HAL
open science

# Autophagie, une cible thérapeutique potentielle dans les leucémies aiguës myéloïdes exprimant FLT3-ITD

Quentin Heydt

## To cite this version:

Quentin Heydt. Autophagie, une cible thérapeutique potentielle dans les leucémies aiguës myéloïdes exprimant FLT3-ITD. Cancer. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2017. Français. NNT : 2017TOU30366 . tel-02275026

**HAL Id: tel-02275026**

**https://theses.hal.science/tel-02275026**

Submitted on 30 Aug 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 Toulouse

# THÈSE

**En vue de l'obtention du**

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

**Délivré par :**

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

---

**Présentée et soutenue par :**
**Quentin HEYDT**

**Le** jeudi 21 septembre 2017

**Titre :**

Autophagie, une cible thérapeutique potentielle dans les leucémies aiguës myéloïdes exprimant FLT3-ITD

---

**École doctorale et discipline ou spécialité :**

ED BSB : Biotechnologies, Cancérologie

**Unité de recherche :**

INSERM UMR1037-CRCT

**Directeur(s) de Thèse :**

Dr. Véronique DE MAS

**Rapporteurs :**

Dr. Paulo DE SEPULVEDA ; Dr. Patrick AUBERGER
Dr. Jean-Max PASQUET

**Autre(s) membre(s) du jury :**

Pr. Christian RECHER, Président du jury
Dr. Carine JOFFRE, Examinateur

*A ma famille,*

# Remerciements

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements :

A Véronique De Mas, ma directrice de thèse, pour ces quatre années passées à travailler ensemble. Je te remercie pour la confiance et la grande autonomie que tu m'as accordée mais également pour ton assistance et ton suivi tout au long de ce travail. Ton expérience et tes conseils m'ont été d'une grande utilité.

A l'ensemble de mon jury de thèse d'avoir accepté de venir juger mon travail. Merci à messieurs Paulo de Sepulveda, Patrick Auberger et Jean-Max Pasquet de m'avoir fait l'honneur d'accepter de rapporter cette thèse. Merci pour le temps qu'ils ont consacré à sa lecture et merci pour leurs remarques et leurs conseils enrichissants. Enfin, je remercie vivement Christian Recher pour son soutien tout au long de ma thèse et d'avoir accepté de présider mon jury de thèse.

A Stéphane Manenti, pour m'avoir permis d'intégrer ton équipe, accordé ta confiance et pour toujours être motivé et enthousiaste quand il s'agit de sciences.

A Carine, un immense merci pour toute l'aide que tu m'as apportée tout au long de ma thèse. Plus qu'une cheffe, tu as été pour moi aussi une amie, une grande sœur ; je te remercie pour tous tes conseils prônés durant ces quatre années, j'ai eu énormément de plaisir à travailler avec toi. Je ne te remercierai jamais assez pour toutes ces discussions conceptuelles que nous avons pu échanger, notamment sur l'autophagie. Je te souhaite bon courage dans l'équipe, et plein de bonnes choses pour la suite.

A Clément, très bon ami du labo, pour toutes ces discussions scientifiques et non scientifiques, pour tous ces bons moments à l'animalerie, la culture toulousaine que tu m'as fait découvrir et les matchs de rugby que l'on a pu voir ensemble.

A Nico, ancien stagiaire mais surtout très bon ami, pour toute ces pauses café, ces discussions sur les jeux vidéo et ta recette du carry vinday !

A tous les titulaires du labo, les deux Christine, Laurent et Sylvie, pour toutes ces discussions scientifiques et pour votre aide précieuse.

A tous les petits jeunes du labo, copains de cinéma et de soirées jeux de société : Isa, ma meilleure stagiaire, avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler et j'espère que ça a été réciproque ; Camille, ma petite-fille du labo que j'ai toujours voulue ; Gabi et Maelle, pour toutes vos discussions couture et vos recherches de robes, je sais enfin ce que c'est un bleu roi ! Renaud, le grand bricolo de l'équipe qui m'a soutenu et qui sait ce que ça fait de se faire dominer par sa compagne ; Justine, Mathilde et Ada, les fofolles du labo ; Alex, on ne s'est vu qu'à la fin de ma thèse mais je te dis bon courage pour tenir debout tout ce laboratoire.

A tous mes amis, ici et là, qui m'ont encouragé quand le moral baissait. Romain et Amélie, pour toutes ces soirées et repas, vous allez me manquer si on part de Toulouse. A mon club de rugby qui m'a permis de me défouler quand j'en avais besoin. Mais surtout mes copains d'Alsace, Stéphane, Loïc, Raph et Adi que je connais depuis toujours et qui savent tout de moi.

A ma belle-famille, j'ai retrouvé en vous une deuxième famille. Je sais que je peux compter sur vous au meilleur comme au pire et j'espère par ce travail vous exprimer ma gratitude et ma fierté d'être votre dans votre famille.

A Bells, que dire pour te remercier ! Tout d'abord, ce travail n'aurait pas vu le jour sans ton soutien et tes conseils. Merci de m'avoir soutenu, encouragé et supporté pendant ces 3 dernières années de thèse. Ton affection, ta générosité et ton désir de me rendre encore plus heureux témoignent de ton amour pour moi ! Rassure-toi, je suis comblé de bonheur depuis que je t'ai connue. Je n'oublierai pas tous ces moments difficiles, moments d'hésitation et de faiblesse où tu étais mon seul refuge et ma source de réconfort inépuisable.

A ma sœur, nous avons toujours été très proches et nous le serons pour toute la vie. Merci pour ta présence tout au long de cette thèse et pour ton soutien inconditionnel.

A ma mamie Liliane, mon papi André et Yvonne, je vous remercie pour votre soutien tout au long de mes études, d'avoir cru en moi et de m'avoir chouchouté depuis ma naissance !

A ma mère et mon père, je ne saurai jamais vous exprimer mon amour et ma gratitude. Vos soins, vos sacrifices et votre soutien permanent m'ont permis d'avancer et d'en arriver là. Merci d'avoir été les meilleurs parents du monde. Que ce travail puisse couronner toutes ces années de labeur et de persévérance au cours desquelles vous étiez présents jour après jour, prêts à m'épauler et me pousser vers l'avant. J'espère avoir exaucé vos rêves en devenant docteur et avoir été à la hauteur de vos attentes.

# Table des matières

Liste des figures ..... 8

Liste des tableaux ..... 10

Liste des abréviations ..... 11

I. L'hématopoïèse normale et leucémique ..... 15

A. L'hématopoïèse normale ..... 15

1. Généralités ..... 15

2. La niche hématopoïétique ..... 15

3. Déroulement de l'hématopoïèse ..... 16

4. La différenciation myéloïde ..... 18

B. Les leucémies aiguës myéloïdes ..... 20

1. Étymologie ..... 20

2. Généralités sur l'hématopoïèse leucémique ..... 20

3. Aspects cliniques des leucémies aiguës myéloïdes ..... 21

4. Classification des leucémies aiguës myéloïdes ..... 22

5. Traitements et pronostic ..... 26

II. Le récepteur à activité tyrosine kinase FLT3 ..... 29

A. Les récepteurs à activité tyrosine kinase ..... 29

1. Classification et structure des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs) ..... 29

2. Les récepteurs à activité tyrosine kinase de classe III ..... 30

B. Le récepteur FLT3 ..... 35

1. Structure du Récepteur FLT3 ..... 35

2. Expression du récepteur FLT3 ..... 36

3. FLT3 ligand ..... 37

4. Synergie du FLT3L avec d'autres cytokines ..... 37

5. Activation et signalisation de FLT3 ..... 38

C. Le récepteur FLT3 dans les leucémies ..... 40

1. Expression du récepteur FLT3 dans les leucémies ..... 40

2. Les mutations de FLT3 ..... 40
3. Signalisation oncogénique de FLT3 muté ..... 41
4. La mutation FLT3-ITD, une mutation « conductrice » des LAM ..... 42
5. Impact clinique des mutations de FLT3 ..... 42
6. Thérapeutique ciblée dans les LAM FLT3-ITD ..... 43
7. Mécanismes de résistance aux traitements ..... 44
8. FLT3-ITD, un récepteur délocalisé ..... 45
III. La réponse intégrée aux stress ..... 47
A. Le stress du réticulum endoplasmique ..... 47
1. Le réticulum endoplasmique ..... 47
2. Le stress du réticulum endoplasmique ..... 47
B. La réponse intégrée au stress ..... 50
1. Les kinases de eIF2α ..... 50
2. Le facteur de la traduction eIF2 ..... 51
C. Le modulateur de l'ISR, la protéine ATF4 ..... 54
1. Structure de la protéine ATF4 ..... 54
2. Régulation d'ATF4 ..... 54
3. Fonctions d'ATF4 ..... 57
IV. L'autophagie ..... 58
A. Généralités sur l'autophagie ..... 58
1. La micro-autophagie ..... 59
2. L'autophagie dépendante des chaperonnes ..... 59
3. La macro-autophagie ..... 59
B. Machinerie moléculaire de l'autophagie ..... 61
1. Les protéines ATG ..... 61
2. Les étapes du processus autophagique ..... 63
D. Régulation de l'autophagie ..... 68
1. Régulation par les acides aminés ..... 68
2. Régulation par les facteurs de croissance ..... 68

