the tumor suppressors Lats1 and Lats2, the most downstream protein kinases of the Hippo pathway. This effect, here defined as to the early cell response (~2 h) to AICAR, was accompanied with an increase in the corresponding proteins and phosphorylation of Lats1 on its threonine residue 1079, an indicator of its catalytic activation (32). In a late (>12 hours) cell response to AICAR, down-regulation of a collection of gene was further recognized as an expression signature characteristic of the repression of the transcriptional co-activators YAP and TAZ, both proteins being negatively regulated by the Lats1/2 protein kinases (32, 33). These results suggest that AICAR activates Lats1/2, thus creating a shortcut in the Hippo-signaling cascade and inhibiting YAP and TAZ oncoproteins. They also confirm that, in addition to the AMPK-dependent inhibition of YAP, an alternative pathway could be involved in both YAP and TAZ inhibition in the complete absence of AMPK (44, 45). As shown here, this activation occurred at least in part by the upregulation of Lats1/2 mRNA.

The molecular origin of the increase of Lats1/2 mRNAs under AICAR treatment is not known. Diverse upstream signals involved in the post-translational activation of the Hippo kinase cascade have been identified, such as those mediated by energy stress, cell contact and cell polarity, mechanotransduction, and G-protein-coupled receptor (GPCR) signaling (33, 38). Yet, a very few effectors were reported to increase the levels of Lats1/2 transcripts and proteins, as observed here under AICAR treatment. Among such inducers of interest are the transcription factor CUX1 (46) and the YAP1 protein itself (47, 48).

Inhibition of the cotranscriptional factors YAP/TAZ represents a major functional output of the Hippo pathway, as it represses a variety of downstream transcription factors and other DNA binding proteins including TEAD1-4, SMAD, RUNX and p73 (32, 33). A pleiotropic cell response to AICAR is therefore expected and Lats1/2 activation may in fact provide a rationale to the diversified activities of AICAR already reported. Alike AICAR, inhibition of YAP/TAZ limits cell proliferation, cell cycle progression, increases resistance to cell death, reprograms metabolism and inhibits angiogenesis (32, 33, 49, 50). Finally, it should also be considered that Lats1/2 are also believed to regulate alternative pathways than those reported as dependent of Yap/Taz (ref), thus widening the potential effect of AICAR on this pathway.

We showed that knockdown of Lats1/2 rescued the growth of cells incubated with AICAR, which suggests that Lats function is thus involved in the antiproliferative effect of AICAR. Notably, AMPK also contributes to the decrease of cell proliferation induced by AICAR which can be explained by the fact that the AICAR-mediated activation of AMPK was also reported to regulate the Hippo signaling and inhibited Yap phosphorylation at two distinct sites (44, 45). In conclusion, AICAR exerts dual action, one being AMPK-dependent and the other AMPK-independent, that independently converge to the inhibition of the cotranscriptional factors Yap/Taz. In the absence of AMPK, AICAR up-regulates by an as yet unknown mechanism Lats1/2 transcripts and proteins expression, leading to the activation of Lats1/2 kinase and to the blockade of Yap/Taz and downstream functions. This signal is physiologically relevant, as Lats1/2 is effectively activated in an AMPK-

independent manner upon glucose deprivation (45). Besides, as an AMP-mimic, AICAR also potently activates AMPK and inhibits Yap independently of Lats1/2 (44, 45).

By activating Lats1/2 kinases, AICAR thus mimics the effects of converging upstream signals usually conveyed by cellular changes in their microenvironment, including stress signals, cell-to-cell contacts, adhesion signals and mechanotransduction, all converging to the modulation of cell proliferation and cell death (33). The central role of Lats1/2 in the homeostasis of cell growth, as well as its wide representation in different types of cells, provide an explanation to the fact that AICAR has the potential of impairing growth of a wide range of tumor cells. Indeed, AICAR interferes with mechanisms linked to distinct hallmarks of cancer (51) and express diverse anti-tumor properties that can be exploited therapeutically. A characteristic of aggressive tumor cells, for example, is that they do not respond anymore to contact inhibition. It is therefore conceivable that AICAR would be especially effective on those cells presenting altered signals upstream of Lats1/2, and evading contact inhibition (39, 52). Indeed numerous alteration of the Hippo pathway were reported in cancer upstream of Lats. In these conditions, AICAR effect would be to pharmacologically reactivate Lats, and re-establish inhibition contact. More generally, Lats1/2 activation may contribute to decrease tumor development by the inhibition of cell growth and survival, induction of apoptosis, increasing tumor cell invasiveness and anchorage-independent growth (52-55).

This unbiased approach also unveils the activation by AICAR of the Hippo-dependent signaling, through the increase of the tumor repressors Lats1 and Lats2 mRNA and proteins. This leads in turn to the inhibition of Yap and Taz co-transcriptional activators and ultimately to the downstream regulation of genes under the control of Yap and Taz.

These findings provided a rationale for the therapeutic exploitation of AICAR or of derivatized pharmacological compounds by exploiting the antitumor properties of the Hippo pathway without activating AMPK. By activating Lats1/2, AICAR indeed inhibits Yap/Taz, both of which being oncogenes involved in malignant progression (49, 55). It remains to consider whether these effects can be related or not to the anti-angiogenic potential of AICAR (56) (24) as well as to its properties to inhibit tumor cell invasion and metastasis (57, 58).

Figure legends

Figure 1: AICAR inhibited growth of murine embryonic fibroblasts. A) Long-term propagation of MEFs in culture showing that MEF-wt and MEF-dKO AMPK have the same division time. B) Comparative effect of AICAR on the growth of MEF-wt (closed bars) and MEF-dKO (open bars). Results of a WST1 cell proliferation assay at days 2 and 3 of AICAR treatment. Cell viability was not affected after one day of incubation. Results are mean \pm SD of two independent determinations, each made in hexaplicates. C) AICAR-induced MEF detachment in culture. Cells were grown in 24-well plates. After two (closed bars) and three (cumulative closed/open bars) days in culture, cells in suspension were counted in conditioned media and attached cells were numerated after trypsinization. The number of floating cells was reported in surface units for comparison with the number of anchored cells. D) Measure by flow cytometry of AICAR-induced apoptosis in MEFs. MEFs were grown on tissue culture plates for 24h in the presence or absence of AICAR. They were then collected and stained with propidium iodide and annexin V and then analyzed by flow cytometry. Experiments were done in triplicate. F) AICAR promotes apoptosis in MEFs. Cell extracts were prepared from MEF-wt and MEF-dKO treated or not with 1 mM AICAR for 24 h. They were resolved by SDS/PAGE and probed with either anti-PARP or anti-cleaved caspase 3 (casp-3) antibodies. Cells treated with either staurosporine (25 and 50 nM) or hydrogen peroxide (0.01%) were used as positive controls of apoptosis. Actin was used as internal control. Pixel intensities of cleaved PARP and (Asp175)-caspase-3 (Casp-3) proteins were normalized to actin and the resulting values are indicated. E) Measure of autophagy in MEFs following AICAR treatment. Western blot analysis allows the detection of changes of the cytosolic (LC3-I) and lipidated (LC3-II) forms of the autophagy marker LC3. LC3-I and LC3-II proteins were normalized to actin and the resulting values are indicated. After one or two days of incubation, cells were collected and stained with Annexin V and analyzed by flow cytometry. Cytometric profiles were presented on the left panel and percentage of apoptotic cells were calculated and reported in the right panel. The data are a representative of three separate experiments. G) AICAR-induced cell cycle arrest. MEFs were grown on tissue culture plates and treated as in (D) for 24h in the presence or absence of AICAR. They were then collected and stained with propidium iodide and analyzed by flow cytometry. Experiments were done in triplicate.

Figure 2: Metabolism of AICAR in MEF-wt and MEF-dko. A) Schematic overview of the canonical purine biosynthesis pathway. B) Relative variation of intracellular AICAR and of other metabolites depending on time treatment. MEFs were grown at the density of $\sim 50,000$ cells/cm² in 6-well plates and were subjected to 1 mM AICAR treatment in a renewed medium for different periods of time. Cells were then washed once with ice-cold PBS and soluble metabolites were extracted for analysis as reported in Materials and Methods. Results are means \pm SD of triplicate experiments. Histograms of the intracellular concentrations of the metabolites AICAR, SAICAR, ZTP, S-AMP and NTPs were reported as a function of time in MEF-wt (closed bars) and in MEF-dKO (open bars) (See also supplementary data in figure S3). Intracellular concentration of the metabolites was determined from median cell volumes (in μm^3). Median volumes \pm SD at 24h of incubation: MEF-wt (-Zr) (3675 ± 2030), MEF-wt (+Zr) (3787 ± 1510), MEF-dKO (-Zr) (3146 ± 1840) and MEF-dKO (+Zr) (3609 ± 1660).

Figure 3: Gene expression microarray analysis. Gene profiling allowed to discover new candidate pathway targetted by AICAR. Analyses were performed in murine embryonic fibroblasts that have been invalidated for the two catalytic subunits of the AMPK (MEF-dKO AMPK). Kinetic gene expression profiles were obtained from MEF-dKO stimulated or not with 1 mM AICAR. Gene expression array of the cells was realized in triplicates by using Affymetrix gene chips. Functional annotation clustering was performed by using Netaffx Analysis Center (Affymetrix database) as well as the DAVID Bioinformatics Resources v6.7. A) General Schematic of the procedure. B) Histogram representation of the number of genes Up- and Down-regulated. C) Time-course of Lats1 and Lats2 mRNA upregulation in response to AICAR treatment. Values indicate the fold-increase associated with AICAR treatment. D) Venn diagram illustrates the gene overlaps between the MEF-dKO response to AICAR (murine cells) and the YAP/TAZ (human cells) signatures previously reported by Zhang *et al.*

(34). E) Schematic depicting the model of a two-wave effect of AICAR on the gene expression pattern in MEF-dKO: Lats1 and Lats2 transcripts increased after 2h of treatment with AICAR, and the YAP/TAZ-type signature was essentially observed at times 12h and 24h. F) Fold-changes in the amounts of mRNA of EGF-like growth factors and receptors in response to AICAR treatment.

Figure 4: AMPK-independent activation of the Hippo pathway under AICAR treatment. Western blot and RT-QPCR analyses of MEF-wt and MEF-dKO lysates. Exponentially growing cells were stimulated or not for different times and cell extracts were subjected to Western blot analysis for detection by specific antibodies of the following proteins and phosphorylation: Lats1, Lats2, phospho-(Thr1079)-Lats1/2, Yap1, phospho-(Ser127)-Yap. A) Lats1/2 were phosphorylated in response to AICAR treatment in MEF-dKO. B and C) Induction of Lats1 and Lats2 transcripts and proteins following treatment with AICAR and inhibition of the Yap/Taz-dependent expression of the transcripts encoding for Ctgf and Cyr61 proteins.

Figure 5: Subcellular redistribution of YAP and TAZ proteins under AICAR treatment depends on Lats1/2 and is essentially AMPK-independent. Immunofluorescence analysis. Human RPE-1 cells were seeded at low densities (5,000 cells/cm²). One day later, cells were stimulated with 3 mM AICAR. Yap/Taz subcellular localization was then monitored by immunofluorescence. A) Representative microphotographs of control RPE-1 cells (Ctrl) and of the same cells stimulated with AICAR for 4h or 24h. DAPI (blue) was used to stain cell nuclei. Scale bars: 100 μ m. B) Quantification of the cytosolic and nuclear fraction of Yap and Taz proteins by using the ImageJ software. At least ten images (more than 50 cells) taken randomly were analyzed for each experimental condition and the average intensity of fluorescence was reported as a function of time. C) Knockdown of Lats1/2 impeded the subcellular redistribution of Yap and Taz from the nucleus to the cytoplasm. In comparison, knockdown of the AMPK α 1/ α 2 has a much lower effect on the delocalization of YAP and TAZ. D) Quantification of the cytosolic and nuclear fraction of Yap and Taz proteins was carried out as in (B). E) Western blot analysis. Sparse RPE-1 cells were stimulated with 3 mM AICAR for the indicated times and cells were then extracted for immunodetection analysis.

Figure 6: Cell viability of MEFs and RPE-1 is restored by inhibition of either Lats1/2 or AMPK α 1/ α 2. siRNA knockdown experiments. Human RPE-1 cells and MEFs were seeded at the densities of 4.000 cells/cm² and 3.000 cells/cm², respectively. After 15h, cells were siRNA-transfected (si Lats1/2, si AMPK α 1/ α 2, si Lats1/2 & si AMPK α 1/ α 2), or nontarget siRNA-transfected cells (si Ctrl). The influence of siRNA-mediated knockdown on cell growth was then monitored by WST-1 after incubation for two (MEFs) or three days (RPE-1) in the presence of increasing concentrations of AICAR. Results are representative of three independent experiments and are mean \pm SD of triplicates. A non-targeting (NT) siRNA was used as control. Relative cell proliferation was set at 100%, corresponding to the signal obtained with cells transfected with the NT siRNA.

Figure S1: Anti-tumoral effect of AICAR in the glioblastoma model. Kaplan-Meier analysis of immunodeficient mice after intracranial implantation with human U87 cells (22). AICAR (500 mg/kg) or PBS as vehicle were injected intraperitoneally 6 times a week (n=30 for each condition). Percent survival was then reported as a function of time. Four animals were discarded from the analysis as they presented an extracranial tumor development.

Figure S2: A) Microphotographs showing the morphology of MEF-wt and MEF-dKO after 3 days of culture in the absence or presence of 0.25 and 1 mM AICAR. Cells were observed by phase-contrast microscopy. Scale bar: 100 μ m. B) Western blot analysis. Cell lysates were immunoblotted with anti-AMP-activated protein kinase antibodies, directed against subunits α 1 and α 2 (AMPK α 1/ α 2).

Figure S3: Metabolism of AICAR in MEF-wt and MEF-dko. A) Relative variation of ATP, ADP and AMP in MEF-wt and in MEF-dKO treated with AICAR and as a function of time. The experimental procedure was as reported in figure 2. Results are means \pm SD of triplicate experiments. The adenylate energy charge (AEC) was measured according to the equation: $AEC = [ATP] \times 0.5 [ADP] /$

[ATP]+[ADP]+[AMP] (30). B) MEFs were treated with increasing concentrations of AICAr for 48 hours in the presence or absence of 100 μ M uridine and cell proliferation was assessed by using the WST-1 colorimetric assay. Results are means \pm SD of triplicates. Experiments were carried out twice with similar results.

Figure S4: Subcellular localization of Yap and Taz proteins in MEFs immortalized by SV40-TAg. A) IF analysis was carried out in MEF-wt and in MEF-dKO treated or not with 1 mM AICAR. B) Quantitative analysis of Yap and Taz subcellular localization by ImageJ provide evidence of the decrease of these proteins in the nucleus and cytoplasm under AICAR treatment. DAPI-labeled nuclei are in blue. Scale bars: 100 μ m.

Figure S5: Subcellular localization of Yap and Taz in a primary culture of MEFs and in the human epithelial cell line RPE-1. A) IF analysis was carried out in non-immortalized MEF-wt that have been treated or not with 1 mM AICAR. B) Quantitative analysis of Yap and Taz subcellular localization by ImageJ. DAPI-labeled nuclei are in blue. Scale bars: 100 μ m. C) IF analysis showing the presence of Yap as a function of cell density in MEF-wt immortalized by SV40-TAg and in RPE-1 cells grown. Scale bars: 100 μ m.

Figure S6: Knockdown of Lats1/2 and of AMPK in MEFs and in MEF-dKO. Western blot analysis were performed after incubation of the cells for 6h with siRNA against Lats1/2, AMPK α 1/ α 2, or Lats1/2 plus AMPK α 1/ α 2. MEF-wt and MEF-dKO were then grown for two days and were then extracted for immunodetection analysis.

Table S1: Primers and siRNA used in this study.

Table S2: Modulation of the gene expression profile of MEF-dKO by AICAR.

Table S3: Analysis of the modulation of the gene expression profile of MEF-dKO by AICAR.

The first panel listed genes that were modulated by AICAR at different times of incubation. More than 2 fold ($0.5 < x < 2$).