3. Régulation par le niveau d'énergie ..... 70
4. Régulation en réponse à un stress du réticulum endoplasmique ..... 71
5. Régulation en réponse à l'hypoxie ..... 72
F. Rôles physiologiques de l'autophagie ..... 74
1. Développement : embryogénèse et morphogénèse ..... 74
2. L'autophagie dans le système hématopoïétique ..... 76
G. Autophagie et hémopathies malignes ..... 77
1. Généralités sur l'autophagie et les cancers ..... 77
2. Un acteur suppresseur de tumeur ..... 77
3. Un acteur pro-tumoral ..... 78
4. L'autophagie dans les leucémies myéloïdes ..... 79
H. Les outils pour monitorer l'autophagie ..... 83
1. Les modulateurs de l'autophagie ..... 83
2. Les techniques d'imagerie ..... 84
3. L'étude du flux autophagique ..... 86
V. Contexte scientifique et présentation des études ..... 88
VI. Activité anti-leucémique de l'inhibition de l'autophagie dans le contexte FLT3-ITD ..... 89
1. Le récepteur FLT3-ITD supporte l'autophagie basale des cellules de LAM ..... 89
2. L'autophagie est essentielle à la prolifération des cellules FLT3-ITD ..... 93
3. L'inhibition de l'autophagie réduit la charge tumorale chez la souris ..... 97
4. Les cellules résistantes aux inhibiteurs de FLT3 sont sensibles à l'inhibition de l'autophagie . 99
5. Résumé et discussion ..... 101
VII. Voies de signalisation impliquées dans l'autophagie dans le modèle FLT3-ITD ..... 104
1. Les voies de signalisation majoritaires en aval de FLT3-ITD ne sont pas impliquées dans l'induction de l'autophagie ..... 104
2. Le facteur de transcription ATF4, un acteur essentiel dans la régulation l'autophagie en aval de FLT3-ITD ..... 105
3. L'inhibition d'ATF4 réduit la charge tumorale chez la souris ..... 108
4. La voie FLT3-PKC-eIF6 est responsable de l'induction d'ATF4 et de l'autophagie ..... 109
5. Résumé et discussion ..... 114

VIII. Publication de thèse ..... 117

IX. Discussion générale ..... 147

1. L'autophagie, une cible thérapeutique dans les LAM ? ..... 147

2. La voie de signalisation PKC-eIF6-ATF4, une cible thérapeutique potentielle ? ..... 147

Références bibliographiques ..... 151

Annexes ..... 169

# Liste des figures

**Figure 1 :** Modèle général de l'hématopoïèse. ..... 16

**Figure 2 :** Influence des cytokines dans l'hématopoïèse. ..... 18

**Figure 3 :** Modèle hiérarchique de l'hématopoïèse leucémique. ..... 21

**Figure 4 :** Association et fréquence des mutations dans les LAM. ..... 23

**Figure 5 :** Classification et structure des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs). ..... 30

**Figure 6 :** Diversité structurelle des cytokines et des complexe RTK-III-cytokine. ..... 32

**Figure 7 :** Formation du dimère de RTK et rôle du domaine transmembranaire. ..... 33

**Figure 8 :** Mécanisme général d'activation des RTK-III. ..... 34

**Figure 9 :** Structure du récepteur à activité tyrosine kinase de classe III FLT3. ..... 35

**Figure 10 :** Expression de FLT3 au cours de l'hématopoïèse normale. ..... 36

**Figure 11 :** Signalisation normale de FLT3. ..... 39

**Figure 12 :** FLT3-ITD est un récepteur délocalisé au niveau du réticulum endoplasmique. ..... 45

**Figure 13 :** Représentation des trois voies de la réponse UPR. ..... 48

**Figure 14 :** Représentation du rôle du complexe eIF2 dans l'initiation de la traduction. ..... 53

**Figure 15 :** Régulation traductionnelle d'ATF4. ..... 55

**Figure 16 :** Régulation de l'association de la sous-unité du ribosome par eIF6. ..... 56

**Figure 17 :** Représentation des trois types d'autophagies connues. ..... 58

**Figure 18 :** Mécanisme général de la macro-autophagie. ..... 60

**Figure 19 :** Représentation de la régulation du complexe ULK. ..... 64

**Figure 20 :** Représentation des deux systèmes ubiquitine-like qui régulent la formation de l'autophagosome. ..... 65

**Figure 21 :** Représentation de la régulation de l'autophagie par les facteurs de croissance. ..... 69

**Figure 22 :** Représentation de la régulation de l'autophagie par les variations d'énergie. ..... 71

**Figure 23 :** Représentation des voies d'induction de l'autophagie par l'hypoxie. ..... 72

**Figure 24 :** Différents modulateurs de l'autophagie. ..... 83

**Figure 25 :** Analyse par microscopie électronique de fibroblastes embryonnaires de souris sans nourriture. ..... 85

**Figure 26 :** Visualisation des vésicules d'autophagie avec la sonde GFP-RFP-LC3 par microscopie à fluorescence. ..... 85

**Figure 27 :** Etude du flux autophagique par western blot. ..... 86

**Figure 28 :** L'inhibition pharmacologique de FLT3-ITD diminue l'autophagie basale des cellules. ..... 90

**Figure 29 :** L'invalidation génétique de FLT3-ITD diminue l'autophagie basale des cellules. ..... 91

**Figure 30 :** L'expression de FLT3-ITD augmente l'autophagie basale des cellules. ..... 92

**Figure 31 :** L'inhibition pharmacologique de FLT3-ITD diminue l'autophagie basale des cellules primaires. ..... 93

**Figure 32 :** L'inhibition pharmacologique de l'autophagie diminue la prolifération des cellules exprimant le récepteur FLT3-ITD. ..... 94

**Figure 33 :** L'invalidation génétique de gène de l'autophagie diminue la prolifération des cellules exprimant le récepteur FLT3-ITD. ..... 95

**Figure 34 :** Les cellules exprimant le récepteur FLT3-ITD de manière ectopique deviennent dépendantes de l'autophagie pour proliférer. ..... 96

**Figure 35 :** Inhiber l'autophagie réduit l'envahissement des cellules leucémiques humaines et augmente la survie des souris. ..... 98

**Figure 36 :** L'inhibition de l'autophagie réduit la capacité des cellules résistantes aux inhibiteurs de FLT3 à se développer in vitro et in vivo. ..... 100

**Figure 37 :** Les voies de signalisation majeures en aval de FLT3 ne sont pas responsables de l'induction de l'autophagie. ..... 104

**Figure 38 :** La protéine ATF4 est responsable de l'induction de l'autophagie en aval de FLT3-ITD. ... 106

**Figure 39 :** Le récepteur FLT3-ITD et ATF4 modulent l'expression de certains gènes de l'autophagie impliqués dans les étapes d'initiation et d'élongation. ..... 108

**Figure 40 :** L'invalidation génétique d'ATF4 diminue la prolifération exprimant le récepteur FLT3-ITD. ..... 108

**Figure 41 :** Inhiber ATF4 réduit l'envahissement des cellules leucémiques humaines et augmente la survie des souris. ..... 109

**Figure 42 :** La protéine ATF4 est régulée par le récepteur FLT3-ITD au niveau de sa synthèse. ..... 110

**Figure 43 :** Le facteur eIF6 est essentiel à la régulation d'ATF4 et à la survie des cellules exprimant le récepteur FLT3-ITD. ..... 112

**Figure 44 :** La voie des PKC est impliquée dans la régulaion d'ATF4 et de l'autophagie. ..... 113

# Liste des tableaux

**Tableau 1 : Classification FAB des leucémies aiguës myéloïdes (Bennett, 1976).** ..... 24

**Tableau 2 : Classification OMS des leucémies aiguës myéloïdes (site web de l'OMS).**..... 25

**Tableau 3 : Classifications cytogénétiques avec ou sans les anomalies moléculaires des leucémies aiguës myéloïdes.**..... 27

**Tableau 4 : Protéines clés impliquées dans la formation des autophagosomes chez la levure et les mammifères.**..... 62

**Tableau 5 : Phénotypes de l'invalidation de gènes de l'autophagie dans des modèles murins.**..... 74

**Tableau 6 : Phénotypes de l'invalidation de gènes tissu-spécifique dans des modèles murins.**..... 75

**Tableau 7 : Traitements induisant l'autophagie dans les leucémies myéloïdes chroniques.** ..... 80

**Tableau 8 : Traitements induisant l'autophagie dans les leucémies aiguës myéloïdes.** ..... 81

# Liste des abréviations

3-MA : 3-méthyladénine

4EBP1 : eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1

AARE : amino acid response element

AC220 : quirzatinib

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AMPK : AMP-activated protein kinase

ARA-C : cytarabine

ARN : Acide Ribonucléique

ARNt : deacylated transfer RNAs

ASNS : asparagine synthase

ATF/CREB : (activating transcription factor/cyclic AMP (adénosine mono phosphate) response element binding protein

ATF3 : activating transcription factor 3

ATF4 : activating transcription factor 4

ATF6 : activating transcription factor 6

ATG : AuTophaGy-related Gene

ATM : ataxia telangiectasia mutated

ATP : adénosine triphosphate

BAD : Bcl-2-Associated Death promoter protein

Bcl2 : B-Cell lymphoma 2

BCR-ABL : Breakpoint Cluster Region-Abelson

BFU-E : Burst Forming Unit-Erythroid

Bip : Binding immunoglobulin protein

BNIP3 : BCL2 interacting protein 3

bZip : basic region-leucine zipper

C/EBPα : CCAAT-enhancer protéine α

CARE : C/EBP-ATF response element

CDC25A : cell division cycle protein 25A

CDS : coding séquence

CFU-E : Colony Forming Unit-Eryhtrocyte

CFU-G : Colony Forming Unit-Granulocyte

CFU-GEMM : Colony Forming Unit-Granulocyte Erythrocyte Macrophage and Megakaryocyte