References

1. Daignan-Fornier, B., and Pinson, B. (2012) 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranosyl 5'-Monophosphate (AICAR), a Highly Conserved Purine Intermediate with Multiple Effects, *Metabolites* 2, 292-302.
2. Ceschin, J., Saint-Marc, C., Laporte, J., Labriet, A., Philippe, C., Moenner, M., Daignan-Fornier, B., and Pinson, B. (2014) Identification of yeast and human 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-d-ribofuranoside (AICAR) transporters, *J Biol Chem* 289, 16844-16854.
3. Hardie, D. G., Ross, F. A., and Hawley, S. A. (2012) AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis, *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 251-262.
4. Gonzalez-Girones, D. M., Moncunill-Massaguer, C., Iglesias-Serret, D., Cosialls, A. M., Perez-Perarnau, A., Palmeri, C. M., Rubio-Patino, C., Villunger, A., Pons, G., and Gil, J. (2013) AICAR induces Bax/Bak-dependent apoptosis through upregulation of the BH3-only proteins Bim and Noxa in mouse embryonic fibroblasts, *Apoptosis*.
5. Santidrian, A. F., Gonzalez-Girones, D. M., Iglesias-Serret, D., Coll-Mulet, L., Cosialls, A. M., de Frias, M., Campas, C., Gonzalez-Barca, E., Alonso, E., Labi, V., Viollet, B., Benito, A., Pons, G., Villunger, A., and Gil, J. (2010) AICAR induces apoptosis independently of AMPK and p53 through up-regulation of the BH3-only proteins BIM and NOXA in chronic lymphocytic leukemia cells, *Blood* 116, 3023-3032.
6. Tang, Y. C., Williams, B. R., Siegel, J. J., and Amon, A. (2011) Identification of aneuploidy-selective antiproliferation compounds, *Cell* 144, 499-512.
7. Bardeleben, C., Sharma, S., Reeve, J. R., Bassilian, S., Frost, P., Hoang, B., Shi, Y., and Lichtenstein, A. (2013) Metabolomics identifies pyrimidine starvation as the mechanism of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-ribose-induced apoptosis in multiple myeloma cells, *Mol Cancer Ther* 12, 1310-1321.
8. Robert, G., Ben Sahra, I., Puissant, A., Colosetti, P., Belhacene, N., Gounon, P., Hofman, P., Bost, F., Cassuto, J. P., and Auberger, P. (2009) Acadesine kills chronic myelogenous leukemia (CML) cells through PKC-dependent induction of autophagic cell death, *PLoS One* 4, e7889.
9. Glazunova, V. A., Lobanov, K. V., Shakulov, R. S., Mironov, A. S., and Shtil, A. A. (2013) Acadesine Triggers Non-apoptotic Death in Tumor Cells, *Acta Naturae* 5, 74-78.
10. Guo, F., Liu, S. Q., Gao, X. H., and Zhang, L. Y. (2016) AICAR induces AMPK-independent programmed necrosis in prostate cancer cells, *Biochem Biophys Res Commun*.
11. Jose, C., Hebert-Chatelain, E., Bellance, N., Larendra, A., Su, M., Nouette-Gaulain, K., and Rossignol, R. (2011) AICAR inhibits cancer cell growth and triggers cell-type distinct effects on OXPHOS biogenesis, oxidative stress and Akt activation, *Biochim Biophys Acta* 1807, 707-718.
12. Ly, P., Kim, S. B., Kaisani, A. A., Marian, G., Wright, W. E., and Shay, J. W. (2013) Aneuploid human colonic epithelial cells are sensitive to AICAR-induced growth inhibition through EGFR degradation, *Oncogene* 32, 3139-3146.
13. Puyo, S., Hurlimann, H. C., Saint-Marc, C., Claverol, S., Ceschin, J., Moenner, M., Bonneau, M., Chevet, E., Gomes, J. E., Pinson, B., and Daignan-Fornier, B. (2016) The Ubiquitin-Activating enzyme UBA1 is critical for aneuploidy tolerance.
14. Vincent, E. E., Coelho, P. P., Blagih, J., Griss, T., Viollet, B., and Jones, R. G. (2015) Differential effects of AMPK agonists on cell growth and metabolism, *Oncogene* 34, 3627-3639.
15. Liu, X., Chhipa, R. R., Pooya, S., Wortman, M., Yachyshin, S., Chow, L. M., Kumar, A., Zhou, X., Sun, Y., Quinn, B., McPherson, C., Warnick, R. E., Kendler, A., Giri, S., Poels, J., Norga, K., Viollet, B., Grabowski, G. A., and Dasgupta, B. (2014) Discrete mechanisms of mTOR and cell cycle regulation by AMPK agonists independent of AMPK, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, E435-444.
16. Guigas, B., Taleux, N., Foretz, M., Detaille, D., Andreelli, F., Viollet, B., and Hue, L. (2007) AMP-activated protein kinase-independent inhibition of hepatic mitochondrial oxidative phosphorylation by AICA riboside, *Biochem J* 404, 499-507.
17. Narkar, V. A., Downes, M., Yu, R. T., Emblar, E., Wang, Y. X., Banayo, E., Mihaylova, M. M., Nelson, M. C., Zou, Y., Juguilon, H., Kang, H., Shaw, R. J., and Evans, R. M. (2008) AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics, *Cell* 134, 405-415.
18. Van Den Neste, E., Cazin, B., Janssens, A., Gonzalez-Barca, E., Terol, M. J., Levy, V., Perez de Oteyza, J., Zachee, P., Saunders, A., de Frias, M., and Campas, C. (2012) Acadesine for patients with relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): a multicenter phase I/II study, *Cancer Chemother Pharmacol*.

19. Cuthbertson, D. J., Babraj, J. A., Mustard, K. J., Towler, M. C., Green, K. A., Wackerhage, H., Leese, G. P., Baar, K., Thomason-Hughes, M., Sutherland, C., Hardie, D. G., and Rennie, M. J. (2007) 5-aminoimidazole-4-carboxamide 1-beta-D-ribofuranoside acutely stimulates skeletal muscle 2-deoxyglucose uptake in healthy men, *Diabetes* 56, 2078-2084.
20. Laderoute, K. R., Amin, K., Calaoagan, J. M., Knapp, M., Le, T., Orduna, J., Foretz, M., and Viollet, B. (2006) 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) is induced by low-oxygen and glucose deprivation conditions found in solid-tumor microenvironments, *Mol Cell Biol* 26, 5336-5347.
21. Auf, G., Jabouille, A., Guerit, S., Pineau, R., Delugin, M., Bouche-careilh, M., Magnin, N., Favereaux, A., Maitre, M., Gaiser, T., von Deimling, A., Czabanka, M., Vajkoczy, P., Chevet, E., Bikfalvi, A., and Moenner, M. (2010) Inositol-requiring enzyme 1alpha is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 15553-15558.
22. Auf, G., Jabouille, A., Delugin, M., Guerit, S., Pineau, R., North, S., Platonova, N., Maitre, M., Favereaux, A., Vajkoczy, P., Seno, M., Bikfalvi, A., Minchenko, D., Minchenko, O., and Moenner, M. (2013) High epiregulin expression in human U87 glioma cells relies on IRE1alpha and promotes autocrine growth through EGF receptor, *BMC Cancer* 13, 597.
23. Guo, D., Hildebrandt, I. J., Prins, R. M., Soto, H., Mazzotta, M. M., Dang, J., Czernin, J., Shyy, J. Y., Watson, A. D., Phelps, M., Radu, C. G., Cloughesy, T. F., and Mischel, P. S. (2009) The AMPK agonist AICAR inhibits the growth of EGFRvIII-expressing glioblastomas by inhibiting lipogenesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 12932-12937.
24. Theodoropoulou, S., Brodowska, K., Kayama, M., Morizane, Y., Miller, J. W., Gragoudas, E. S., and Vavvas, D. G. (2013) Aminoimidazole Carboxamide Ribonucleotide (AICAR) Inhibits the Growth of Retinoblastoma In Vivo by Decreasing Angiogenesis and Inducing Apoptosis, *PLoS One* 8, e52852.
25. Montraveta, A., Xargay-Torrent, S., Lopez-Guerra, M., Rosich, L., Perez-Galan, P., Salaverria, I., Bea, S., Kalko, S. G., de Frias, M., Campas, C., Roue, G., and Colomer, D. (2014) Synergistic anti-tumor activity of acadesine (AICAR) in combination with the anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in vivo and in vitro models of mantle cell lymphoma, *Oncotarget* 5, 726-739.
26. Rattan, R., Giri, S., Singh, A. K., and Singh, I. (2005) 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside inhibits cancer cell proliferation in vitro and in vivo via AMP-activated protein kinase, *J Biol Chem* 280, 39582-39593.
27. Theodoropoulou, S., Kolovou, P. E., Morizane, Y., Kayama, M., Nicolaou, F., Miller, J. W., Gragoudas, E., Ksander, B. R., and Vavvas, D. G. (2010) Retinoblastoma cells are inhibited by aminoimidazole carboxamide ribonucleotide (AICAR) partially through activation of AMP-dependent kinase, *FASEB J* 24, 2620-2630.
28. Baumann, P., Mandl-Weber, S., Emmerich, B., Straka, C., and Schmidmaier, R. (2007) Activation of adenosine monophosphate activated protein kinase inhibits growth of multiple myeloma cells, *Exp Cell Res* 313, 3592-3603.
29. Ceschin, J., Hurlimann, H. C., Saint-Marc, C., Albrecht, D., Violo, T., Moenner, M., Daignan-Fornier, B., and Pinson, B. (2015) Disruption of Nucleotide Homeostasis by the Antiproliferative Drug 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-d-ribofuranoside Monophosphate (AICAR), *J Biol Chem* 290, 23947-23959.
30. Atkinson, D. E., and Walton, G. M. (1967) Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation. Rat liver citrate cleavage enzyme, *J Biol Chem* 242, 3239-3241.
31. Thomas, C. B., Meade, J. C., and Holmes, E. W. (1981) Aminoimidazole carboxamide ribonucleoside toxicity: a model for study of pyrimidine starvation, *J Cell Physiol* 107, 335-344.
32. Yu, F. X., and Guan, K. L. (2013) The Hippo pathway: regulators and regulations, *Genes Dev* 27, 355-371.
33. Hansen, C. G., Moroishi, T., and Guan, K. L. (2015) YAP and TAZ: a nexus for Hippo signaling and beyond, *Trends Cell Biol* 25, 499-513.
34. Zhang, H., Liu, C. Y., Zha, Z. Y., Zhao, B., Yao, J., Zhao, S., Xiong, Y., Lei, Q. Y., and Guan, K. L. (2009) TEAD transcription factors mediate the function of TAZ in cell growth and epithelial-mesenchymal transition, *J Biol Chem* 284, 13355-13362.
35. Cebola, I., Rodri'guez-Segui', S. A., Cho, C. H.-H., and et al. (2015) TEAD and YAP regulate the enhancer network of human embryonic pancreatic progenitors, *Nat Cell Biol* 17, 615-626.
36. Citri, A., and Yarden, Y. (2006) EGF-ERBB signalling: towards the systems level, *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 505-516.
37. He, C., Lv, X., Hua, G., Lele, S. M., Remmenga, S., Dong, J., Davis, J. S., and Wang, C. (2015) YAP forms autocrine loops with the ERBB pathway to regulate ovarian cancer initiation and progression, *Oncogene* 34, 6040-6054.

38. Meng, Z., Moroishi, T., and Guan, K. L. (2016) Mechanisms of Hippo pathway regulation, *Genes Dev* 30, 1-17.
39. Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R. S., Yang, Q., Kim, J., Xie, J., Ikenoue, T., Yu, J., Li, L., Zheng, P., Ye, K., Chinnaiyan, A., Halder, G., Lai, Z. C., and Guan, K. L. (2007) Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control, *Genes Dev* 21, 2747-2761.
40. Kim, J., Jo, H., Hong, H., Kim, M. H., Kim, J. M., Lee, J. K., and Heo, W. D. (2015) Actin remodelling factors control ciliogenesis by regulating YAP/TAZ activity and vesicle trafficking, *Nat Commun* 6, 6781.
41. Nguyen, H. T., Hong, X., Tan, S., Chen, Q., Chan, L., Fivaz, M., Cohen, S. M., and Voorhoeve, P. M. (2014) Viral small T oncoproteins transform cells by alleviating hippo-pathway-mediated inhibition of the YAP proto-oncogene, *Cell Rep* 8, 707-713.
42. Shanzer, M., Ricardo-Lax, I., Keshet, R., Reuven, N., and Shaul, Y. (2015) The polyomavirus middle T-antigen oncogene activates the Hippo pathway tumor suppressor Lats in a Src-dependent manner, *Oncogene* 34, 4190-4198.
43. Gowans, G. J., and Hardie, D. G. (2014) AMPK: a cellular energy sensor primarily regulated by AMP, *Biochem Soc Trans* 42, 71-75.
44. Mo, J. S., Meng, Z., Kim, Y. C., Park, H. W., Hansen, C. G., Kim, S., Lim, D. S., and Guan, K. L. (2015) Cellular energy stress induces AMPK-mediated regulation of YAP and the Hippo pathway, *Nat Cell Biol* 17, 500-510.
45. Wang, W., Xiao, Z. D., Li, X., Aziz, K. E., Gan, B., Johnson, R. L., and Chen, J. (2015) AMPK modulates Hippo pathway activity to regulate energy homeostasis, *Nat Cell Biol* 17, 490-499.
46. Siam, R., Harada, R., Cadieux, C., Battat, R., Vadnais, C., and Nepveu, A. (2009) Transcriptional activation of the Lats1 tumor suppressor gene in tumors of CUX1 transgenic mice, *Molecular cancer* 8, 60.
47. Moroishi, T., Park, H. W., Qin, B., Chen, Q., Meng, Z., Plouffe, S. W., Taniguchi, K., Yu, F. X., Karin, M., Pan, D., and Guan, K. L. (2015) A YAP/TAZ-induced feedback mechanism regulates Hippo pathway homeostasis, *Genes Dev* 29, 1271-1284.
48. Chen, Q., Zhang, N., Xie, R., Wang, W., Cai, J., Choi, K. S., David, K. K., Huang, B., Yabuta, N., Nojima, H., Anders, R. A., and Pan, D. (2015) Homeostatic control of Hippo signaling activity revealed by an endogenous activating mutation in YAP, *Genes Dev* 29, 1285-1297.
49. Zanconato, F., Cordenonsi, M., and Piccolo, S. (2016) YAP/TAZ at the Roots of Cancer, *Cancer Cell* 29, 783-803.
50. Santinon, G., Pocaterra, A., and Dupont, S. (2016) Control of YAP/TAZ Activity by Metabolic and Nutrient-Sensing Pathways, *Trends Cell Biol* 26, 289-299.
51. Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell* 144, 646-674.
52. Harvey, K. F., Zhang, X., and Thomas, D. M. (2013) The Hippo pathway and human cancer, *Nat Rev Cancer* 13, 246-257.
53. Overholtzer, M., Zhang, J., Smolen, G. A., Muir, B., Li, W., Sgroi, D. C., Deng, C. X., Brugge, J. S., and Haber, D. A. (2006) Transforming properties of YAP, a candidate oncogene on the chromosome 11q22 amplicon, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 12405-12410.
54. Dong, J., Feldmann, G., Huang, J., Wu, S., Zhang, N., Comerford, S. A., Gayyed, M. F., Anders, R. A., Maitra, A., and Pan, D. (2007) Elucidation of a universal size-control mechanism in Drosophila and mammals, *Cell* 130, 1120-1133.
55. Moroishi, T., Hansen, C. G., and Guan, K. L. (2015) The emerging roles of YAP and TAZ in cancer, *Nat Rev Cancer* 15, 73-79.
56. Banek, C. T., Bauer, A. J., Needham, K. M., Dreyer, H. C., and Gilbert, J. S. (2013) AICAR administration ameliorates hypertension and angiogenic imbalance in a model of preeclampsia in the rat, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 304, H1159-1165.
57. Fitzgerald, J. P., Nayak, B., Shanmugasundaram, K., Friedrichs, W., Sudarshan, S., Eid, A. A., DeNapoli, T., Parekh, D. J., Gorin, Y., and Block, K. (2012) Nox4 mediates renal cell carcinoma cell invasion through hypoxia-induced interleukin 6- and 8- production, *PLoS One* 7, e30712.
58. Kim, H. S., Kim, M. J., Kim, E. J., Yang, Y., Lee, M. S., and Lim, J. S. (2012) Berberine-induced AMPK activation inhibits the metastatic potential of melanoma cells via reduction of ERK activity and COX-2 protein expression, *Biochem Pharmacol* 83, 385-394.

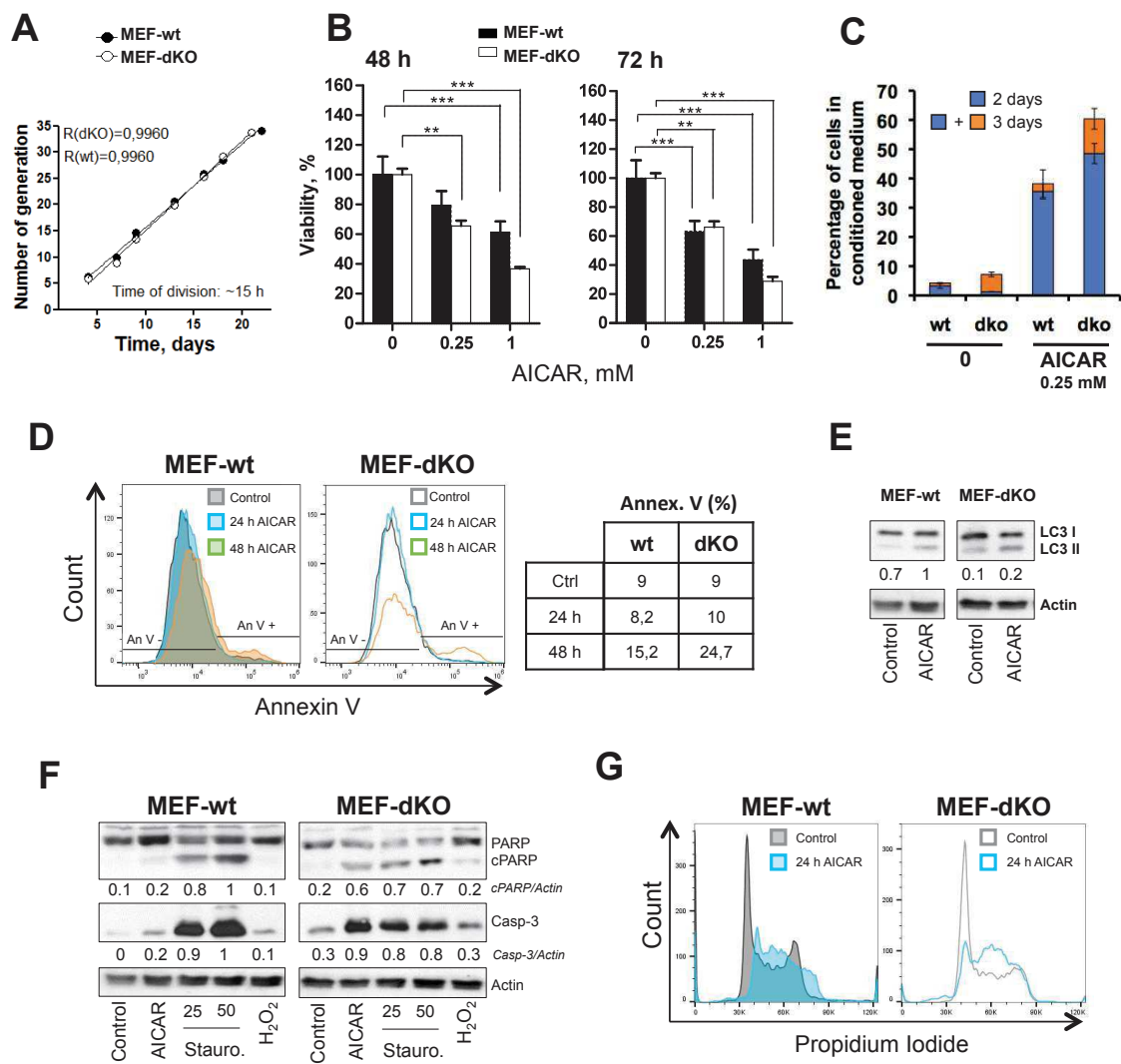


Figure 1
Philippe et al. 2016

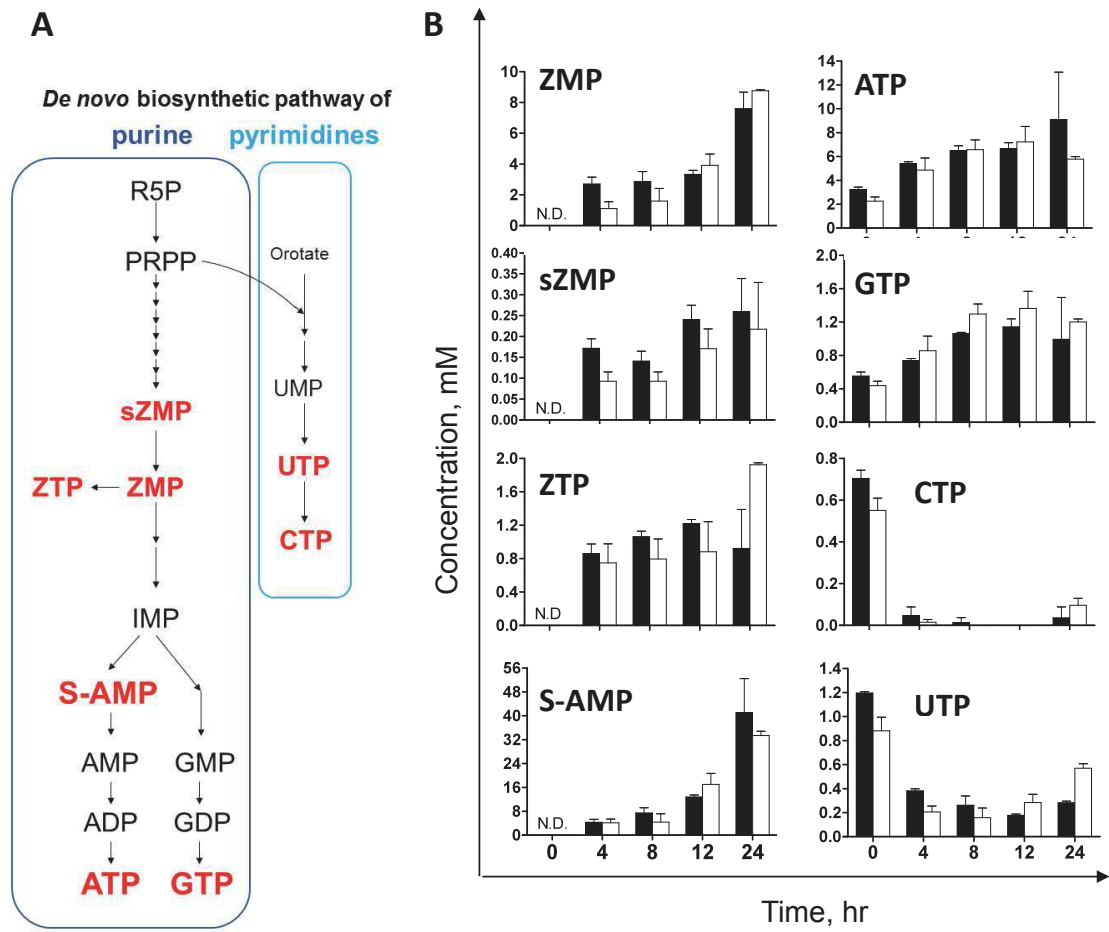


Figure 2
Philippe et al. 2016

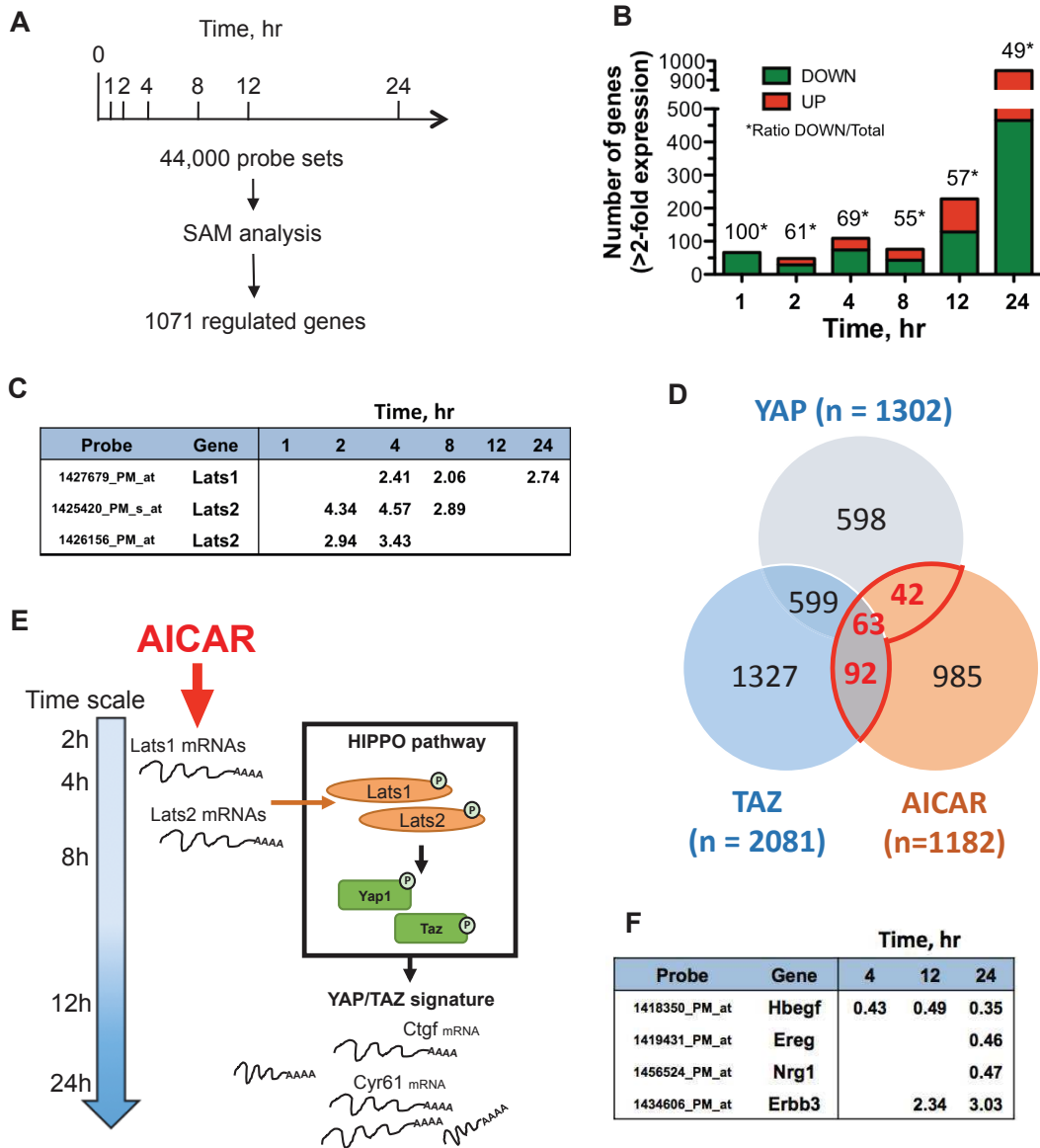


Figure 3
Philippe et al. 2016

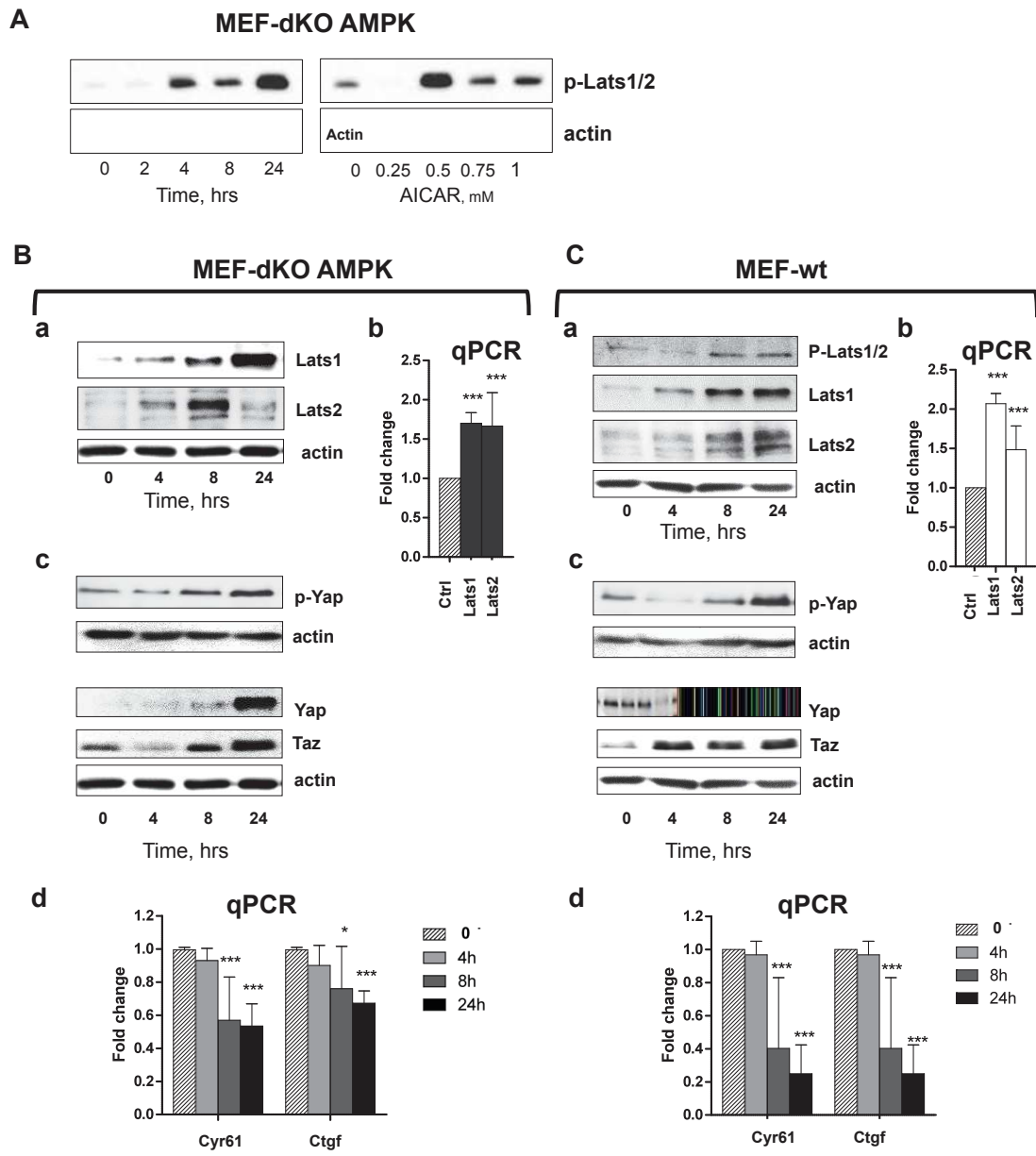


Figure 4
Philippe et al. 2016

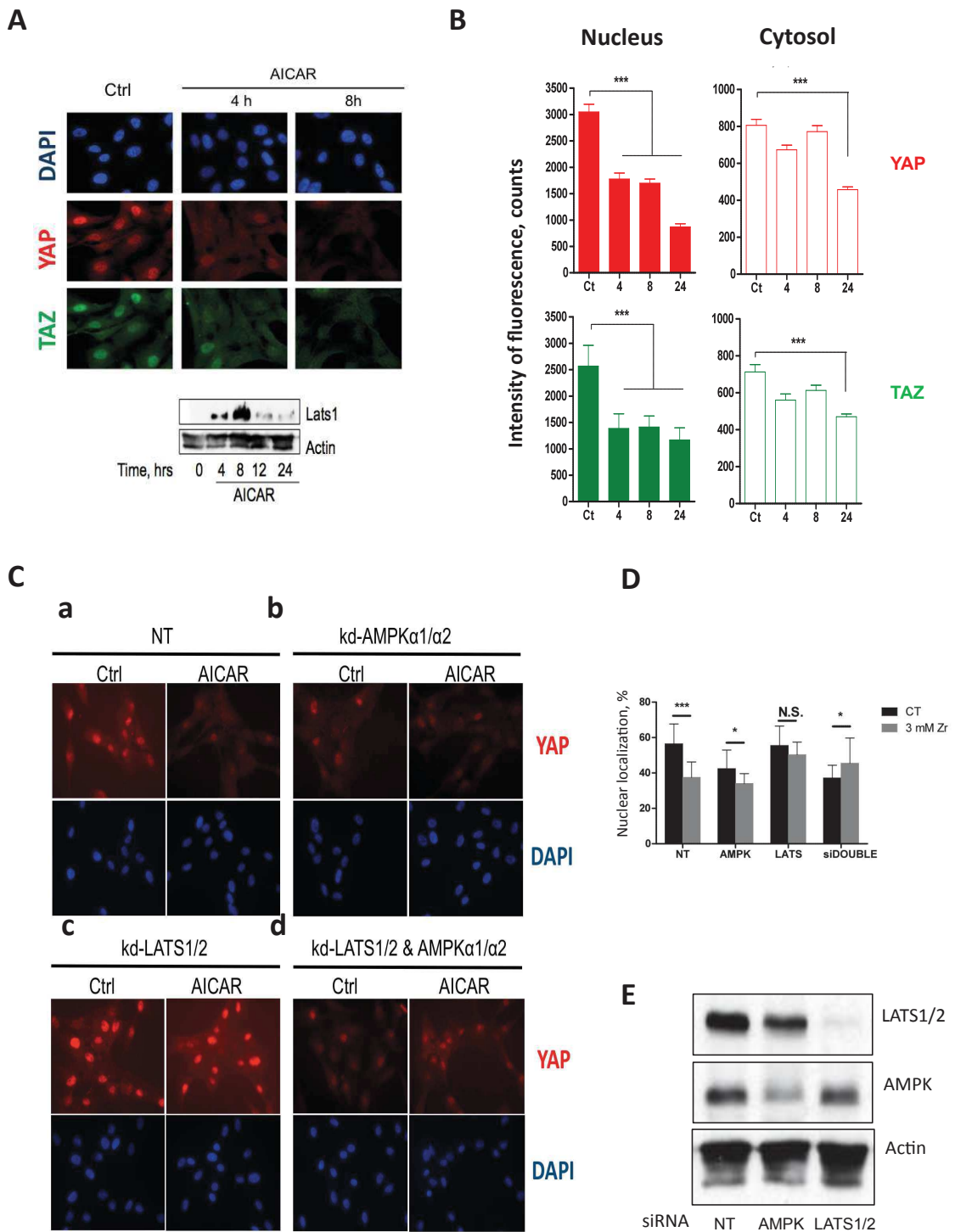
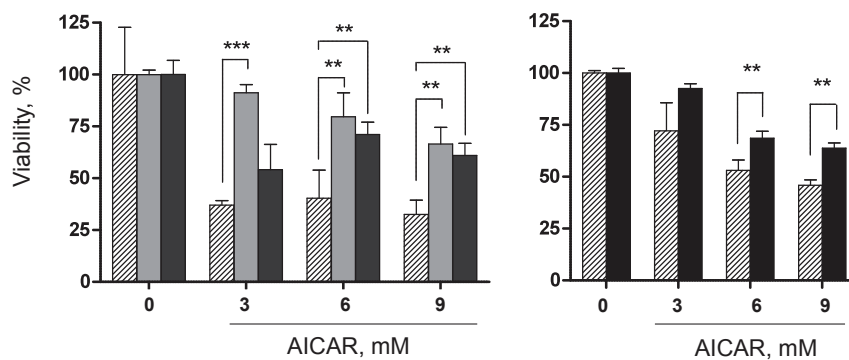