CFU-GM : Colony Forming Unit-Granulocyte and Macrophage

CFU-M : Colony Forming Unit-Monocytes

CFU-Meg : Colony Forming Unit-Megakaryocyte

CHOP : C/EBP homology protein

CMA : chaperone-mediated autophagy

CN : Caryotype normal

CPL : progéniteur commun lymphoïde

CPM : progéniteur commun myéloïde

CSF1 : Colony-Stimulating Factor 1

CSFR1 : colony-stimulating factor 1 receptor

CSH : cellule souche hématopoïétique

CSL : cellule souche leucémique

CSM : cellule souche multipotente

DDIT4 : DNA-damage-inducible transcript 4 protein

DFCP1 : Double-FYVE-containing protéine 1

DNMT3A : DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A

eIF2α : eukaryotic initiation factor 2α

EP300 : Histone acetyltransferase p300

EPO : érythropoïétine

ERAD : ER-associated degradation

ERK1/2 : extracellular signal-regulated kinase ½

FAB : French-America-British

FGF2 : fibroblast growth factor 2

FIP200 : FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa

FLK2 : Fetal Liver Kinase 2

FLT3 : Fms-Like Tyrosine Kinase 3

FLT3-ITD : Fms-Like Tyrosine Kinase 3 with Internal Tandem Duplications

FLT3L : Fms-Like Tyrosine Kinase 3

FLT3-TKD : Fms-Like Tyrosine Kinase 3 with Tyrosine Kinase Domain mutation

FOXO3 : Forkhead box 3

G6PD : glucose 6-phosphate déhydrogenase

GAP : GTPase activating protein

GCN2 : general control nonderepressible 2

G-CSF : granulocyte -Colony Stimulating Factor

GDP : guanosine diphosphate

GFP : green fluorescent protein

GM-CSF : granulocyte/macrophage -Colony Stimulating Factor

GRB2 : growth factor receptor-bound protein 2

GRP78 : 78 kDa glucose-regulated protein

GTP : guanosine triphosphate

HIF : Hypoxia Inducible Factors

HRI : heme-regulated eIF2a kinase

Hsc70 : Heat Shock Cognate protein of 70 kDa

IDH1/2 : Isocitrate Deshydrogenase 1/2

IL3 : Interleukin 3

IL-34 : Interleukine-34

IP : iodure de propidium

IRE1 : inositol-requiring enzyme 1

IRES : internal ribosome entry sites

ISR : integrated stress response

JAK : Janus Kinase

JNK : C-Jun N-terminal kinase

KO : Knockout

LAL : leucémies aiguës lymphoïdes

LAM : leucémies aiguës myéloïdes

LB : lymphocyte B

LKB1 : Liver kinase B1

LMC : Leucémie Myéloïdes Chroniques

LT : lymphocyte T

MAP1LC3 : Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3

MAPK : Mitogen-Activated Protein kinase

M-CSF : macrophage -Colony Stimulating Factor

MEC : matrice extracellulaire

MegaCB : mégacaryoblaste

MegaCC : Mégacaryocyte

MEH : fibroblastes embryonnaires de souris

MEK1/2 : Mitogen-activated protein kinase ERK kinase ½

Met-ARNti : ARNt initiateur-méthionine

MTOC : centre organisateur de microtubules

mTOR : mammalian target of rapamycin

NK : cellule natural killer

NPM1 : Nucleophosmin 1

NRF2 : nuclear factor-like 2

NSG : NOD scid gamma

OMS : organisation mondiale de la santé

PAS : structure pré-autophagosomale

PCR : polymerase chain reaction

PDGFR : platelet-derived growth factor receptor

PDH3 : prolyl hydroxylase domain protein 3

PDK1 : phosphoinositide-dependent protein kinase 1

PDX1 : pancreatic and duodenal homeobox 1

PE : phosphatidyléthanolamine

PERK : protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase

PGC1α : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α

PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase

PI3P : phosphatidylinositol 3-phosphate

PKA : protéine kinase A

PKB : protein kinase B

PKC : protein kinase C

PKR : double-stranded RNA-dependent protein kinase

PLC : phospholipase C

PML-RARα : Promyelocytic Leukemia Gene Retinoic Acid Receptor-Alpha

PNB : polynucléaire basophile

PNE : polynucléaire éosinophiles

PNN : polynucléaire neutrophile

PU.1 : Purine box factor 1

RACK1 : Receptor of activated protein C kinase 1

RE : réticulum endoplasmique

REDD1 : protein regulated in development and DNA damage response 1

REL : réticulum endoplasmique lisse

RER : réticulum endoplasmique rugueux

RFP : Red Fluorescent Protein

RSK1 : Ribosomal S6 Kinase 1

RTK : récepteurs à activité tyrosine kinase

RUNX1 : Runt-related transcription factor 1

Sca-1 : stem cell antigen-1

SCF : stem cell factor

$SCF^{\beta TRCP}$ : SCF (F-box containing complex) E3 ubiquitin ligase complexe

SH2 : Src Homology 2

SNARE : soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment protein receptor

SNAT2 : System A neutral amino acid transporter 2

STAT5 : Signal Transducer and Activator of Transcription 5

STK1 : stem cell tyrosine kinase 1

TACE : TNFα converting enzyme

TET2 : tet methylcytosine dioxygenase 2

TFE3 : Transcription factor E3

TFEB : Transcription factor EB

TORC1 : TOR kinase complex 1

TPO : thrombopoïétine

TRAF2 : tumour necrosis factor (TNF) associated factor 2

TRB3 : tribbles 3

TSC1/2 : Tuberous Sclerosis Complex 1 et 2

ULK1 : UNC51 Like Ser/Thr Kinases 1

uORF : short open reading frame

UPR : unfolded protein response

UTR : Untranslated Transcribed Region

VPS34 : Vacuolar Protein Sorting 34

WIPI1 : WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 1

XBP1 : X-Box Binding Protein 1

# I. L'hématopoïèse normale et leucémique

## A. L'hématopoïèse normale

### 1. Généralités

Le terme hématopoïèse décrit la formation de l'ensemble des constituants du système sanguin à partir d'une petite population de cellules appelées cellules souches hématopoïétiques (CSH). C'est un processus fondamental capable de s'adapter en permanence à diverses conditions physiologiques, voire pathologiques. Avant les années 1960, même si il était connu que les cellules sanguines possédaient une espérance de vie courte leur source de renouvellement est restée inconnue jusqu'aux travaux de Till et McCullock en 1961 (Till, 1961). Leur expérience a consisté à irradier des souris, entrainant ainsi une aplasie médullaire irréversible. L'injection d'une suspension de moelle osseuse de souris de même lignée a permis aux souris de survivre. Avec l'observation de colonies au niveau de la rate, ils ont mis en évidence une population de cellules initiatrices dont les cellules filles sont capables de produire différentes lignées hématopoïétiques. Cette découverte fut la première évidence que les cellules souches hématopoïétiques possèdent des capacités d'auto-renouvellement et de différenciation.

L'hématopoïèse peut être séparée en quatre compartiments : les cellules souches, les progéniteurs, les précurseurs et les cellules matures. Afin d'assurer une hématopoïèse fonctionnelle tout au long de la vie, les CSH ont la capacité de s'auto-renouveler ou de se différencier, d'entrer en quiescence ou de proliférer. L'équilibre entre ces différents états fonctionnels peut être contrôlé par des mécanismes intrinsèques (facteur de transcription, voie de signalisation) et extrinsèques (microenvironnement).

### 2. La niche hématopoïétique

L'hématopoïèse adulte se déroule essentiellement dans la moelle osseuse dite « rouge » des vertèbres, des côtes, du sternum et du bassin, ainsi que dans les épiphyses du fémur et de l'humérus. Les mécanismes impliqués dans la régulation des différents états fonctionnels des CSH mettent en jeu une relation étroite entre les CSH et d'autres cellules ou composants de la matrice extracellulaire. Cette relation forme un microenvironnement particulier appelé niche hématopoïétique qui se situe au niveau de la moelle osseuse rouge. Cette dernière est un tissu dont la vascularisation est extrêmement riche. Les vaisseaux sanguins permettent le transfert de cellules et de macromolécules de la moelle osseuse vers le sang périphérique. La niche hématopoïétique est constituée des cellules hématopoïétiques (CSH, progéniteurs, précurseurs) et de cellules stromales. Les composants cellulaires de la niche produisent des cytokines ainsi qu'une matrice extracellulaire (MEC) classiquement constituée de molécules comme le collagène et la fibronectine.

## 3. Déroulement de l'hématopoïèse

### *a) Les cellules souches hématopoïétiques*

Les cellules souches hématopoïétiques sont à l'origine du système hématopoïétique (Figure 1). Durant la division, les cellules filles des CSH peuvent s'autorenouveller (reproduire à l'identique), s'engager dans une voie de différenciation ou aller en apoptose. Le compartiment souche contient deux types de cellules souches : les CSH à long terme (LIN-, SCA1+, KIT+, FLK2-, Thy1$^{low}$, CD34-) qui peuvent se renouveler indéfiniment et des CSH à court terme (LIN$^{-/low}$, SCA1+, KIT+, FLK2-, Thy1$^{low}$, CD34+) avec une activité de repeuplement limitée (~ 8 semaines) (Geiger, 2013). Selon le modèle de Weissman, les cellules souches à long terme constituent une faible proportion des cellules présentes dans la moelle osseuse (0,001% comparée à 0,02% pour les cellules souches à court terme). Elles ont comme fonction principale l'auto-renouvellement et gardent un potentiel de différenciation dans toutes les lignées de l'hématopoïèse (Weissman, 2000).

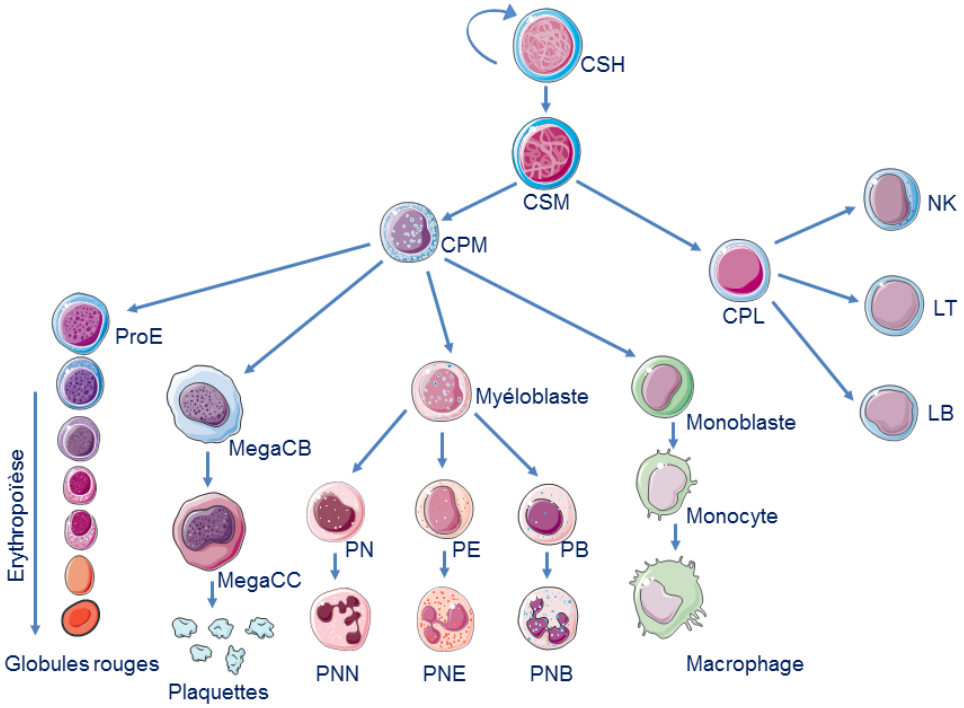



**Figure 1 : Modèle général de l'hématopoïèse.**

L'ensemble des cellules du sang dérivent d'une CSH commune, aux propriétés d'auto-renouvellement et de différenciation. Abbréviation : CSH (cellule souche hématopoïétique), CSM (cellule souche multipotente), CPM (progéniteur commun myéloïde), CPL (progéniteur commun lymphoïde), MegaCB (mégacaryoblaste), MegaCC (Mégacaryocyte), PNN (polynucléaire neutrophile), PNE (polynucléaire éosinophiles), PNB (polynucléaire basophile), NK (cellule natural killer), LT (lymphocyte T), LB (lymphocyte B).

Les CSH qui entrent dans la voie de différenciation donnent d'abord naissance à des cellules progénitrices multipotentes qui perdent leur capacité d'auto-renouvellement mais qui conservent un potentiel multi-lignée. Les CSH et les cellules progénitrices multipotentes font partie d'une petite population de la moelle osseuse qui ne possède pas les marqueurs de surface des cellules matures. Cependant, ces cellules expriment le récepteur de la cytokine SCF (stem cell factor) cKIT et la protéine de surface Sca-1 (stem cell antigen-1) (Weissman, 2001).

### *b) La maturation des progéniteurs hématopoïétiques*

Suite à la naissance de la cellule progénitrice multipotente, une ramification myéloïde / lymphoïde se produit avec l'émergence d'un progéniteur commun lymphoïde ou d'un progéniteur commun myéloïde. Ces progéniteurs possèdent un potentiel de prolifération élevé et un potentiel de différenciation plus restreint. Le progéniteur commun lymphoïde permet la fabrication de lymphocyte B, lymphocyte T et de cellule NK. Le progéniteur commun myéloïde, appelé CFU-GEMM (Colony Forming Unit-Granulocyte Erythrocyte Macrophage and Megakaryocyte), permet de donner naissance aux différents précurseurs myéloïdes qui sont les suivants :

- Les CFU-GM (Granulocyte and Macrophage), qui sont des précurseurs granulo-monocytaires qui engendrent les CFU-G (Granulocyte) et les CFU-M (Monocytes).
- Les BFU-E (Burst Forming Unit-Erythroid), progéniteurs érythroïdes se différenciant en CFU-E (Eryhtrocyte).
- Les CFU-Meg (Megakaryocyte), progéniteurs de la lignée mégacaryocytaire.

### *c) Les précurseurs hématopoïétiques*

Issus des progéniteurs hématopoïétiques, les précurseurs hématopoïétiques sont des cellules qui possèdent une morphologie, un phénotype et des propriétés fonctionnelles propres à chaque lignée. A ce stade de différenciation, les cellules ont perdu leur capacité d'auto-renouvellement et ont un taux de prolifération réduit. Les cellules matures vont sortir de la moelle osseuse pour rejoindre la circulation périphérique où elles assurent leur fonction.

La suite du mémoire portera principalement sur la myélopoïèse.

## 4. La différenciation myéloïde

La myélopoïèse décrit la différenciation hématopoïétique des cellules myéloïdes qui englobe les granulocytes, les monocytes, les érythrocytes et les plaquettes (Figure 2). Le terme granulocyte inclut les polynucléaires neutrophiles qui phagocytent les pathogènes, les polynucléaires éosinophiles qui détruisent les parasites et les polynucléaires basophiles qui sécrètent de l'histamine. La différenciation myéloïde se produit dans la moelle osseuse.

### *a) Les cytokines dans la différenciation myéloïde*

Les facteurs de croissance et les cytokines, secrétés par les cellules hématopoïétiques ou par les cellules du microenvironnement (fibroblastes, adipocytes, ostéoblastes) se fixent sur des récepteurs à la surface des cellules hématopoïétiques et permettent ainsi l'activation de nombreuses voies de signalisation impliquées dans la différenciation. Une famille étendue de cytokines régule la myélopoïèse et influence les choix de lignée des cellules souches et progénitrices. Ainsi, on observe trois types de cytokines : les CSF (colony-stimulating factor), l'EPO (érythropoïétine) et la TPO (thrombopoïétine).

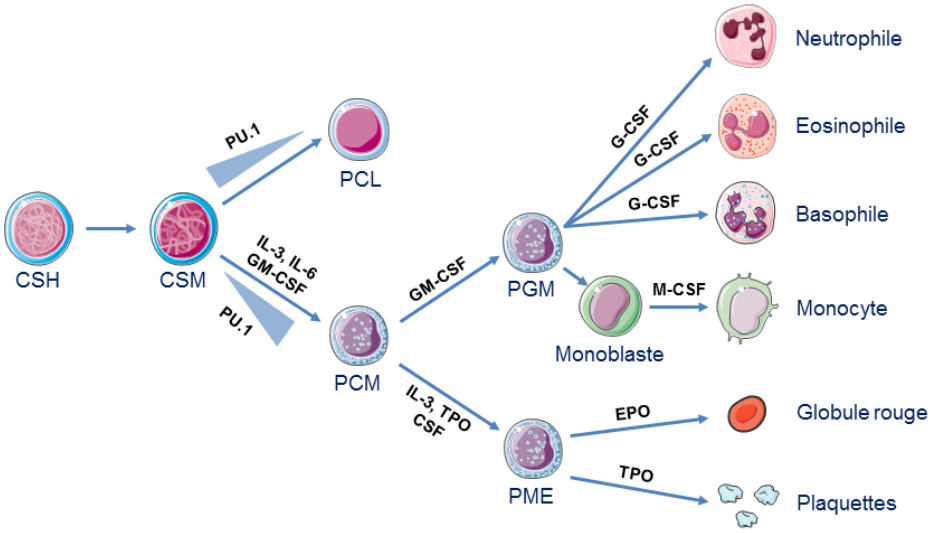



**Figure 2 : Influence des cytokines dans l'hématopoïèse.**

Selon les cytokines et les facteurs de transcription, les cellules vont s'engager soit dans la lignée myéloïde, soit dans la lignée lymphoïde, puis aboutir après des processus de différenciation et de prolifération aux cellules matures.

La famille des CSF comprend : le macrophage-CSF (M-CSF), le granulocyte-CSF (G-CSF), le granulocyte/macrophage-CSF (GM-CSF) et le multi-CSF (Interleukin 3 ou IL3). Le M-CSF est synthétisé et sécrété par les cellules endothéliales et stromales et se fixe sur le récepteur du M-CSF exprimé à la surface des macrophages. Ce facteur induit la prolifération, la différenciation et la survie des progéniteurs qui se différencient en monocyte puis macrophage. Le G-CSF est essentiel pour la survie et la différenciation des neutrophiles. Ce facteur est produit par les monocytes et les macrophages.