Figure 5
Philippe et al. 2016

P-LATS1 ?
YAP voir avec le monoclonal
P-YAP ?
retirer YAP et TAZ pour ne garder que LATS1

1B : Supprimer AICAR 2.5 mM
Ctrl
manque barre dimensions

RPE-1



MEF

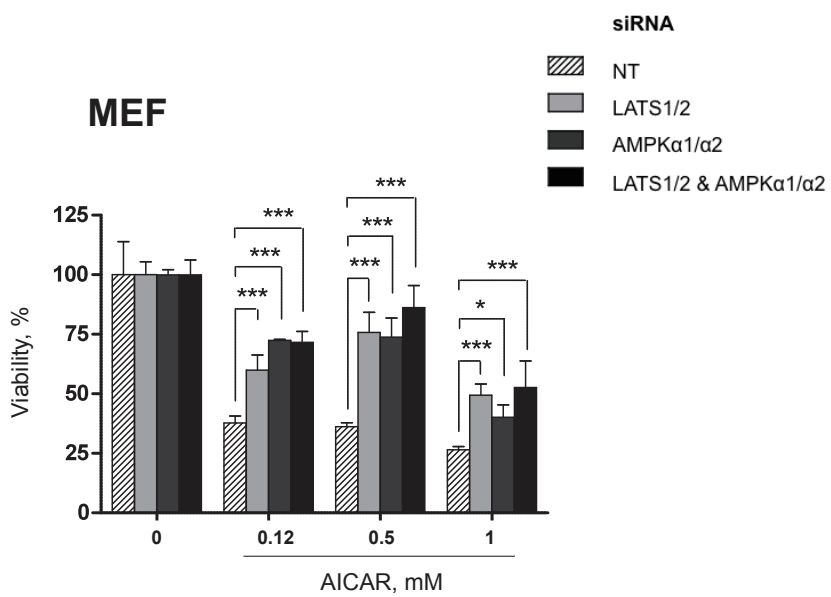


Figure 6
Philippe et al. 2016

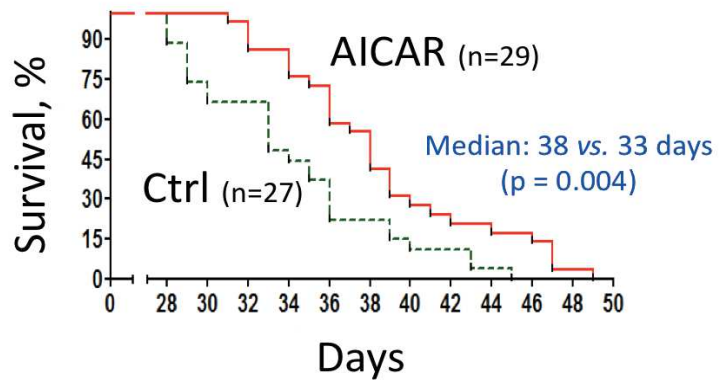


Figure S1
Philippe et al. 2016

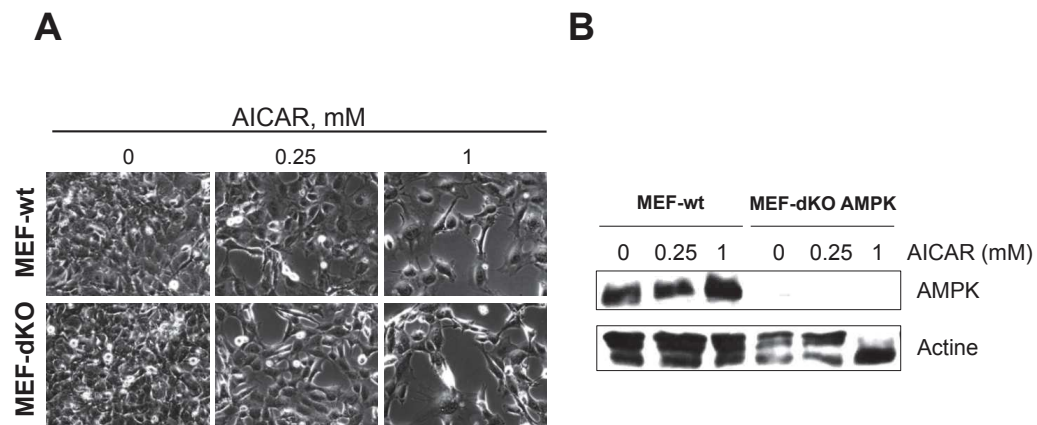


Figure S2
Philippe et al. 2016

A

	Time, hours	AEC	STD
MEF-wt	0	0.940	0.146
	4	0.932	0.109
	8	0.939	0.158
	12	0.950	0.146
	24	0.931	0.561
MEF-dKO	0	0.939	0.299
	4	0.942	0.399
	8	0.945	0.249
	12	0.923	0.353
	24	0.916	0.105

B

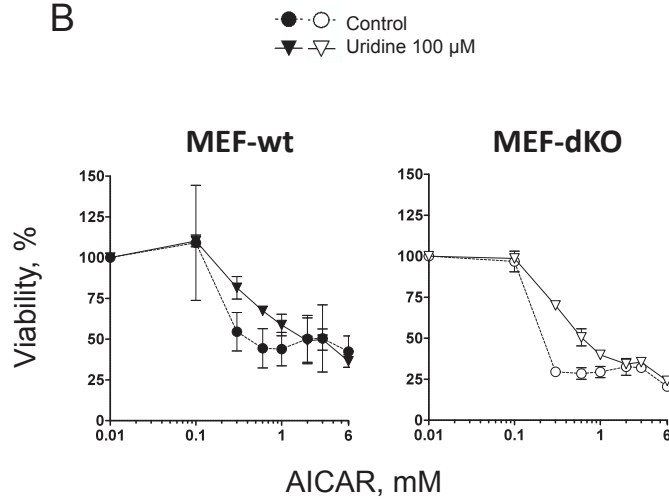


Figure S3
Philippe et al. 2016

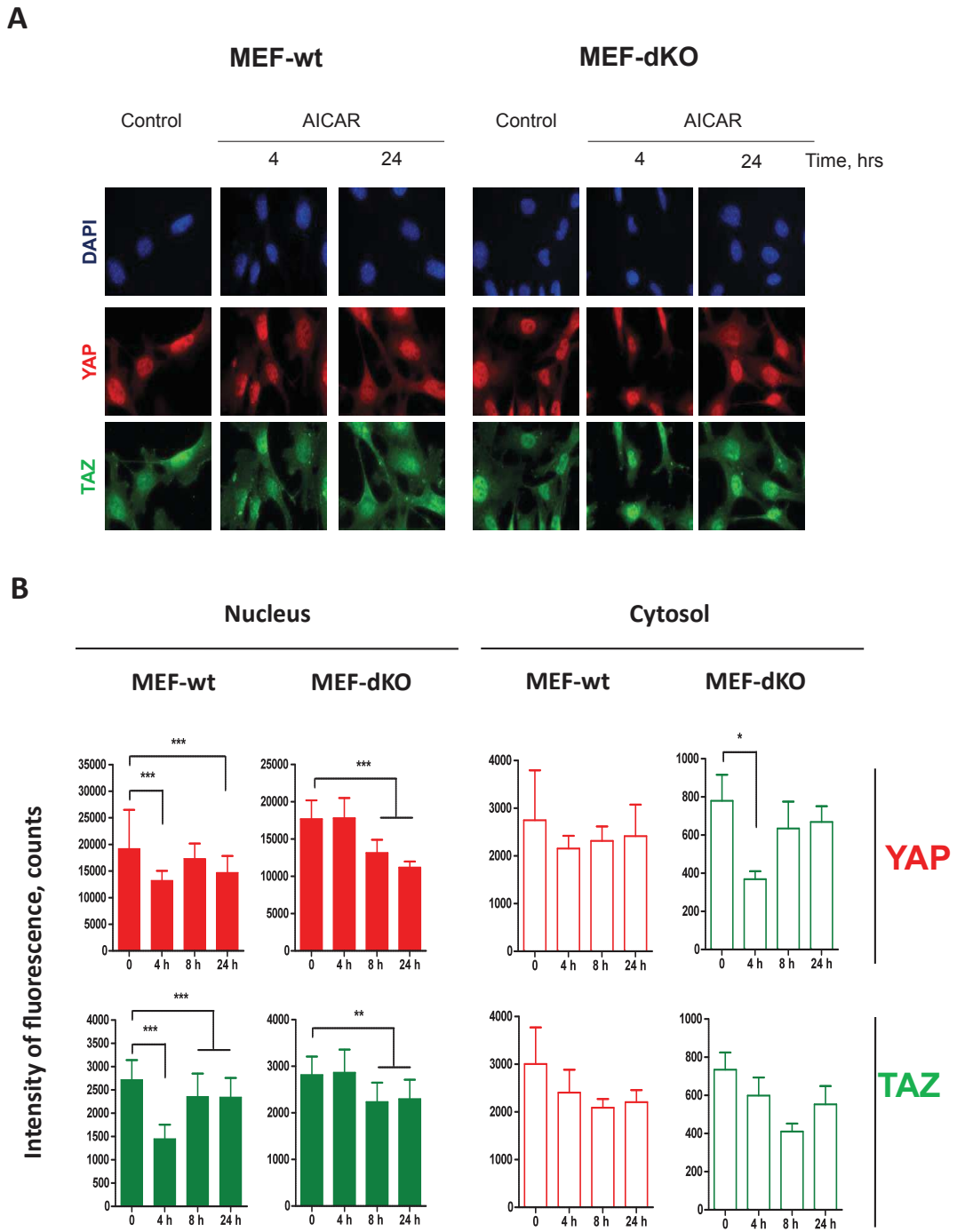


Figure S4
Philippe et al. 2016

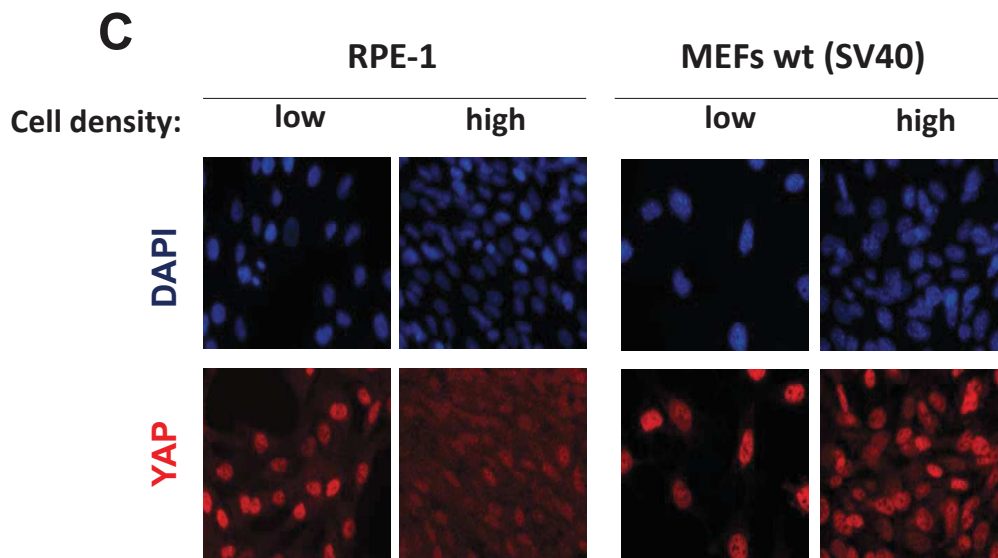
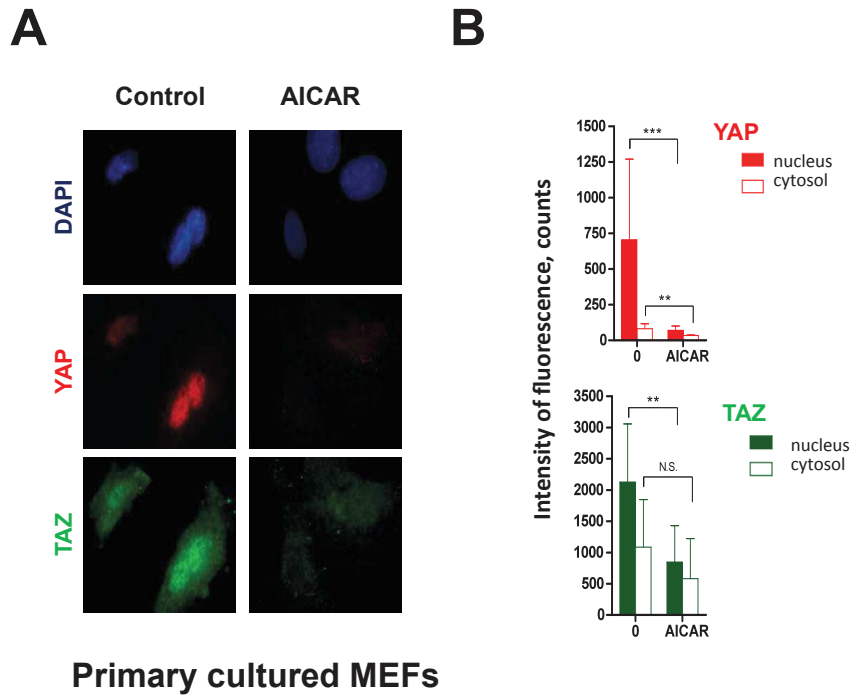


Figure S5
Philippe et al. 2016

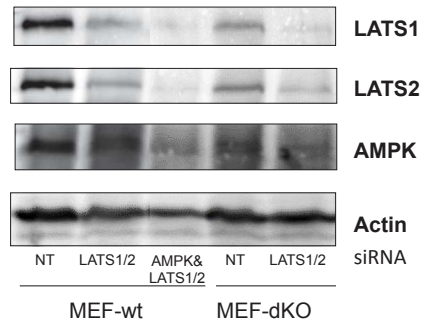


Figure S6
Philippe et al. 2016

Cluster No	HIGH STRINGENCY Cluster	Number of genes	p-value
1	Intracellular organelle lumen	89	1.5×10^{-11}
2	RNA recognition motif, RNP-1	38	2.9×10^{-11}
3	Regulation of transcription	174	1.6×10^{-8}
4	mRNA processing	30	2.4×10^{-5}
5	Negative regulation of gene expression/cellular biosynthetic process	43	7.3×10^{-5}
6	MAP kinase phosphatase/Dual specificity phosphatase	43	6.5×10^{-5}
7	Positive regulation of cell motion	10	2.2×10^{-4}
8	Mitotic cell cycle	28	2.0×10^{-4}
9	Dephosphorylation	19	4.1×10^{-4}
10	Protein-tyrosine phosphatase	13	4.9×10^{-4}

Table S3
Philippe et al. 2016

C. Résultats complémentaires

1. Effet antitumoral de l'AICAR dans le modèle murin

L'AICAR est cytotoxique sur les cellules en culture^{14,20,27}. Pour évaluer le potentiel antitumoral de cette molécule, plusieurs auteurs ont réalisé des xénogreffes sous-cutanées chez l'animal^{14,25,28,29}. Cette méthode consiste à injecter en sous-cutané (sous le flan de l'animal) des cellules tumorales humaines ou de souris et à suivre ensuite la progression de la masse tumorale. Les souris que nous avons utilisées pour notre étude sont des souris immunodéficientes (RAG-gamma2c).

Nous avons souhaité vérifier l'effet antitumoral de l'AICAR sur un modèle que nous maîtrisons et qui est celui du glioblastome, tumeur maligne cérébrale ayant pour origine la transformation des astrocytes. Aucun traitement efficace n'existe à l'heure actuelle pour empêcher la progression de ces tumeurs. L'exérèse chirurgicale, suivie d'un traitement au témozolomide, composé alkylant anticancéreux, est la seule thérapie donnant des résultats notables. La résistance des glioblastomes aux traitements ainsi que son niveau d'agressivité élevée ont pour conséquence un pronostic de rémission quasiment nul. La mise au point de nouveaux traitements s'avère donc essentielle pour ces cancers. Nous avons choisi de mesurer l'effet de l'AICAR sur le modèle de glioblastome humain. Nous avons pu bénéficier des compétences du personnel de l'animalerie de Bordeaux pour la bonne maîtrise de ce modèle (Raphaël Pineau, Animalerie Mutualisée – Université de Bordeaux- Talence).

L'effet antitumoral de l'AICAR a été évalué d'une part sur des xénogreffes sous-cutanées de deux lignées tumorales humaines issue de glioblastome les U87-MG et les SF188 (Fig. 23) ; et d'autre part en xénogreffes intracérébrales (Fig. 24). Une étude pilote initiale nous a permis d'évaluer les effets de l'AICAR sur les souris en bonne santé, afin de déterminer les concentrations optimales de traitement.

a. L'étude pilote

Une étude pilote nous a permis de tester l'impact d'injections quotidiennes d'AICAR sur des souris en bonne santé. Différentes quantités d'AICAR (250, 375 ou 500 mg par kg et par jour) ont été utilisées afin de choisir une dose de traitement à l'AICAR sur notre modèle animal. Nous avons analysé les conséquences des traitements à l'AICAR sur 19 jours de traitement. L'objectif était de connaître la tolérance de l'animal à différentes doses d'AICAR sur une durée correspondant à l'expérimentation animal qui suit (Fig. 23 et 24). Notons que l'AICAR est considéré comme un produit dopant et qu'il peut être utilisé à des doses importantes sans toxicité notable.

Plusieurs critères ont été utilisés pour l'analyse des effets de l'AICAR sur les souris. Dans un premier temps, nous avons observé le comportement animal. Un état de détresse et de souffrance se manifestent par un changement de comportement de l'animal : perte d'appétit, réaction face au manipulateur, un changement de comportement entre les animaux (retrait, agressivité). Une valeur mesurable et objective de stress est la mesure du poids de l'animal, laquelle traduit un état de détérioration physiologique et de souffrance. Les souris ont été pesées quotidiennement et nous avons donc analysé leur comportement à chaque pesée.

Lors de cette étude pilote, nous avons observé un comportement plus tonique des souris traitées à l'AICAR par rapport au souris normales. De plus, le poids des animaux traités à l'AICAR augmente significativement durant le traitement (Fig. 22), ce qui est un signe de l'augmentation de la masse musculaire. Ces signes traduisent une bonne réaction à l'AICAR pour des doses comprises entre 250 et 500 mg/kg/jour. La dose maximale a été ensuite utilisée dans le cadre de nos études sur le développement tumoral. Par comparaison, des quantités d'AICAR allant de 100 à 500 mg/kg/jour d'AICAR sont utilisées par d'autres auteurs ^{14,25,28,29}, ce qui correspond à nos valeurs et indique que notre lignée de souris ne présente pas de sensibilité particulière à ce composé.

b. Xénogreffes de lignées tumorales en sous-cutané

Nous avons évalué l'effet antitumoral de l'AICAR sur le développement de xénogreffe tumorales en sous-cutané. Les lignées humaines de glioblastomes U87-MG et SF188 ont été utilisées. Les résultats obtenus sont les suivants :

L'AICAR n'a pas d'effet antitumoral dans le cas des xénogreffes des cellules U87. Nos résultats sont identiques à ceux obtenus par l'équipe de Guo *et al.*

L'AICAR a un effet antitumoral significatif au bout de 20 jours de traitement pour les xénogreffes de cellules SF188 (Fig. 23).

Dans notre étude, l'effet de l'AICAR peut donc être différent selon la lignée tumorale utilisée.

c. Xénogreffe de lignées tumorales en intra-cérébral

L'étude des effets de l'AICAR a été également réalisée en orthotopique, c'est à dire en implantant les cellules de glioblastome humain en intracérébral chez la souris. Les astrocytes humains transformés se retrouvent ainsi dans un environnement cellulaire le plus proche possible de celui qui était le leur initialement. Les lignées humaines de glioblastome U87 et SF188 ont été étudiées.

Dans ce modèle, et contrairement à celui des xénogreffes sous-cutanées, la tumeur se développe en intracérébral et sa croissance n'est donc pas mesurable. Les critères retenus pour suivre la progression tumorale sont la mesure quotidienne du poids de la souris ainsi que la modification de son comportement. Les lois bioéthiques préconisent le sacrifice de l'animal lorsqu'une perte de plus de 20 % du poids initial est quantifiée. A l'animalerie, la détérioration de l'état de santé de l'animal est observée bien avant cette perte de 20 % et les souris sont donc sacrifiées après une perte d'environ 10 % de ce poids initial. Le nombre de sacrifice est comptabilisé tous les jours afin d'obtenir une courbe dite de survie selon Kaplan-Meier (Fig. 24). Différents organes ont été prélevés pour chaque sacrifice (cerveaux, foie, rate) en vue d'analyses histologiques. De plus, un prélèvement sanguin a été effectué par ponction cardiaque pour quelques animaux.

Les résultats obtenus sont les suivants :

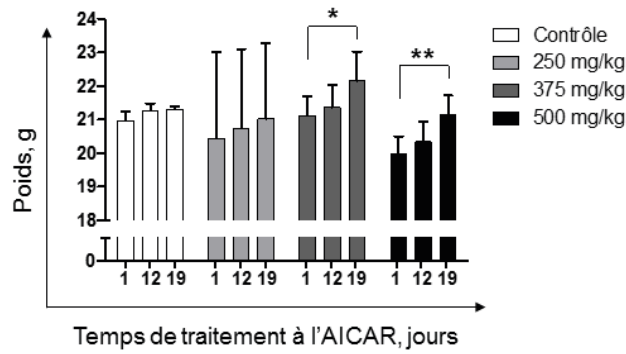


Figure 22 : Impact du traitement à l'AICAR sur le poids des souris.

Des injections intra-péritonéales ont été effectuées durant 19 jours au PBS ou à différentes doses d'AICAR. Les souris sont pesées quotidiennement. La quantité de souris pour chaque condition est de 5. La significativité des résultats a été calculée grâce au test t. La présence d'une étoile (*) ou deux étoiles (**) signifie des p values $p < 0,05$ et $p < 0,01$, respectivement.

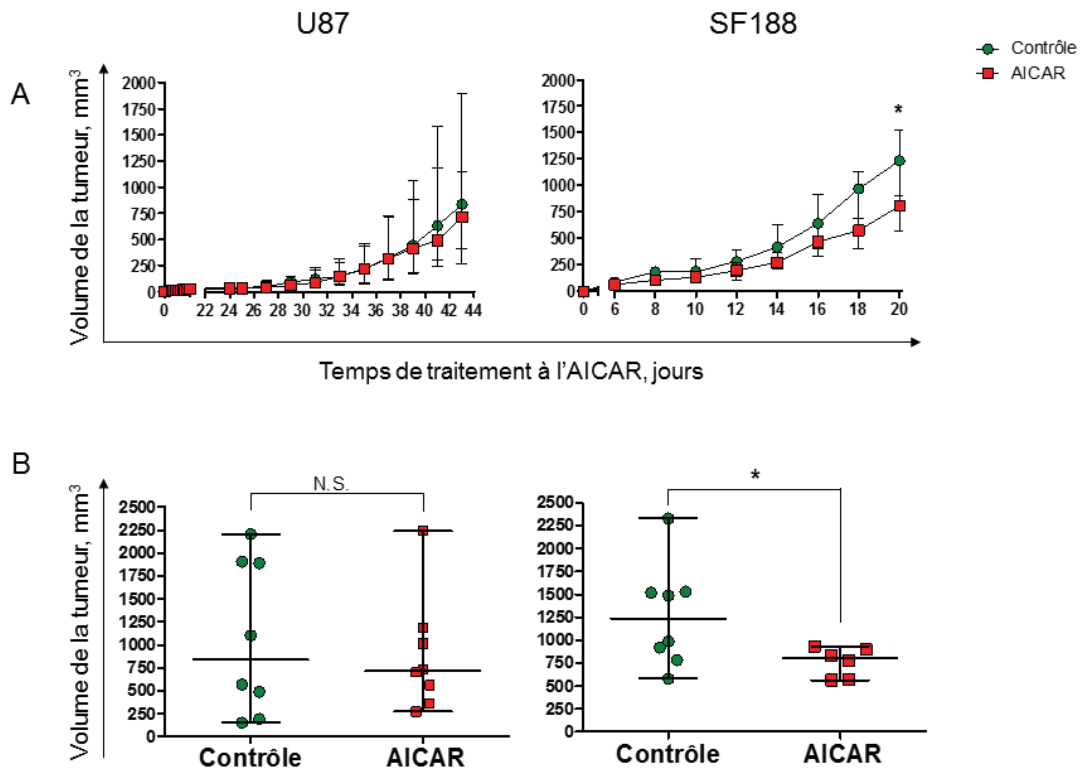


Figure 23 : Xénogreffes sous-cutanées de lignées tumorales issues de glioblastome U87 et SF188 chez la souris immunodéficiente.

Deux lots de souris immunodéficientes ont subi une injection en sous cutanée de cellules U87 pour le premier lot et de cellules SF188 pour un deuxième lot. Chaque lot a été divisé en deux lots identiques : un lot contrôle traité au PBS et un lot de souris traitées à 500 mg/kg d'AICAR quotidiennement ($n=8$). Notons que deux souris ont été exclues pour la condition traitée à l'AICAR en raison d'injections en partie intra-musculaires. Les volumes des tumeurs ont été mesurés tous les deux jours et la progression tumorale est représentée en fonction du temps (A). Les volumes obtenus le dernier jour de l'étude sont également représentés (B). La significativité des résultats a été calculée grâce au test t. (*) $p < 0,05$.

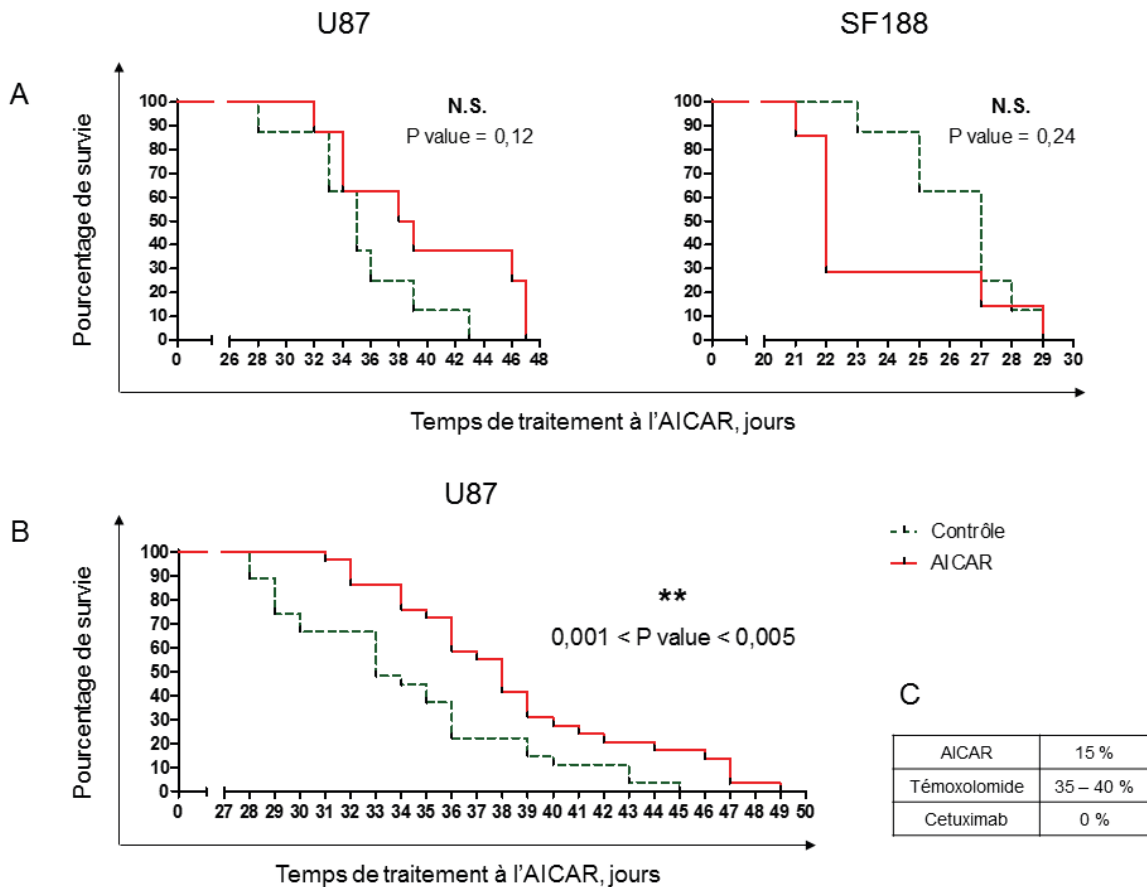


Figure 24 : Xénogreffes intra-cérébrales de lignées tumorales issues de glioblastome (U87 et SF188) chez la souris immunodéficiente.

A) Deux lots de souris immunodéficientes ont subi une injection intra-cérébrale de cellules U87 (lot 1) et de cellules SF188 (lot 2). Chaque lot a été subdivisé en deux : contrôle traité au PBS et souris traitées à 500 mg/kg d'AICAR quotidiennement (n=8). Les résultats sont représentés selon Kaplan-Meier : % de survie en fonction du temps. B) Seconde expérience effectuée à l'identique pour les U87 avec un échantillonnage plus élevé (29 souris par condition). Notons que deux souris ont été exclues pour la condition contrôle pour des défauts d'injection. C) Les augmentations des médianes de survie entre les conditions traitées à l'AICAR, au témozolomide ou au Cetuximab par rapport à la condition contrôle sont présentées en pourcentage. Les données sont obtenues pour un modèle de xénogreffe intra-cérébral d'U87 pour les trois drogues. La significativité des résultats a été calculée grâce au test log-rank (**; $p < 0,01$).

L'AICAR n'a pas d'effet sur la survie des souris ayant subi une xénogreffe de cellules SF188 (Fig. 24 A). Par contre, nous avons observé une tendance à l'amélioration de la durée de vie pour la condition traitée à l'AICAR dans le cas de la xénogreffe des cellules U87, par rapport à la condition contrôle (Fig 24 A). Cependant, l'échantillonnage étant trop petit ($n = 8$), la différence entre les deux groupes n'est pas significative. Nous avons donc effectué une deuxième expérience en augmentant l'échantillonnage ($n = 21$). Ces expériences montrent que l'AICAR améliore significativement la durée de vie des souris (Fig. 24 B ; Fig. S1, article 2).

Dans cette étude préclinique, nous avons montré que l'AICAR a un effet antitumoral sur deux modèles tumoraux étudiés en sous-cutané et intracérébral. Cet effet est observable pour les SF188 en

modèle sous-cutané et pour les U87 en modèle tumoral intracérébral. Ces différences traduisent vraisemblablement un effet cytotoxique différent de l'AICAR selon le type de tumeur et sa localisation.