L'expression du récepteur au G-CSF est régulée par les facteurs de transcription C/EBPα (CCAAT-enhancer protéine α) et PU.1 (Purine box factor 1) (Smith, 1996). Le GM-CSF induit la prolifération et la survie des macrophages et des neutrophiles et peut être utilisé en association avec le G-CSF ou le M-CSF. De plus, le récepteur au GM-CSF est également régulé par les facteurs de transcription C/EBPα et PU.1 (Hohaus, 1995). L'IL3 est un facteur qui, avec le GM-CSF, stimule les progéniteurs hématopoïétiques et les différencie dans toutes les lignées myéloïdes. L'EPO est essentielle dans l'érthropoïèse et la TPO est la principale cytokine impliquée dans l'engagement mégacaryocytaire.

### *b) Les facteurs de transcription dans la différenciation myéloïde*

L'engagement des cellules souches et des cellules progénitrices dans la lignée myéloïde implique des facteurs de transcription. Parmi les facteurs de transcription les plus étudiés on retrouve PU.1, la famille GATA, la famille C/EBP et RUNX1 (Runt-related transcription factor 1). La protéine PU.1 est un facteur de transcription essentiel à l'hématopoïèse et est encodée par le gène *SPI1*. Le knockdown *SPI1*$^{-/-}$ est létal à un stade embryonnaire avec une absence complète de macrophages et de cellules B dans les souris (Scott, 1994) et l'invalidation de PU.1 dans les CSH induit une perte de la capacité de repopulation (Dakic, 2005). Le facteur de transcription PU.1 permet la fabrication des progéniteurs communs lymphoïdes et myéloïdes à partir des CSH. L'invalidation de PU.1 dans les CSH empêche la formation des progéniteurs communs lymphoïdes et myéloïdes (Iwasaki, 2005). PU.1 est exprimé fortement dans les cellules myéloïdes matures et est détectable dans les CSH, les progéniteurs multipotents, les progéniteurs communs lymphoïdes et myéloïdes et les lymphocytes B. En revanche, il n'est pas détectable dans les lymphocytes T et les érythrocytes. Le niveau de PU.1 dans les progéniteurs multipotents permet donc d'orienter la différenciation vers la lignée myéloïde ou lymphoïde (Dekoter, 2000).

La famille GATA comprend 6 facteurs de transcription dont trois d'entre eux, GATA1, GATA2 et GATA3 sont exprimés dans le système hématopoïétique. Ces facteurs se lient à une séquence consensus de l'ADN, (A/T)GATA(AG). Le facteur GATA1 est important dans la différenciation érythroïde. La délétion de GATA1 induit une mortalité chez la souris due à une sévère anémie (Fujiwara, 1996). Les cellules embryonaires ne possédant pas GATA1 sont incapables de fabriquer des érythrocytes alors que la fabrication des autres cellules sanguines n'est pas perturbée (Pevny, 1995). Le facteur de transcription GATA2 est exprimé au niveau des CSH où il permet de réguler la quiescence, l'apoptose et l'entrée dans la lignée myéloïde (Nankumar, 2012). Le facteur de transcription GATA3 est impliqué dans la différenciation des lymphocytes T.

La famille C/EBP comprend 6 facteurs de transcription essentiels pour la régulation de l'hématopoïèse. Le facteur de transcription C/EBP se lie à une séquence consensus de l'ADN, le motif CCAAT. Il est différentiellement exprimé dans les cellules souches et progénitrices. Il est faiblement exprimé dans les CSH mais son expression augmente à mesure que les cellules progressent vers la différenciation myéloïde. C/EBPα est exprimé fortement dans les granulocytes et les monocytes.

La protéine RUNX1 est un facteur de transcription essentiel à l'hématopoïèse et est encodée par le gène *RUNX1*. Ce facteur de transcription contrôle positivement la transcription des gènes codant les récepteurs au GM-CSF et au M-CSF, essentiels au bon déroulement de la différenciation myéloïde. Le knock-out de RUNX1 dans la souris adulte induit une expansion de la population des CSH et des progéniteurs myéloïdes ainsi que l'apparition d'une thrombocytopénie et d'une lymphopénie.

## B. Les leucémies aiguës myéloïdes

### 1. Étymologie

Le terme de leucémie vient du grec (lefk : blanc et aìma : sang) et renvoie à l'accumulation des globules blancs dans le sang.

### 2. Généralités sur l'hématopoïèse leucémique

L'hématopoïèse leucémique conserve des caractéristiques proches de l'hématopoïèse normale. Le clone leucémique est organisé selon un système hiérarchique réparti en trois compartiments bien distincts (Figure 3) :

- Les cellules souches leucémiques au phénotype immature, majoritairement quiescentes mais capables d'auto-renouvellement ou de s'engager dans un processus de différenciation.
- Les progéniteurs leucémiques ayant perdu les propriétés d'auto-renouvellement mais hautement proliférants.
- Les cellules leucémiques, ou blastes, bloquées à un stade de la différenciation.

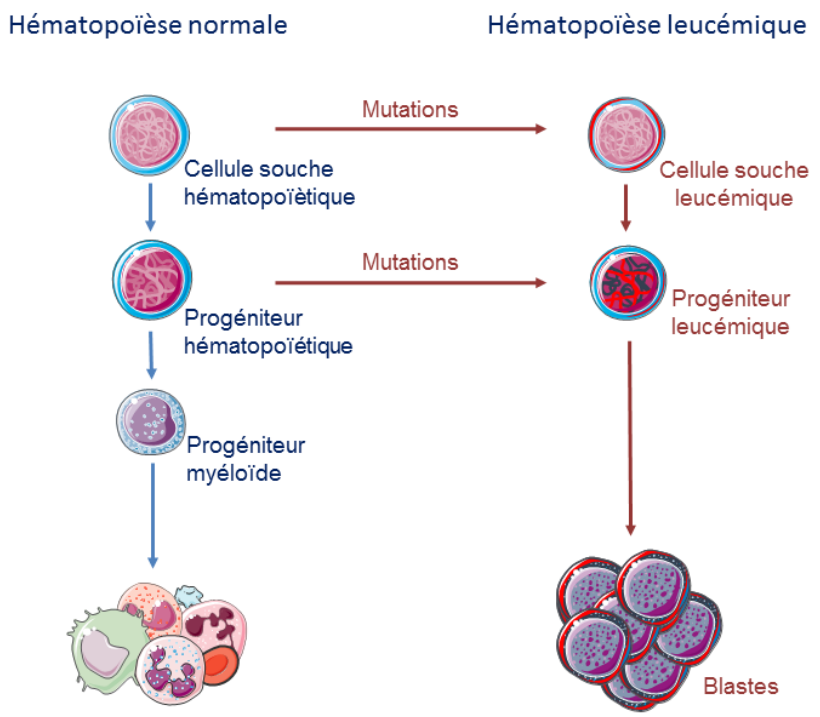



**Figure 3 : Modèle hiérarchique de l'hématopoïèse leucémique.**

La cellule souche leucémique (CSL) dérive de la cellule souche hématopoïétique normale ou du progéniteur hématopoïétique et donne lieu à une hématopoïèse leucémique selon le même modèle que l'hématopoïèse normale (Rosen, 2009).

Les leucémies sont associées à une inhibition de l'hématopoïèse normale, conduisant à un état d'insuffisance médullaire majeure responsable des complications sévères et létales de cette maladie. Les leucémies sont divisées en deux groupes : les leucémies chroniques et les leucémies aiguës. Les leucémies chroniques sont caractérisées par une production excessive et persistante de cellules sanguines dans la moelle. Les leucémies aiguës sont caractérisées par une production excessive et incontrôlée dans la moelle de cellules immatures, dites blastiques, bloquées à un stade de leur différenciation. Au cours de ce mémoire, je me focalise principalement sur les leucémies aiguës de type myéloïde.

## 3. Aspects cliniques des leucémies aiguës myéloïdes

### *a) Epidémiologie*

En France, il y a environ 3.000 nouveaux cas de leucémies aiguës myéloïdes (LAM) par an. Les leucémies aiguës de l'adulte sont les plus fréquentes (80%), mais restent des cancers relativement rares (moins de 2% de tous les cancers confondus) avec une incidence d'environ 4 à 5 cas pour 100000 habitants et un âge moyen au diagnostic de 70 ans. Chez l'adulte, les LAM affectent préférentiellement les hommes avec un sexe ratio de 1,5.

### *b) Signes cliniques et diagnostic*

Les signes cliniques sont très variables selon le degré d'envahissement médullaire et sanguin par les blastes leucémiques, associés à une insuffisance médullaire plus ou moins profonde et éventuellement à un syndrome tumoral. Ainsi, les signes cliniques peuvent aller d'une simple fatigue à une grave insuffisance médullaire (infections, anémie, hémorragies).

Les signes cliniques liés aux cytopénies sanguines sont plus ou moins marqués :

- Syndrome anémique : fatigue, pâleur, dyspnée, tachycardie.
- Syndrome infectieux : fièvre.
- Syndrome hémorragique : hémorragies cutanées, des muqueuses (gingivorragies).

Les signes cliniques liés au syndrome tumoral sont très variables :

- Hypertrophie des organes hématopoïétiques : adénopathies (rares), splénomégalie (15-20%), hyperplasie gingivale.
- Douleurs osseuses.
- Lésions cutanées.
- Atteinte du système nerveux central (rare).

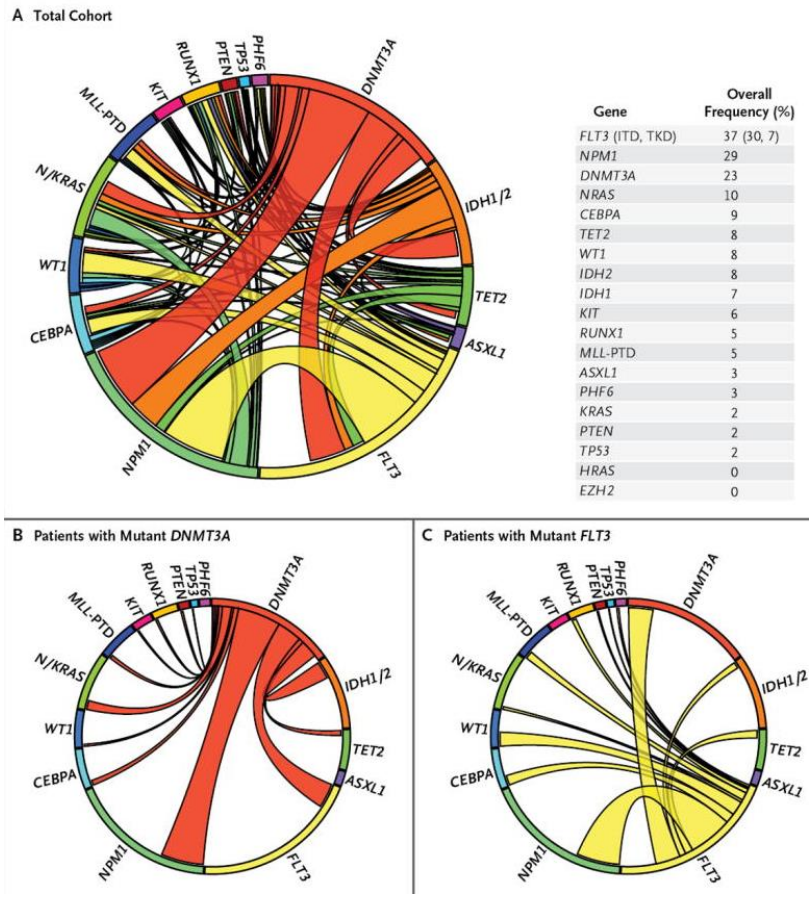
Le diagnostic des LAM est porté sur un examen de la moelle osseuse prélevée chez le patient (myélogramme), où l'on récupère plus de 20% de cellules immatures, appelées « blastes ». L'immunophénotypage, le caryotype et les examens de biologie moléculaire permettent de caractériser très précisément le sous type de LAM.

## 4. Classification des leucémies aiguës myéloïdes

Les LAM sont des pathologies cliniquement et biologiquement très hétérogènes. Pendant de nombreuses années, le développement des LAM a été décrit comme suivant un modèle « double hit ». Selon ce modèle, le phénotype leucémique est conféré à une CSH ou à un progéniteur myéloïde suite à deux événements mutationnels classés en deux types (Gilliland, 2002). Les mutations de type I affecteraient des gènes codant pour des acteurs de la signalisation et de la prolifération cellulaire (e.g. FLT3, KIT, N- ou K-RAS) et confèreraient un avantage prolifératif au clone leucémique. Les mutations de type II s'accumuleraient sur des gènes codant pour des facteurs de transcription (e.g. AML1-ETO, PML-RARA) (Kihara, 2014). Leur perte de fonction aboutirait à une dérégulation du programme d'expression génique des cellules, et *in fine* au blocage du processus de différenciation. Ces deux grands types d'évènements mutationnels peuvent être interdépendants puisque certains facteurs de transcription affectent l'expression d'acteurs de signalisation/prolifération, et que des récepteurs oncogéniques comme

FLT3-ITD peuvent inhiber la différenciation. Ce modèle schématique ne peut cependant pas expliquer à lui seul la biologie des LAM. De mutations jouant un rôle clef dans la tumorigénèse, et affectant préférentiellement des gènes dont le produit régule le métabolisme énergétique (IDH1 et 2) ou l'épigénome (DNMT3A, TET2) des cellules leucémiques, ont en effet été récemment identifiées

Environ 50% des patients ne présentent pas de mutations de type I. De plus, des études récentes ont montré que des mutations impliquées dans les LAM ne font pas partie des mutations de type I ou II (Shih, 2012, Wang, 2013). Ces mutations, appelées mutations de type III, englobent les mutations épigénétiques de DNMT3 (DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A), TET2 (tet methylcytosine dioxygenase 2) et IDH1 et IDH2 (isocitrate dehydrogenase 1/2). L'identification de ces nouvelles mutations pose les limites du modèle « double hit » et montre la complexité de la biologie des LAM. Des travaux sur l'association de mutations entre elles  montrent que certaines mutations auraient des mutations partenaires privilégiées. Ces découvertes ouvrent de nouvelles perspectives dans l'étude du clone leucémique (Figure 4) (Patel, 2012).




| Gene | Overall Frequency (%) |
|---|---|
| *FLT3* (ITD, TKD) | 37 (30, 7) |
| *NPM1* | 29 |
| *DNMT3A* | 23 |
| *NRAS* | 10 |
| *CEBPA* | 9 |
| *TET2* | 8 |
| *WT1* | 8 |
| *IDH2* | 8 |
| *IDH1* | 7 |
| *KIT* | 6 |
| *RUNX1* | 5 |
| *MLL-PTD* | 5 |
| *ASXL1* | 3 |
| *PHF6* | 3 |
| *KRAS* | 2 |
| *PTEN* | 2 |
| *TP53* | 2 |
| *HRAS* | 0 |
| *EZH2* | 0 |

**Figure 4 : Association et fréquence des mutations dans les LAM.**

Les figures 4B et 4C montrent les événements mutationnels chez des patients avec le mutant DNMT3A et le mutant FLT3 respectivement (Patel, 2012).

### *a) La classification FAB*

Il existe deux systèmes qui permettent la classification des LAM : la classification FAB (French-America-British) et la classification OMS (organisation mondiale de la santé). La classification FAB fut la première à classer les différents types de LAM. Publiée en 1976, elle classe les LAM en huit groupes (M0 à M7) selon le type et le degré de différenciation (granuleuse, monocytaire, érythroblastique ou mégacaryocytaire) (Bennett, 1976) (Tableau 1).

| Types de LAM | Caractéristiques | Marqueurs de différenciation | Incidence (%) |
|---|---|---|---|
| **M0** | Indifférenciée | $CD33^+$, $CD13^+$, $CD34^+$, $CD15^+$, $CD16^-$ | 3 |
| **M1** | Myéloblastique sans différenciation | $CD33^+$, $CD34^+$, $HLADR^+$, $CD13^+$, $CD16^-$ | 15-20 |
| **M2** | Myéloblastique avec différenciation | $CD33^+$, $CD34^+$, $HLADR^+$, $CD13^+$, $CD16^+$ | 25-30 |
| **M3** | Promyélocytaire | $CD34^-$, $HLADR^-$, $CD13^+$ | 5-10 |
| **M4** | Myélomonocytaire | $CD34^+$, $HLADR^+$<br>$CD14^+$ (< 50%)<br>$CD16^+$ (< 50%) | 25-30 |
| **M4E0** | Myélomonocytaire avec éosinophiles | | |
| **M5** | Monoblastique/monocytaire | $CD34^+$, $HLADR^+$<br>$CD14^+$ (> 50%)<br>$CD16^+$ (> 50%) | 2-10 |
| **M6** | Erythroleucémie | $CD34^+$, $HLADR^+$, $GPA^+$ | < 5 |
| **M7** | Mégacaryoblastique | $CD34^{+/-}$, $CD41^+$, $CD41b^+$, $HLADR^+$, $CD42^+$ | < 5 |

**Tableau 1 : Classification FAB des leucémies aiguës myéloïdes (Bennett, 1976).**

### *b) La classification OMS des LAM*

En 2001, à la suite des avancées cliniques dans le diagnostic et le suivi des patients atteints de LAM, l'organisation mondiale de la santé (OMS) a introduit une nouvelle classification. Ce système a été modifié en 2008 puis en 2016 pour incorporer des critères supplémentaires (informations génétiques,

moléculaires, morphologiques, immuno-phénotypiques et cliniques) et classe les LAM en six groupes majeurs plus précis (Vardiman, 2009, Arber, 2016) (Tableau 2).