L'AICAR permet une augmentation de la survie animale de 15%. En comparaison, le cétuximab (anticorps anti EGFR) n'a aucun effet. Le témolozomide, unique agent antitumoral efficace actuellement sur les patients atteints de glioblastome, conduit à des augmentations de l'ordre de 40%. L'effet que nous observons de l'AICAR sur le modèle de xénogreffe intracérébrale démontre son potentiel antitumoral.

2. CUX1, facteur de transcription induisant LATS1

L'analyse des variations des transcrits cellulaires observés lors d'un traitement à l'AICAR nous a permis de mettre en évidence une augmentation des ARNm de LATS1 et LATS2, protéines appartenant au centre fonctionnel de la voie de transduction HIPPO. Nous avons observé que ces variations précèdent celles correspondant à la modulation d'une signature transcriptionnelle caractéristique de la voie HIPPO. L'ensemble de ces données est cohérent avec les données de la littérature sur la voie HIPPO.

Cependant, la cible en amont de l'AICAR à l'origine de ces effets n'est pas mise en évidence pour autant. Nous avons donc recherché s'il existait une protéine déjà caractérisée capable de réguler l'expression de LATS1 et LATS2. Nos études bibliographiques nous ont conduits à considérer la protéine CUX1 (Cut homeobox 1), un facteur de transcription induisant l'expression des transcrits de LATS1, comme cible potentielle de l'AICAR.

Plusieurs arguments nous ont permis d'envisager que la protéine CUX1 était un candidat potentiel pour une fixation d'AICAR (Fig. 25 A) :

- Siam *et al.* ont montré que la protéine CUX1 se fixe sur le promoteur de LATS1 et active ainsi son expression ¹³².
- CUX1 est retenu sur colonne d'affinité à l'AICAR (Benoit PINSON, communication personnelle), suggérant une interaction directe AICAR-CUX1 ou indirecte *via* un complexe protéique auquel appartiendrait CUX1.
- Nos études transcriptomiques indiquent qu'environ 75 gènes cibles de CUX1 sont également modulés par l'AICAR (Fig. 25 B) ¹³³.
- L'activation de CUX1 par l'AICAR serait cohérente avec l'observation de certaines propriétés antitumorales de l'AICAR (décrites dans la littérature ou observées au laboratoire) qui sont similaires aux effets obtenus après sur-expression de CUX1 : accumulation de cellules en phase S, effets sur la mitose, modulation de l'angiogenèse et de l'invasion tumorales.

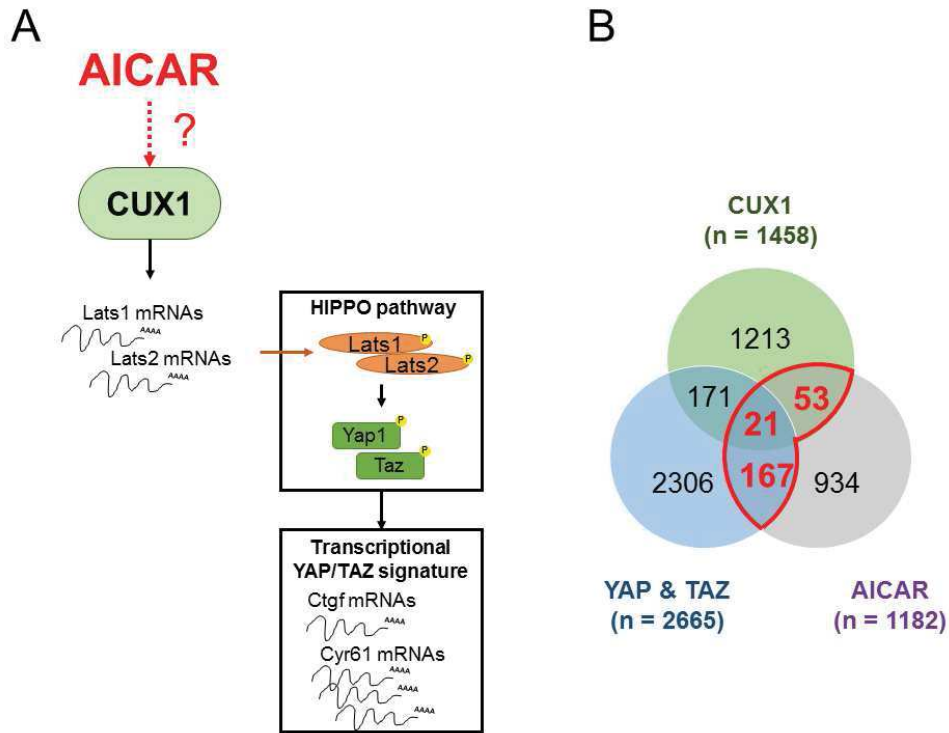


Figure 25 : CUX1 pourrait être la cible directe de l'AICAR

A) L'activation de la voie HIPPO par l'AICAR est en partie responsable de la cytotoxicité de l'AICAR. Plusieurs éléments nous permettent de penser que le facteur de transcription CUX1 fixerait l'AICAR. Cette fixation entrainerait une augmentation de l'expression de LATS1 responsable de l'activation de la voie HIPPO. B) Dans ce diagramme de Venn, chaque n représente le nombre total des gènes modulés par CUX1, YAP&TAZ et l'AICAR. Les chiffres en rouges indique les signatures communes entre l'AICAR/CUX1, l'AICAR/YAP&TAZ et l'AICAR/CUX1/YAP&TAZ.

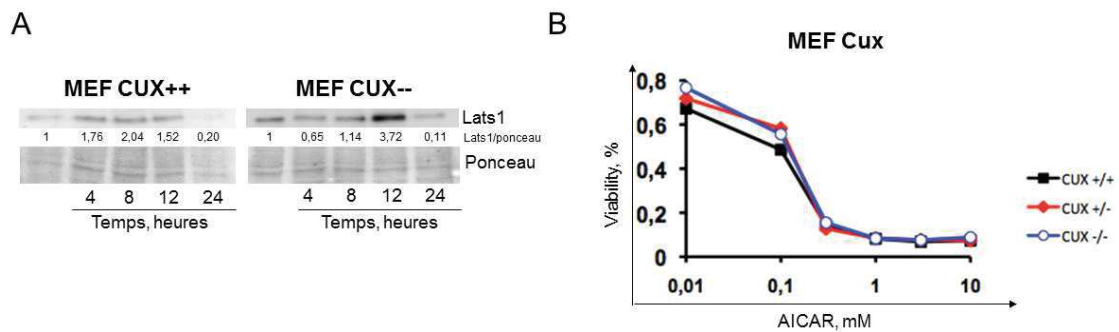


Figure 26 : Résultats obtenus sur les MEF-Cux+/+ et MEF-Cux-/-

A) Etude des variations protéiques de LATS1 en cinétique pour les MEF-Cux+/+ et MEF-Cux-/- après 1 mM de traitement à l'AICAR. B) Etude de la viabilité des MEF-Cux+/+, MEF-Cux+/- et MEF-Cux-/- après 3 jours de traitement et à différentes concentrations de traitement à l'AICAR.

Afin d'étudier les rôles de l'AICAR sur la fonction de CUX1, nous nous sommes procuré des MEFs sauvages (MEF-Cux^{+/+}) et invalidés génétiquement pour un allèle (MEF-Cux^{+/-}) ou les deux allèles (MEF-Cux^{-/-}) du gène codant pour Cux1 (don d'Alain NEPVEU ; McGill University Health Center, Montreal, Quebec).

Nous avons voulu vérifier si l'AICAR induisait l'expression de la protéine LATS1 dans les cellules MEF-Cux^{+/+} et MEF-Cux^{-/-}. Nos résultats obtenus par Western blot indiquent que la protéine LATS1 est augmentée dans les deux types cellulaires (Fig. 26 A), ce qui exclut un effet éventuel de CUX dans cette augmentation. De plus, un test de viabilité cellulaire (test au WST1) indique une cytotoxicité similaire de l'AICAR pour les MEF-Cux^{+/+} et pour les MEF-Cux^{-/-} (Fig. 26 B). Ces résultats n'ont donc pas permis de valider notre hypothèse de départ sur un rôle potentiel de la protéine CUX1 dans la réponse à l'AICAR conduisant à la surexpression de LATS1.

Ces résultats nous ont permis cependant de confirmer dans un autre modèle cellulaire ceux obtenus sur les MEF-wt, MEF-dKO AMPK ainsi que les cellules humaines RPE-1 (Fig. 4, article 2). En effet, les MEFs-CUX présentent un fond génétique différent des MEFs-AMPK et n'ont pas été immortalisées.

DISCUSSION / CONCLUSION

1. L'AICAR et l'AMPK

L'AICAR, métabolite intermédiaire de la voie de biosynthèse des purines, possède des propriétés antitumorales qui sont dépendantes de son entrée dans le cytoplasme via des transporteurs aux nucléosides et de sa conversion en sa forme monophosphorylée ZMP. De nombreux travaux réalisés précédemment sur l'AICAR attribuent cet effet antitumoral à la propriété de l'AICAR de mimer l'AMP en se fixant et activant l'enzyme kinase AMP-dépendante (AMPK). Cependant, nos résultats nous ont conduits à penser que l'effet cytotoxique de l'AICAR était complètement indépendant de la présence de l'AMPK.

L'utilisation de cellules invalidées ou non pour l'activité AMPK (MEF-dKO AMPK) m'a permis de mener des études comparatives portant sur la prolifération, le cycle cellulaire et la mort cellulaire par apoptose. Ces études ont été réalisées à plusieurs concentrations et temps de traitement à l'AICAR (Fig. 1, article 2). Nous avons observé que l'apoptose, l'autophagie et l'arrêt en phase S sont activés par l'AICAR sur les deux modèles cellulaires, excluant de ce fait un rôle prépondérant de l'AMPK.

Une étude métabolomique a également été réalisée afin d'analyser l'entrée de l'AICAR dans la cellule ainsi que l'apparition de plusieurs de ses dérivés métaboliques. Nos résultats indiquent que l'AICAR est rapidement assimilé par les deux modèles cellulaires MEF-wt et MEF-dKO, et converti sous sa forme 5' mono-phosphate (ZMP) (Fig. 21), forme phosphorylée décrite dans la littérature comme à l'origine de l'effet cytotoxique.

Notre étude métabolomique montre que l'ajout d'AICAR conduit également à l'accumulation de plusieurs autres intermédiaires du métabolisme des nucléotides (sZMP, S-AMP, ZTP) (Fig. 21 ; Fig 2, article 2). Ces conversions métaboliques sont là encore identiques pour les MEF-wt et les MEF-dKO, excluant une nouvelle fois le rôle potentiel de l'AMPK.

L'un des métabolites augmentant sous l'effet d'une incubation des cellules avec de l'AICAR est le sZMP. Cette molécule s'accumule effectivement de manière significative dans les deux modèles cellulaires MEFs. Le sZMP a une capacité de liaison directe à l'enzyme de la glycolyse PKM2 (pyruvate kinase de type M) et est capable ainsi de stimuler son activité, en favorisant ainsi la survie de cellules dans des conditions caractéristiques de l'ischémie tumorale^{3,4}.

Compte tenu de ce simple exemple du sZMP, il est donc possible que tous les effets observés lors d'une incubation de cellules avec l'AICAR ne soient pas strictement attribuables au ZMP. Des études complémentaires seront nécessaires pour préciser ce point, en utilisant par exemple des inhibiteurs spécifiques pour les différentes enzymes impliquées dans ces conversions, ou des ARNi.

Notre étude métabolomique montre également une augmentation importante des produits finaux de la voie de biosynthèse des purines (ATP, GTP) ainsi qu'en parallèle, une forte chute des produits finaux de la voie de biosynthèse des pyrimidines (UTP, CTP). Ce déséquilibre entre les ratios des bases purines/pyrimidines est là encore très similaire pour les MEF-wt et les MEF-dKO.

Un élément intéressant que nous pouvons considérer ici est le fait que certaines études (notamment celle de Thomas *et al.* 1981) justifient l'effet cytotoxique de l'AICAR par ce déséquilibre

entre les bases puriques et pyrimidiques (cf. Introduction – Partie 1 – § B 1 a) ²³. De fait, la chute des concentrations en bases pyrimidines est comparée avec l'effet cytotoxique, et le fait d'ajouter le précurseur uridine permet de restaurer en partie le taux intracellulaire des pyrimidines et également de diminuer la cytotoxicité liée à l'AICAR. Dans notre travail (article 2), nous validons effectivement le fait que l'uridine exogène réduit effectivement l'effet cytotoxique de l'AICAR mais cet effet n'est pas total (Fig. Sup. 3 B). Il nous apparaît donc clair que l'effet cytotoxique attribuable au déséquilibre de bases azotées n'est pas le seul pouvant justifier de l'activité de l'AICAR.

Le but de ma thèse est de mettre en évidence des voies de signalisation intracellulaires pouvant être modulées sous l'effet de l'AICAR, et ce indépendamment de l'AMPK. L'approche transcriptomique m'a permis d'évaluer de manière globale et non biaisée les effets du traitement à l'AICAR sur la variation des transcrits totaux cellulaires. Cette étude a été effectuée sur des cellules n'exprimant pas l'AMPK, les MEF-dKO AMPK, afin de dégager les modulations transcriptionnelles indépendantes de l'AMPK.

2. L'AICAR et la voie HIPPO

L'analyse des variations des transcrits m'a permis de dégager une réponse en deux temps. Dans une cinétique courte, l'AICAR entraîne l'augmentation des transcrits codant pour les protéines sérines/thréonines kinases LATS1 et LATS2. Ces deux protéines font parties du centre fonctionnel de la voie de signalisation HIPPO (Fig. 11). L'activation de cette voie conduit à une régulation négative de YAP et TAZ, cofacteurs de transcription impliqués dans diverses fonctions cellulaires ou tissulaires dont certaines sont impliquées dans la progression tumorale (migration, invasion, angiogenèse). Dans une cinétique à plus long terme (24h), nous observons que près de 200 cibles transcriptionnelles de YAP et TAZ sont modulées sous l'effet de l'AICAR. Deux de ces cibles *Cyr61* et *Ctgf* sont considérées comme des marqueurs caractéristiques de l'activation des protéines YAP et TAZ et voient leurs expressions diminuées en réponse à l'AICAR.

Ces résultats ont été validés par les expériences de Western blot et de RT-qPCR et m'ont conduit à suggérer l'hypothèse selon laquelle le traitement à l'AICAR entraîne l'activation de la voie HIPPO (Fig. 3 E, article 2) par la succession d'étapes suivantes : **1)** augmentation des transcrits de LATS1 et LATS2, **2)** augmentation du taux des protéines LATS1 et LATS2, **3)** phosphorylation de LATS1 et LATS2 sur l'acide aminé (thr1079 pour LATS1) considéré comme témoin de leur activation catalytique, **4)** phosphorylation inhibitrice des deux substrats de LATS1 et LATS2 : YAP et TAZ, et **5)** inhibition de la transcription dépendante de YAP et TAZ.

Fait intéressant, cette succession d'événements est également observée pour les cellules MEF-wt exprimant l'AMPK, ce qui indique que les effets observés peuvent avoir lieu en absence complète de cette enzyme, mais aussi en sa présence, c'est à dire dans un contexte plus standard, l'AMPK étant présente dans toutes les cellules y compris dans les cellules tumorales. L'AMPK est une cible de choix en thérapie antitumorale ^{33,34}. La validation de l'effet de l'AICAR dans un contexte où l'AMPK est présente est donc un résultat important dans un objectif thérapeutique.

Des travaux de différents auteurs indiquent que la phosphorylation par LATS1 et LATS2 des cofacteurs de transcription YAP et TAZ conduit à une séquestration de ces derniers dans le cytoplasme, les empêchant ainsi de rejoindre leurs gènes cibles pour en augmenter la transcription. L'AICAR entraînant l'augmentation et l'activation de LATS1/2, j'ai donc réalisé des études de localisation de YAP et TAZ d'une part dans des cellules MEFs traitées ou non à l'AICAR (Fig. Sup. 4, article 2), et d'autre part sur une lignée épithéliale humaine non transformée et capable d'inhibition par contact (c'est à dire à confluence).