| **Types de LAM** | **Anomalies génétiques** |
|---|---|
| 1. LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes | LAM avec t(8;21) (q22;q22) ; RUNX1 - RUNX1T1<br>LA promyélocytaire avec PML – RARA<br>LAM avec inv(16) (p13.1q22) ou t(16 ;16) (p13.1q22), CBFB - MYH11<br>LAM avec t(9;11) (p22;q23) ; MLLT3 - KMT2A (MLL)<br>LAM avec t(6;9) (p23;q34) ; DEK - NUP214<br>LAM avec inv(3) (q21q26.2) ou t(3;3) (q21;q26.2) ; GATA2, MECOM<br>LAM (mégacaryoblastique) avec t(1;22) (p13;q13) ; RBM15 - MKL1<br>LAM avec mutation NPM1<br>LAM avec mutation bi allélique CEBPA<br>Entités provisoires (LAM avec BCR-ABL1, LAM avec mutation RUNX1) |
| 2. LAM avec anomalies associées aux myélodysplasies | LAM faisant suite à un syndrome myélodysplasique ou un syndrome myéloprolifératif/dysplasique ou ayant des anomalies cytogénétiques de syndrome myélodysplasique. |
| 3. Néoplasies myéloïdes post-chimiothérapie | |
| 4. LAM sans autre spécification | LAM avec différenciation minime<br>LAM sans maturation<br>LAM avec maturation<br>Leucémie aiguë myélo-monocytaire<br>Leucémie aiguë monoblastique/monocytaire<br>Leucémie aiguë érythroïde<br>Leucémie aiguë mégacaryoblastique<br>Leucémie aiguë basophilique<br>Panmyélose aiguë avec myélofibrose |
| 5. Sarcome granulocytaire | Sarcomes myéloïdes de novo sans évidence de maladie médullaire. |
| 6. Proliférations myéloïdes associées à la trisomie 21 | |

**Tableau 2 : Classification OMS des leucémies aiguës myéloïdes (site web de l'OMS).**

## 5. Traitements et pronostic

### *a) Facteurs pronostiques*

L'évaluation du pronostic est primordiale pour la prise en charge des LAM. En fonction du risque de résistance aux traitements ou du risque de rechute, les facteurs pronostiques permettent d'orienter le patient vers un traitement adapté. Parmi les facteurs pronostiques connus, l'âge élevé, ou une mauvaise échelle de performance du patient (état de santé général et activité du quotidien effectué) sont associés à un faible taux de rémission complète et à une faible survie globale (Kantarjian, 2006). Ces critères permettent donc de prédire les risques liés au traitement choisi. A ces facteurs s'ajoutent à présent, les données cytogénétiques correspondant aux valeurs pronostiques les plus importantes pour prédire la survie des patients. Grâce à ces données, les LAM peuvent être classées en trois sous-groupes de pronostics différents (favorables, intermédiaires et défavorables) (tableau 3). Comme autres facteurs pronostiques, on retrouve également l'hyperleucocytose et le fait que la leucémie soit *de novo* ou secondaire.

Les réarrangements chromosomiques t(8;21), t(15;17) et inv(16) confèrent un pronostic favorable avec une survie globale à 3 ans de 66% pour les jeunes patients et 33% pour les patients âgés de plus de 60 ans. En revanche, les variations cytogénétiques comme les caryotypes complexes (plus de 3 anomalies génétiques), les monosomies ou les délétions des chromosomes 5 ou 7 sont toutes associées à un risque élevé d'échec thérapeutique et de mortalité. Elles représentent 15 à 20% des LAM et la survie globale à 5 ans est à peine de 15-20%, voire 5% pour les caryotypes monosomiques. Le pronostic intermédiaire englobe les LAM à caryotype normal, ou avec des anomalies sans valeur pronostique favorable, ou défavorable. Elles représentent 60% des LAM et la survie globale à 5 ans est de 40%. Dans ce groupe, l'impact des anomalies moléculaires est déterminant pour le pronostic d'où l'utilisation des mutations génétiques pour affiner le classement pronostique des LAM. En effet, la présence de la mutation FLT3-ITD dans le groupe cytogénétique intermédiaire représente un mauvais pronostic alors que les mutations de NPM1 ou CEBPA sont de pronostic favorable, mais uniquement en l'absence de FLT3-ITD. Récemment, de nouvelles anomalies affectant des gènes du remodelage chromatinien (TET2, DNMT3A) ou du métabolisme (IDH1 et IDH2) ont été découvertes, ajoutant un niveau de complexité supplémentaire au pronostic des LAM (tableau 3).

| Groupes pronostiques | Profil cytogénétique seul | Profil cytogénétique et anomalies moléculaires |
|---|---|---|
| Favorable | t(8;21) (q22;q22)<br>inv(16) (p13;1q22)<br>t(15;17) (q22;q12) | t(8;21) (q22;q22) sans mutation de cKIT<br>inv(16) (p13;1q22)<br>t(15;17) (q22;q12)<br>CN avec mutation de NPM1 sans mutation de FLT3<br>CN avec mutation bi allélique de CEBPA |
| Intermédiaire | Caryotype normal (CN)<br>t(9;11) (q22;q23)<br>Anomalies cytogénétiques qui ne sont pas dans le groupe favorable ou défavorable | t(8;21) (q22;q22) avec mutation de cKIT<br>t(9;11) (q22;q23)<br>Anomalies cytogénétiques qui ne sont pas dans le groupe favorable ou défavorable |
| Défavorable | Caryotype complexe<br>Inv(3) (q21;q26.2)<br>Anomalies 11q autre que t(9;11)<br>Monosomies ou délétions du chromosome 5 ou 7 | Caryotype complexe<br>Inv(3) (q21;q26.2)<br>Anomalies 11q autre que t(9;11)<br>Monosomies ou délétions du chromosome 5 ou 7<br>Mutations TP53<br>CN avec la mutation FLT3-ITD<br>CN avec la mutation DNMT3A<br>CN avec la mutation KMT2A-PTD |

**Tableau 3 : Classifications cytogénétiques avec ou sans les anomalies moléculaires des leucémies aiguës myéloïdes.**

### *b) Les traitements*

Le but du traitement est d'une part d'obtenir une rémission complète et d'autre part d'éviter les rechutes. Le traitement des LAM, inchangé depuis plusieurs décennies, est divisé en deux phases, une phase d'induction et une phase de consolidation. La phase d'induction vise à obtenir une rémission complète en réduisant le pool de cellules leucémiques. Cette phase implique généralement la combinaison

de deux drogues : la cytarabine (connue également sous le nom d'ARA-C) et une anthracycline comme la daunorubicine. La cytarabine est un analogue nucléosidique de la pyrimidine qui inhibe la synthèse de l'ADN, bloquant ainsi le cycle cellulaire et la division cellulaire. La daunorubicine est un intercalant à l'ADN qui inhibe la progression de la topoisomérase II. L'approche standard de la phase d'induction est appelée « 3 + 7 », 3 jours d'anthracycline et 7 jours d'aracytine. La réponse au traitement est évaluée après 14 jours avec un examen de la moelle osseuse obtenu par aspiration. Ce traitement de chimiothérapie intensive est généralement réservé aux patients présentant une LAM de pronostic favorable ou intermédiaire avec un faible risque de toxicité du traitement. Chez les sujets jeunes (< 60 ans), la rémission complète est obtenue entre 70% et 80% alors que chez les sujets âgés (> 60 ans) la rémission complète est de l'ordre de 50% à 70%. La phase de consolidation vise à prévenir les rechutes. Cette phase implique généralement l'administration de plusieurs cycles de cytarabine à haute dose et est principalement utilisée pour les patients jeunes (< 60 ans). Ces traitements intensifs de consolidation ne sont pas souvent applicables chez le sujet âgé (> 60 ans) du fait de leur toxicité élevée. A ce jour, il n'y a pas de traitement optimal pour les patients âgés qui sont principalement atteints de LAM de mauvais pronostic. Pour ces patients, un traitement d'entretien comportant une anthracycline et de la cytarabine à faible dose est donc généralement administré. Chez les sujets jeunes et de pronostic défavorable, la greffe de CSH est envisagée.

De nombreuses anomalies cytogénétiques confèrent un pronostic défavorable et un travail important est effectué pour développer d'autres agents chimiothérapeutiques basés sur le phénotype moléculaire d'une LAM donnée. Par exemple, les patients ayant des mutations FLT3-ITD ont un taux de rechute élevé et un mauvais pronostic. Des inhibiteurs de protéines à activité tyrosine kinase (quirzatinib, midostaurine) sont actuellement à l'étude pour tester leur efficacité dans le traitement des LAM avec un succès limité jusqu'à présent. Autre exemple, les patients ayant des mutations IDH1 et IDH2 ont un mauvais pronostic ou un pronostic intermédiaire et des inhibiteurs sont en cours d'essai clinique. En plus de l'utilisation d'inhibiteurs, plusieurs conjugués anticorps-médicament contre des protéines de surface exprimées uniquement sur des cellules leucémiques sont également en cours de développement. Le développement de nouvelles thérapies telles que celles mentionnées pour les mutations FLT3 et IDH1 et IDH2 sont le résultat d'une caractérisation étendue d'une anomalie donnée. Il est donc impératif de mieux comprendre les perturbations moléculaires qui contribuent à la biologie des LAM afin d'identifier de nouvelles cibles pour un traitement plus adapté. Les inhibiteurs actuellement utilisés ont un succès limité dans les LAM exprimant le récepteur à activité tyrosine kinase muté FLT3-ITD. Cette thèse vise à examiner plus en détail le rôle de FLT3-ITD dans la biologie des LAM et de trouver de nouvelles approches pour cibler les LAM exprimant ce récepteur muté.