Les résultats obtenus sur les deux modèles cellulaires sont différents. Dans le cas des cellules MEFs, la localisation de YAP et TAZ reste essentiellement nucléaire pour des raisons que nous tentons d'expliquer ci-dessous. Par contre, j'ai pu observer pour la lignée RPE-1 que la localisation nucléaire de YAP et TAZ diminue très significativement (>25 %) en réponse à l'AICAR. Cet effet est observable après 4h d'incubation, ce qui est cohérent avec un effet attendu de l'activation de LATS1/2, elle aussi observée à 4h. Le modèle de l'activation de la voie HIPPO par l'AICAR et conduisant à une répression de YAP et TAZ est donc validé sur les cellules RPE1. La raison que nous invoquons pour justifier l'absence de délocalisation de YAP/TAZ dans les cellules MEFs tient au fait que ces cellules ont été immortalisées par l'antigène T. Il est décrit en effet dans la littérature que la signalisation de la voie HIPPO pouvait être pervertie sous l'effet d'antigènes viraux, y compris ceux codés par SV40, et que la perte de l'inhibition de contact en résultats pouvait conduire à des dérégulations dans les localisations de facteurs de transcription. Dans le but d'évaluer cette hypothèse, nous proposons de réaliser des expériences de stimulation par l'AICAR de cellules MEFs non immortalisées afin d'évaluer le potentiel de délocalisation de YAP/TAZ dans un contexte non transformé.

Nous avons pu confirmer le rôle de LATS1/2 dans la délocalisation de YAP sur les cellules RPE-1 en réalisant des approches par knockdown (siRNA). En présence d'AICAR, nous observons comme attendu une délocalisation de YAP vers le cytoplasme, mais cet effet est bloqué en présence d'ARN interférants ciblant LATS1 et LATS2. Ainsi, nous validons fonctionnellement le rôle de LATS1/2 dans la réponse cellulaire à l'AICAR.

Dans une dernière approche, nous avons cherché à savoir si l'effet cytotoxique de l'AICAR pouvait dépendre de l'activité observée sur LATS1 et LATS2. Pour cela, nous avons de nouveau utilisé une approche knockdown par siRNA LATS1/2 et réalisé des tests de viabilité cellulaire. Nous observons que les knockdowns réalisés sur LATS1/2 lors d'une stimulation à l'AICAR réduisent de manière très significative la cytotoxicité de l'AICAR pour RPE-1 mais aussi pour le modèle MEFs. Nous concluons donc que les protéines LATS1 et LATS2 sont en partie responsables de l'effet cytotoxique de l'AICAR.

Ainsi, par une approche globale de transcriptomique, nous avons pu mettre en évidence une fonction majeure de régulation cellulaire activée par l'AICAR, la voie de signalisation HIPPO. Cette voie de signalisation est activée en réponse à l'AICAR, conduisant à l'inhibition des cofacteurs de transcription YAP et TAZ, et ultimement à l'inhibition de l'expression de nombreux gènes impliqués dans la progression tumorale. LATS1 et LATS2 sont donc des protéines impliquées dans l'effet cytotoxique de l'AICAR. Cependant, les événements moléculaires liant LATS1/2 à la mort cellulaire sont inconnus.

Il est important de souligner que des résultats récents montrent que l'AMPK, indépendamment de LATS1/2, est capable également de réduire l'activité de YAP par phosphorylation ¹³⁴. Un modèle permettant de représenter l'effet bivalent de l'AICAR est donc proposé : l'AICAR est d'une part capable d'activer la voie de transduction HIPPO par l'activation de LATS1 et LATS2 (nos résultats), et peut d'autre part se fixer sur l'AMPK et l'activer, conduisant également à l'inhibition de YAP par phosphorylation. Les deux effets de l'AICAR convergent donc vers un blocage de la transcription de YAP/TAZ en utilisant les kinases LATS1/2 d'une part, et l'AMPK d'autre part.

Ces résultats présentent un intérêt en cancérologie. LATS1 et LATS2 sont effectivement considérés comme des anti-oncogènes capables de bloquer l'activité des protéines YAP/TAZ, représentant elles-mêmes des protéines oncogéniques. De fait, la voie de signalisation HIPPO est capable de moduler un large éventail de fonctions cellulaires impliquées dans le développement des tumeurs, telles que la prolifération cellulaire, la migration cellulaire, la survie cellulaire. Depuis la découverte récente de la voie HIPPO, de nombreuses études visent à identifier des molécules permettant l'inhibition directe de cette voie ¹³⁵. Une telle thérapie permettrait de toucher simultanément les multiples fonctions liées à la voie HIPPO citées ci-dessus, toutes reconnues comme étant les caractéristiques principales des cellules tumorales ¹²⁰. Ainsi, dans le cas de tumeur très agressives tel que le glioblastome, l'inhibition de cette voie apparaît comme une perspective de traitement antitumoral extrêmement intéressante. Cependant, le caractère « multiples effets » de cette approche pourrait potentiellement aussi entraîner des effets non désirés. Par exemple, la voie HIPPO étant fondamentale pour le développement embryonnaire et la croissance des organes, une telle thérapie pourrait avoir des effets délétères chez la femme enceinte et l'enfant. Il serait donc intéressant de poursuivre nos recherches en étudiant les répercussions induites par l'AICAR sur les fonctions cellulaires se situant plus en aval de la voie HIPPO afin de délimiter plus précisément le rôle de cette séquence de transduction dans la cytotoxicité induite par l'AICAR. Pour ce faire, l'utilisation de la technique CRISPR-cas9 permettant de générer des cellules Knock out pour les gènes d'intérêts (LATS1/2, l'AMPK, YAP et TAZ) pourrait représenter une nouvelle approche intéressante. Ces études permettront de mieux cadrer les effets et d'utiliser ce traitement dans des conditions adéquates.

REFERENCES

1. Ren, A., Rajashankar, K. R. & Patel, D. J. Global RNA Fold and Molecular Recognition for a pfl Riboswitch Bound to ZMP, a Master Regulator of One-Carbon Metabolism. *Structure* **23**, 1375–81 (2015).
2. Pinson, B. *et al.* Metabolic intermediates selectively stimulate transcription factor interaction and modulate phosphate and purine pathways. *Genes Dev.* **23**, 1399–407 (2009).
3. Keller, K. E., Doctor, Z. M., Dwyer, Z. W. & Lee, Y.-S. S. SAICAR induces protein kinase activity of PKM2 that is necessary for sustained proliferative signaling of cancer cells. *Mol. Cell* **53**, 700–9 (2014).
4. Keller, K. E., Tan, I. S. & Lee, Y.-S. S. SAICAR stimulates pyruvate kinase isoform M2 and promotes cancer cell survival in glucose-limited conditions. *Science* **338**, 1069–72 (2012).
5. Hosios, A. M., Fiske, B. P., Gui, D. Y. & Vander Heiden, M. G. Lack of Evidence for PKM2 Protein Kinase Activity. *Mol. Cell* **59**, 850–7 (2015).
6. Vincent, M. F., Bontemps, F. & Van den Berghe, G. Inhibition of glycolysis by 5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside in isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.* **281** (Pt 1), 267–72 (1992).
7. Shang, J. & Lehrman, M. A. Activation of glycogen phosphorylase with 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside (AICAR). Assessment of glycogen as a precursor of mannosyl residues in glycoconjugates. *J. Biol. Chem.* **279**, 12076–80 (2004).
8. Javaux, F., Vincent, M. F., Wagner, D. R. & van den Berghe, G. Cell-type specificity of inhibition of glycolysis by 5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside. Lack of effect in rabbit cardiomyocytes and human erythrocytes, and inhibition in FTO-2B rat hepatoma cells. *Biochem. J.* **305** (Pt 3), 913–9 (1995).
9. Ceschin, J. *et al.* Identification of yeast and human 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -d-ribofuranoside (AICAR) transporters. *J. Biol. Chem.* **289**, 16844–54 (2014).
10. Peyton, K. J., Liu, X. M., Yu, Y., Yates, B. & Durante, W. Activation of AMP-activated protein kinase inhibits the proliferation of human endothelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **342**, 827–34 (2012).
11. Sengupta, T. K. *et al.* Cytotoxic effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside (AICAR) on childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells: implication for targeted therapy. *Mol. Cancer* **6**, 46 (2007).
12. Jones, R. G. *et al.* AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol. Cell* **18**, 283–93 (2005).
13. Theodoropoulou, S. *et al.* Retinoblastoma cells are inhibited by aminoimidazole carboxamide ribonucleotide (AICAR) partially through activation of AMP-dependent kinase. *Faseb J* **24**, 2620–2630 (2010).
14. Rattan, R., Giri, S., Singh, A. K. & Singh, I. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside inhibits cancer cell proliferation in vitro and in vivo via AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **280**, 39582–93 (2005).
15. Baumann, P., Mandl-Weber, S., Emmerich, B., Straka, C. & Schmidmaier, R. Activation of adenosine monophosphate activated protein kinase inhibits growth of multiple myeloma cells. *Exp. Cell Res.* **313**, 3592–603 (2007).

16. Nafz, J. *et al.* Interference with energy metabolism by 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside induces HPV suppression in cervical carcinoma cells and apoptosis in the absence of LKB1. *Biochem. J.* **403**, 501–10 (2007).
17. Bardeleben, C. *et al.* Metabolomics identifies pyrimidine starvation as the mechanism of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-ribose-induced apoptosis in multiple myeloma cells. *Mol. Cancer Ther.* **12**, 1310–21 (2013).
18. González-Gironès, D. M. *et al.* AICAR induces Bax/Bak-dependent apoptosis through upregulation of the BH3-only proteins Bim and Noxa in mouse embryonic fibroblasts. *Apoptosis* **18**, 1008–16 (2013).
19. Santidrián, A. F. *et al.* AICAR induces apoptosis independently of AMPK and p53 through up-regulation of the BH3-only proteins BIM and NOXA in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* **116**, 3023–32 (2010).
20. Campàs, C. *et al.* Acadesine activates AMPK and induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells but not in T lymphocytes. *Blood* **101**, 3674–80 (2003).
21. Robert, G. *et al.* Acadesine kills chronic myelogenous leukemia (CML) cells through PKC-dependent induction of autophagic cell death. *PLoS ONE* **4**, e7889 (2009).
22. Ceschin, J. *et al.* Disruption of Nucleotide Homeostasis by the Antiproliferative Drug 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-d-ribofuranoside Monophosphate (AICAR). *J Biol Chem* **290**, 23947–23959 (2015).
23. Thomas, C. B., Meade, J. C. & Holmes, E. W. Aminoimidazole carboxamide ribonucleoside toxicity: a model for study of pyrimidine starvation. *J. Cell. Physiol.* **107**, 335–44 (1981).
24. Holland, A. J. & Cleveland, D. W. Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 478–87 (2009).
25. Tang, Y.-C. C., Williams, B. R., Siegel, J. J. & Amon, A. Identification of aneuploidy-selective antiproliferation compounds. *Cell* **144**, 499–512 (2011).
26. Stingele, S. *et al.* Global analysis of genome, transcriptome and proteome reveals the response to aneuploidy in human cells. *Mol. Syst. Biol.* **8**, 608 (2012).
27. Ly, P. *et al.* Aneuploid human colonic epithelial cells are sensitive to AICAR-induced growth inhibition through EGFR degradation. *Oncogene* **32**, 3139–46 (2013).
28. Montraveta, A. *et al.* Synergistic anti-tumor activity of acadesine (AICAR) in combination with the anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in in vivo and in vitro models of mantle cell lymphoma. *Oncotarget* **5**, 726–39 (2014).
29. Guo, D. *et al.* The AMPK agonist AICAR inhibits the growth of EGFRvIII-expressing glioblastomas by inhibiting lipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 12932–7 (2009).
30. Van Den Neste, E. *et al.* Acadesine for patients with relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): a multicenter phase I/II study. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **71**, 581–91 (2013).
31. Sullivan, J. E. *et al.* Inhibition of lipolysis and lipogenesis in isolated rat adipocytes with AICAR, a cell-permeable activator of AMP-activated protein kinase. *FEBS Lett.* **353**, 33–6 (1994).
32. Xiao, B. *et al.* Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature* **472**, 230–3 (2011).
33. Hardie, D. G., Ross, F. A. & Hawley, S. A. AMP-activated protein kinase: a target for drugs both ancient and modern. *Chem. Biol.* **19**, 1222–36 (2012).
34. Hardie, D. G., Ross, F. A. & Hawley, S. A. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 251–62 (2012).

35. Minokoshi, Y. *et al.* AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* **428**, 569–74 (2004).
36. la, B. *et al.* Cannabinoids and ghrelin have both central and peripheral metabolic and cardiac effects via AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **280**, 25196–201 (2005).
37. Kim, S.-J. J. *et al.* AMPA, not NMDA, activates RhoA GTPases and subsequently phosphorylates moesin. *Exp. Mol. Med.* **36**, 98–102 (2004).
38. Röckl, K. S. *et al.* Skeletal muscle adaptation to exercise training: AMP-activated protein kinase mediates muscle fiber type shift. *Diabetes* **56**, 2062–9 (2007).
39. Narkar, V. A. *et al.* AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics. *Cell* **134**, 405–15 (2008).
40. O’Neill, H. M. AMPK and Exercise: Glucose Uptake and Insulin Sensitivity. *Diabetes Metab J* **37**, 1–21 (2013).
41. Miyamoto, L. *et al.* AICAR stimulation metabolome widely mimics electrical contraction in isolated rat epitrochlearis muscle. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **305**, C1214–22 (2013).
42. Liu, X. *et al.* Discrete mechanisms of mTOR and cell cycle regulation by AMPK agonists independent of AMPK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, E435–44 (2014).
43. Meli, M. *et al.* Small-molecule targeting of heat shock protein 90 chaperone function: rational identification of a new anticancer lead. *J. Med. Chem.* **49**, 7721–30 (2006).
44. Wu, S., Huang, J., Dong, J. & Pan, D. hippo Encodes a Ste-20 Family Protein Kinase that Restricts Cell Proliferation and Promotes Apoptosis in Conjunction with salvador and warts. *Cell* **114**, 445–456 (2003).
45. PRASKOVA, M., KHOKLATCHEV, A., ORTIZ-VEGA, S. & AVRUCH, J. Regulation of the MST1 kinase by autophosphorylation, by the growth inhibitory proteins, RASSF1 and NORE1, and by Ras. *Biochem J* **381**, 453–462 (2004).
46. Chan, E. *et al.* The Ste20-like kinase Mst2 activates the human large tumor suppressor kinase Lats1. *Oncogene* **24**, 2076–86 (2005).
47. Callus, B., Verhagen, A. & Vaux, D. Association of mammalian sterile twenty kinases, Mst1 and Mst2, with hSalvador via C-terminal coiled-coil domains, leads to its stabilization and phosphorylation. *Febs J* **273**, 4264–76 (2006).
48. Dong, J. *et al.* Elucidation of a universal size-control mechanism in Drosophila and mammals. *Cell* **130**, 1120–33 (2007).
49. Zhao, B. *et al.* Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev.* **21**, 2747–61 (2007).
50. Zhao, B. *et al.* TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes Dev.* **22**, 1962–71 (2008).
51. Mo, J.-S. S., Park, H. W. & Guan, K.-L. L. The Hippo signaling pathway in stem cell biology and cancer. *EMBO Rep.* **15**, 642–56 (2014).
52. Varelas, X. The Hippo pathway effectors TAZ and YAP in development, homeostasis and disease. *Development* **141**, 1614–26 (2014).
53. DeRan, M. *et al.* Energy stress regulates hippo-YAP signaling involving AMPK-mediated regulation of angiomin-1 protein. *Cell Rep* **9**, 495–503 (2014).
54. Unknown. Aerobic glycolysis tunes YAP/TAZ transcriptional activity. *The EMBO journal* **34**, 1349–70
55. Tao, W. *et al.* Human homologue of the Drosophila melanogaster lats tumour suppressor modulates CDC2 activity. *Nat. Genet.* **21**, 177–81 (1999).

56. Xia, H. *et al.* LATS1 tumor suppressor regulates G2/M transition and apoptosis. *Oncogene* **21**, 1233–41 (2002).
57. Yang, X., Li, D. M., Chen, W. & Xu, T. Human homologue of Drosophila lats, LATS1, negatively regulate growth by inducing G(2)/M arrest or apoptosis. *Oncogene* **20**, 6516–23 (2001).
58. Martin-Belmonte, F. & Perez-Moreno, M. Epithelial cell polarity, stem cells and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 23–38 (2012).
59. Varelas, X. *et al.* The Crumbs complex couples cell density sensing to Hippo-dependent control of the TGF- β -SMAD pathway. *Dev. Cell* **19**, 831–44 (2010).
60. Das Thakur, M. *et al.* Ajuba LIM proteins are negative regulators of the Hippo signaling pathway. *Curr. Biol.* **20**, 657–62 (2010).
61. Hirate, Y. *et al.* Polarity-dependent distribution of angiominin localizes Hippo signaling in preimplantation embryos. *Curr. Biol.* **23**, 1181–94 (2013).
62. Schlegelmilch, K. *et al.* Yap1 acts downstream of α -catenin to control epidermal proliferation. *Cell* **144**, 782–95 (2011).
63. Zhao, B. *et al.* Angiominin is a novel Hippo pathway component that inhibits YAP oncoprotein. *Genes Dev.* **25**, 51–63 (2011).
64. Mana-Capelli, S., Paramasivam, M., Dutta, S. & McCollum, D. Angiominins link F-actin architecture to Hippo pathway signaling. *Mol. Biol. Cell* **25**, 1676–85 (2014).
65. Dai, X. *et al.* Phosphorylation of angiominin by Lats1/2 kinases inhibits F-actin binding, cell migration, and angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **288**, 34041–51 (2013).
66. Adler, J. J. *et al.* Serum deprivation inhibits the transcriptional co-activator YAP and cell growth via phosphorylation of the 130-kDa isoform of Angiominin by the LATS1/2 protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 17368–73 (2013).
67. Cordenonsi, M. *et al.* The Hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells. *Cell* **147**, 759–72 (2011).
68. Yu, J. *et al.* Kibra functions as a tumor suppressor protein that regulates Hippo signaling in conjunction with Merlin and Expanded. *Dev. Cell* **18**, 288–99 (2010).
69. Chiarugi, P. & Giannoni, E. Anoikis: a necessary death program for anchorage-dependent cells. *Biochem. Pharmacol.* **76**, 1352–64 (2008).
70. Zhao, B. *et al.* Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induce anoikis. *Genes Dev.* **26**, 54–68 (2012).
71. Wong, K. K. *et al.* β -Spectrin regulates the hippo signaling pathway and modulates the basal actin network. *J. Biol. Chem.* **290**, 6397–407 (2015).
72. Kim, M. *et al.* cAMP/PKA signalling reinforces the LATS-YAP pathway to fully suppress YAP in response to actin cytoskeletal changes. *EMBO J.* **32**, 1543–55 (2013).
73. Miller, E. *et al.* Identification of serum-derived sphingosine-1-phosphate as a small molecule regulator of YAP. *Chem. Biol.* **19**, 955–62 (2012).
74. Wennmann, D. O. *et al.* The Hippo pathway is controlled by Angiotensin II signaling and its reactivation induces apoptosis in podocytes. *Cell Death Dis* **5**, e1519 (2014).
75. Yu, F.-X. X. *et al.* Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling. *Cell* **150**, 780–91 (2012).
76. Mo, J.-S. S., Yu, F.-X. X., Gong, R., Brown, J. H. & Guan, K.-L. L. Regulation of the Hippo-YAP pathway by protease-activated receptors (PARs). *Genes Dev.* **26**, 2138–43 (2012).
77. Reddy, B. V. V. & Irvine, K. D. Regulation of Hippo signaling by EGFR-MAPK signaling through Ajuba family proteins. *Dev. Cell* **24**, 459–71 (2013).

78. Azzolin, L. *et al.* YAP/TAZ incorporation in the β -catenin destruction complex orchestrates the Wnt response. *Cell* **158**, 157–70 (2014).
79. Vogel, V. & Sheetz, M. Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 265–75 (2006).
80. Provenzano, P. P. & Keely, P. J. Mechanical signaling through the cytoskeleton regulates cell proliferation by coordinated focal adhesion and Rho GTPase signaling. *J. Cell. Sci.* **124**, 1195–205 (2011).
81. Huang, S. & Ingber, D. E. Cell tension, matrix mechanics, and cancer development. *Cancer Cell* **8**, 175–6 (2005).
82. Dupont, S. *et al.* Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* **474**, 179–83 (2011).
83. Wada, K.-I., Itoga, K., Okano, T., Yonemura, S. & Sasaki, H. Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. *Development* **138**, 3907–14 (2011).
84. Jaffe, A. B. & Hall, A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**, 247–69 (2005).
85. Sah, V. P., Seasholtz, T. M., Sagi, S. A. & Brown, J. H. The role of Rho in G protein-coupled receptor signal transduction. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**, 459–89 (2000).
86. Nguyen, B., Carbajal, M. E. & Vitale, M. L. Intracellular mechanisms involved in dopamine-induced actin cytoskeleton organization and maintenance of a round phenotype in cultured rat lactotrope cells. *Endocrinology* **140**, 3467–77 (1999).
87. Gjorevski, N., Boghaert, E. & Nelson, C. M. Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition by Transmission of Mechanical Stress through Epithelial Tissues. *Cancer Microenviron* **5**, 29–38 (2012).
88. Zhang, H. *et al.* TEAD transcription factors mediate the function of TAZ in cell growth and epithelial-mesenchymal transition. *J. Biol. Chem.* **284**, 13355–62 (2009).
89. Hansen, C. G., Moroishi, T. & Guan, K.-L. L. YAP and TAZ: a nexus for Hippo signaling and beyond. *Trends Cell Biol.* **25**, 499–513 (2015).
90. Meng, Z., Moroishi, T. & Guan, K.-L. L. Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes Dev.* **30**, 1–17 (2016).
91. Moroishi, T. *et al.* A YAP/TAZ-induced feedback mechanism regulates Hippo pathway homeostasis. *Genes Dev.* **29**, 1271–84 (2015).
92. Yu, F.-X. X., Zhao, B. & Guan, K.-L. L. Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer. *Cell* **163**, 811–28 (2015).
93. Nishioka, N. *et al.* The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass. *Dev. Cell* **16**, 398–410 (2009).
94. Morin-Kensicki, E. M. *et al.* Defects in yolk sac vasculogenesis, chorioallantoic fusion, and embryonic axis elongation in mice with targeted disruption of Yap65. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 77–87 (2006).
95. Makita, R. *et al.* Multiple renal cysts, urinary concentration defects, and pulmonary emphysematous changes in mice lacking TAZ. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **294**, F542–53 (2008).
96. Camargo, F. D. *et al.* YAP1 increases organ size and expands undifferentiated progenitor cells. *Curr. Biol.* **17**, 2054–60 (2007).
97. Song, H. *et al.* Mammalian Mst1 and Mst2 kinases play essential roles in organ size control and tumor suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 1431–6 (2010).

98. Barry, E. R. *et al.* Restriction of intestinal stem cell expansion and the regenerative response by YAP. *Nature* **493**, 106–10 (2013).
99. Cai, J. *et al.* The Hippo signaling pathway restricts the oncogenic potential of an intestinal regeneration program. *Genes Dev.* **24**, 2383–8 (2010).
100. Lee, K.-P. P. *et al.* The Hippo-Salvador pathway restrains hepatic oval cell proliferation, liver size, and liver tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 8248–53 (2010).
101. Reginensi, A. *et al.* Yap- and Cdc42-dependent nephrogenesis and morphogenesis during mouse kidney development. *PLoS Genet.* **9**, e1003380 (2013).
102. Von Gise, A. *et al.* YAP1, the nuclear target of Hippo signaling, stimulates heart growth through cardiomyocyte proliferation but not hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 2394–9 (2012).
103. Liu-Chittenden, Y. *et al.* Genetic and pharmacological disruption of the TEAD-YAP complex suppresses the oncogenic activity of YAP. *Genes Dev.* **26**, 1300–5 (2012).
104. Chan, S. W. *et al.* A role for TAZ in migration, invasion, and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cancer Res.* **68**, 2592–8 (2008).
105. Gao, Y. *et al.* YAP inhibits squamous transdifferentiation of Lkb1-deficient lung adenocarcinoma through ZEB2-dependent DNp63 repression. *Nat Commun* **5**, 4629 (2014).
106. Liu, Y. *et al.* Taz-tead1 links cell-cell contact to zeb1 expression, proliferation, and dedifferentiation in retinal pigment epithelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science* **51**, 3372–3378 (2010).
107. Fernandez-L, A. *et al.* Oncogenic YAP promotes radioresistance and genomic instability in medulloblastoma through IGF2-mediated Akt activation. *Oncogene* **31**, 1923–37 (2012).
108. Stein, C. *et al.* YAP1 Exerts Its Transcriptional Control via TEAD-Mediated Activation of Enhancers. *PLoS Genet.* **11**, e1005465 (2015).
109. Xiao, G.-H. H., Chernoff, J. & Testa, J. R. NF2: the wizardry of merlin. *Genes Chromosomes Cancer* **38**, 389–99 (2003).
110. Touil, Y. *et al.* Colon cancer cells escape 5FU chemotherapy-induced cell death by entering stemness and quiescence associated with the c-Yes/YAP axis. *Clin. Cancer Res.* **20**, 837–46 (2014).
111. Zhou, J., Xu, F., Yu, J. J. & Zhang, W. YAP is up-regulated in the bronchial airway smooth muscle of the chronic asthma mouse model. *Int J Clin Exp Pathol* **8**, 11132–9 (2015).
112. Unknown. Yu 13 HIPPO Rw.pdf.
113. Xu, T., Wang, W., Zhang, S., Stewart, R. & Yu, W. Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the *Drosophila* *lats* gene encodes a putative protein kinase. *Dev Camb Engl* **121**, 1053–63 (1995).
114. Justice, R. W., Zilian, O., Woods, D. F., Noll, M. & Bryant, P. J. The *Drosophila* tumor suppressor gene *warts* encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. *Genes Dev.* **9**, 534–46 (1995).
115. Nishiyama, Y. *et al.* A human homolog of *Drosophila* *warts* tumor suppressor, *h-warts*, localized to mitotic apparatus and specifically phosphorylated during mitosis. *FEBS Lett.* **459**, 159–65 (1999).
116. Hori, T., Takaori-Kondo, A., Kamikubo, Y. & Uchiyama, T. Molecular cloning of a novel human protein kinase, *kpm*, that is homologous to *warts/lats*, a *Drosophila* tumor suppressor. *Oncogene* **19**, 3101–9 (2000).

117. Yabuta, N. *et al.* Structure, expression, and chromosome mapping of LATS2, a mammalian homologue of the Drosophila tumor suppressor gene lats/warts. *Genomics* **63**, 263–70 (2000).
118. Visser, S. & Yang, X. LATS tumor suppressor: a new governor of cellular homeostasis. *Cell Cycle* **9**, 3892–903 (2010).
119. Kamikubo, Y., Takaori-Kondo, A., Uchiyama, T. & Hori, T. Inhibition of cell growth by conditional expression of kpm, a human homologue of Drosophila warts/lats tumor suppressor. *J. Biol. Chem.* **278**, 17609–14 (2003).
120. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–74 (2011).
121. Iida, S.-I. *et al.* Tumor suppressor WARTS ensures genomic integrity by regulating both mitotic progression and G1 tetraploidy checkpoint function. *Oncogene* **23**, 5266–74 (2004).
122. Yabuta, N., Mukai, S., Okada, N., Aylon, Y. & Nojima, H. The tumor suppressor Lats2 is pivotal in Aurora A and Aurora B signaling during mitosis. *Cell Cycle* **10**, 2724–36 (2011).
123. Yang, X. *et al.* LATS1 tumour suppressor affects cytokinesis by inhibiting LIMK1. *Nat. Cell Biol.* **6**, 609–17 (2004).
124. Yabuta, N. *et al.* Lats2 is an essential mitotic regulator required for the coordination of cell division. *J. Biol. Chem.* **282**, 19259–71 (2007).
125. Yabuta, N. *et al.* Large tumor suppressors 1 and 2 regulate Aurora-B through phosphorylation of INCENP to ensure completion of cytokinesis. *Heliyon* **2**, e00131 (2016).
126. Gomez-Angelats, M. *et al.* Hormonal regulation of concentrative nucleoside transport in liver parenchymal cells. *Biochem. J.* **313 (Pt 3)**, 915–20 (1996).
127. Del Santo, B. *et al.* Differential expression and regulation of nucleoside transport systems in rat liver parenchymal and hepatoma cells. *Hepatology* **28**, 1504–11 (1998).
128. Damaraju, V. L. *et al.* Role of human nucleoside transporters in the cellular uptake of two inhibitors of IMP dehydrogenase, tiazofurin and benzamide riboside. *Mol. Pharmacol.* **67**, 273–9 (2005).
129. Kim, J.-H. H. *et al.* SLC29A1 (ENT1) polymorphisms and outcome of complete remission in acute myeloid leukemia. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **78**, 533–40 (2016).
130. Boß, M. *et al.* AMPK-independent inhibition of human macrophage ER stress response by AICAR. *Sci Rep* **6**, 32111 (2016).
131. Laderoute, K. R. *et al.* 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) is induced by low-oxygen and glucose deprivation conditions found in solid-tumor microenvironments. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 5336–47 (2006).
132. Siam, R. *et al.* Transcriptional activation of the Lats1 tumor suppressor gene in tumors of CUX1 transgenic mice. *Mol. Cancer* **8**, 60 (2009).
133. Kedinger, V. *et al.* p110 CUX1 homeodomain protein stimulates cell migration and invasion in part through a regulatory cascade culminating in the repression of E-cadherin and occludin. *J. Biol. Chem.* **284**, 27701–11 (2009).
134. Santinon, G., Pocaterra, A. & Dupont, S. Control of YAP/TAZ Activity by Metabolic and Nutrient-Sensing Pathways. *Trends Cell Biol.* **26**, 289–99 (2016).
135. Yu, F.-X. X., Meng, Z., Plouffe, S. W. & Guan, K.-L. L. Hippo pathway regulation of gastrointestinal tissues. *Annu. Rev. Physiol.* **77**, 201–27 (2015).

Titre : Modulation de la voie HIPPO par un métabolite aux propriétés antitumorales : l'AICAR

Résumé :

L'AICAR (5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide) est un intermédiaire de la voie de biosynthèse des purines. A des concentrations importantes, ce métabolite a un effet cytotoxique sur les cellules cancéreuses aneuploïdes, c'est-à-dire contenant un nombre anormal de chromosome. Or, 90% des tumeurs solides sont aneuploïdes. Les mécanismes responsables de cette cytotoxicité doivent donc être mieux étudiés pour une utilisation éventuelle en thérapie anti-cancéreuse.

Dans la littérature, l'effet de l'AICAR est expliqué par son rôle mimétique de l'AMP sur l'AMPK. Cependant, certaines données de la littérature et du laboratoire laissent penser que l'inhibition de la croissance par l'AICAR peut impliquer plusieurs types de mécanismes dont certains sont dépendants de l'AMPK et d'autres indépendants. L'identification des cibles de l'AICAR alternatives à l'AMPK est donc nécessaire pour une meilleure compréhension de ses effets.

Dans ce projet, j'ai pu confirmer la présence d'autres cibles de l'AICAR indépendantes de l'AMPK et responsables de son effet cytotoxique. Grâce à une approche transcriptomique, j'ai montré un effet de l'AICAR sur l'expression et l'activation de LATS1 et LATS2 (large tumor suppressor 1 and 2). Ces protéines kinases font partie du core enzymatique de la voie HIPPO, dont le rôle en cancérologie est fondamental. Les effecteurs finaux de cette voie sont YAP et TAZ, deux cofacteurs de transcription, aussi régulés par l'AICAR. J'ai pu montrer que la cytotoxicité de l'AICAR est due en partie à l'activation de cette voie. Depuis la découverte récente de la voie HIPPO, de nombreuses études visent à identifier des molécules permettant l'inhibition directe de cette voie. L'AICAR s'avère être une molécule puissante dans le cadre d'une thérapie anticancéreuse ciblant la voie HIPPO.

Mots clés : AICAR, voie HIPPO, effets cytotoxiques, AMPK

Title : Modulation of the HIPPO pathway by a metabolite with anti-tumor properties: AICAR

Abstract :

AICAR (5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide) is an intermediate of the purine biosynthesis pathway. At high concentrations, this metabolite has a cytotoxic effect on aneuploid cancer cells that is cells containing an abnormal chromosome number. However, 90% of solid tumors are aneuploid. The mechanisms responsible for this cytotoxicity should be better studied for possible use in anti-cancer therapy.

In the literature, the effect of AICAR is explained by its AMP mimetic role on the AMPK. However, some literature and laboratory data suggest that AICAR growth inhibition may involve several types of mechanisms, some of which are dependent and other independent of AMPK. Therefore, the identification of AMPK alternative targets is necessary for a better understanding the AICAR effects.

In this project, I was able to confirm the presence of other AICAR targets independent of AMPK and responsible for its cytotoxic effect. Using a transcriptomic approach, I showed an effect of AICAR on the expression and activation of LATS1 and LATS2 (large tumor suppressor 1 and 2). These protein kinases form part of the enzymatic nucleus of the HIPPO pathway, whose role in oncology is fundamental. The effectors of this pathway are YAP and TAZ, two transcription cofactors, also regulated by the AICAR. I have been able to show that the cytotoxicity of AICAR is due to the activation of this pathway. Since the recent discovery of the HIPPO pathway, numerous studies aim to identify molecules allowing direct inhibition of this pathway. AICAR has proven to be a potent molecule in anti-cancer therapy which goal is targeting the HIPPO pathway.

Keywords : AICAR, HIPPO pathway, cytotoxic effect, AMPK