# II. Le récepteur à activité tyrosine kinase FLT3

Afin de jouer leur rôle physiologique, les cellules doivent capter, intégrer et répondre à différents stimuli extracellulaires. Les communications entre les cellules et le microenvironnement sont possibles grâce à la fixation de messagers (cytokines, facteurs de croissance) sur leur récepteur. Ces récepteurs sont essentiellement localisés au niveau de la membrane plasmique. Les récepteurs de surface sont ancrés à la membrane plasmique et permettent la fixation de molécules extracellulaires appelées ligands. Cette fixation engendre la transmission du signal, en convertissant le signal extracellulaire en un signal intracellulaire. Il existe trois grands types de récepteurs de surface : les canaux ioniques, les récepteurs couplés aux protéines G et les récepteurs enzymatiques. Parmi les récepteurs enzymatiques, certains sont caractérisés par une activité kinase sur des résidus tyrosine. Ces récepteurs forment la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase.

## A. Les récepteurs à activité tyrosine kinase

### 1. Classification et structure des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs)

Les protéines kinases sont des enzymes clés dans la régulation de nombreux processus cellulaires qui catalysent le transfert d'un groupement phosphate d'un ATP (adénosine triphosphate) sur un groupement hydroxyle (-OH) d'une sérine, thréonine ou tyrosine. Parmi les 90 gènes identifiés codant pour une protéine à activité tyrosine kinase, 58 d'entre eux codent pour des récepteurs qui sont classés en 20 familles (Robinson, 2000, Lemmon, 2010) (Figure 5).

Ces RTKs sont constitués d'un domaine extracellulaire glycosylé, d'un domaine transmembranaire et d'une région intracellulaire qui contient le domaine à activité tyrosine kinase. Le domaine extracellulaire est impliqué dans la dimérisation du récepteur suite à la fixation de son ligand. La composition de ce domaine extracellulaire définit la classe des RTKs auquel le récepteur appartient sa spécificité pour un ligand. Les RTKs sont ancrés à la membrane plasmique grâce à un domaine transmembranaire composé d'une hélice α de 20 acides aminés. Ce domaine joue un rôle clé dans la stabilisation et la dimérisation du récepteur. La région intracellulaire est composée d'un domaine juxtamembranaire, d'un domaine contenant l'activité tyrosine kinase et d'une extrémité carboxy terminale. Le domaine à activité tyrosine kinase est composé de deux lobes connectés par une cavité permettant l'insertion de l'ATP (Figure 5).

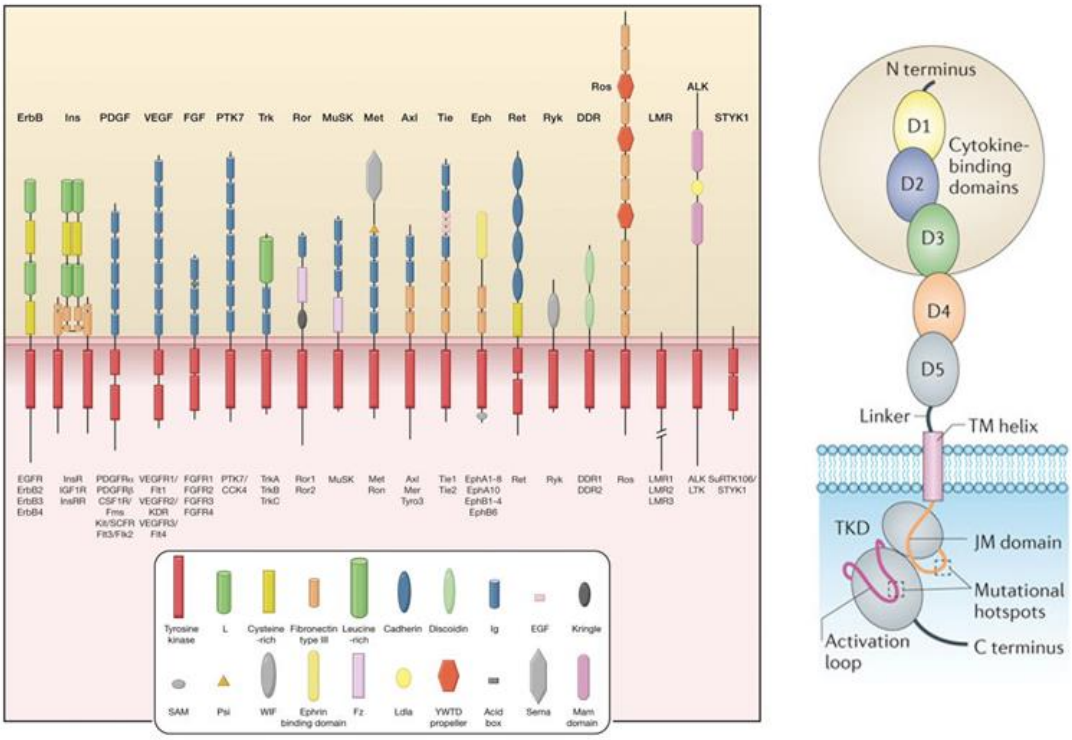



**Figure 5 : Classification et structure des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs).**

Les 58 RTKs humains sont classés en 20 familles. Les structures extracellulaires permettent de différencier les familles entre elles (Lemmon, 2010). Les RTKs sont constitués d'une région extracellulaire variable, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intracellulaire contenant l'activité tyrosine kinase (Verstraete, 2012).

## 2. Les récepteurs à activité tyrosine kinase de classe III

### *a) Généralités*

Les RTKs de classe III correspondent à la famille du PDGFR (platelet-derived growth factor receptor) (Yarden, 1986). Cette famille comprend cinq membres chez les mammifères : FLT3 (Fms-like tyrosine kinase 3), KIT, CSFR1 (colony-stimulating factor 1 receptor), PDGFRα et PDGFRβ. Les récepteurs FLT3, KIT et CSFR1sont tous les trois des récepteurs hématopoïétiques qui sont activés par des cytokines dimériques, constituées d'hélices α, et sont très importants dans le développement et l'homéostasie cellulaire du système hématopoïétique (Metcalf, 2008). Les récepteurs PDGFRα et PDGFRβ sont également activés par des cytokines dimériques mais qui sont constituées de feuillets β, et sont très importants dans les processus mésenchymateux comme l'angiogenèse et la prolifération des fibroblastes (Andrae, 2008, Caplan, 2011). Au niveau moléculaire, les RTKs-III sont caractérisés par une région extracellulaire glycosylée divisée en cinq modules immunoglobulines (environ 100 acides aminés chacun), une hélice transmembranaire (25 acides aminés), une région juxtamembranaire régulatrice (40 acides aminés) et un domaine tyrosine kinase conservé (Yarden, 1986, Qiu, 1988).

### *b) Les complexes RTK-III-cytokine*

D'une manière générale, les récepteurs sont dans un état dit « inactif » sous forme de monomère et l'activation des RTKs nécessite la liaison d'un ligand pour stabiliser la formation d'un dimère « actif » (Ullrich, 1990). Les ligands de tous les RTKs-III sont des molécules dimériques. Les ligands des récepteurs FLT3, KIT, CSF1R, PDGFRα et PDGFRβ sont respectivement le FLT3L (FLT3 ligand), le SCF, le CSF1 et l'IL-34 (Colony-Stimulating Factor 1 et Interleukine-34), et le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor).

Les études structurelles par cristallographie aux rayons X sur les régions extracellulaires des complexes de RTK-III-cytokine ont démontré divers modes d'interactions ligand-récepteur qui se sont manifestés au cours de l'évolution. Outre le récepteur FLT3, qui a une organisation moléculaire différente, les RTK-III logent leurs ligands de manière bivalente aux modules D3 et D2, et dans le cas de KIT le module D1 également (Figure 6b) (Liu, 2007; Yuzawa, 2007, Shim 2010, Ma, 2012). La liaison de tous les RTK-III à leur cytokine dimérique forme une structure parfaitement symétrique qui est compatible avec la bivalence des cytokines. Une comparaison des structures tertiaires de KIT, CSF1R et PDGFR montre que les modules D1 et D2 forment une unité structurelle rigide qui adopte différentes orientations autour du linker D2-D3. Lorsqu'ils sont liés par un ligand, les régions de liaison des modules D2-D3 du CSF1R et du PDGFR sont susceptibles d'avoir une flexibilité, qui a été proposée comme un mécanisme adaptatif pour lier différents types de ligands (Ma, 2012). Des études par alignements de séquences des régions extracellulaires ont révélé que tous les RTK-III, à l'exception de FLT3, partagent une séquence conservée dans le module D4 qui correspond au motif de dimérisation, suggérant que les contacts extracellulaires récepteur-récepteur, au niveau des modules D4, est une caractéristique commune dans l'assemblage des RTK-III.

L'assemblage du complexe FLT3-FLT3L est un cas particulier parmi les RTK-III. Bien que tous les autres récepteurs RTK-III lient leur ligand au niveau des modules D2 et D3, l'interaction de haute affinité de FLT3 avec FLT3L est uniquement médiée par le module D3. Ce dernier possède un épitope d'interaction compact qui est environ 50% plus petit que tous les autres épitopes des complexes RTK-III qui ont été caractérisés à ce jour (Figure 6b) (Verstraete, 2011). De plus, le complexe FLT3-FLT3L est dépourvu de contacts homotypiques entre deux récepteurs, en contraste avec les complexes KIT D1-D5-SCF et CSF1R D1-D5-CSF1. Cette observation est cohérente avec l'absence du motif de dimérisation D4 dans FLT3. D'autres études utilisant des modules extracellulaires de FLT3 tronqués du module D5, démontrent que le domaine proximal à la membrane plasmique n'est pas requis pour l'activation du récepteur, au contraire de la nécessité du module D5 de KIT dans la signalisation (Lavagna, 1995, Yusawa, 2007).

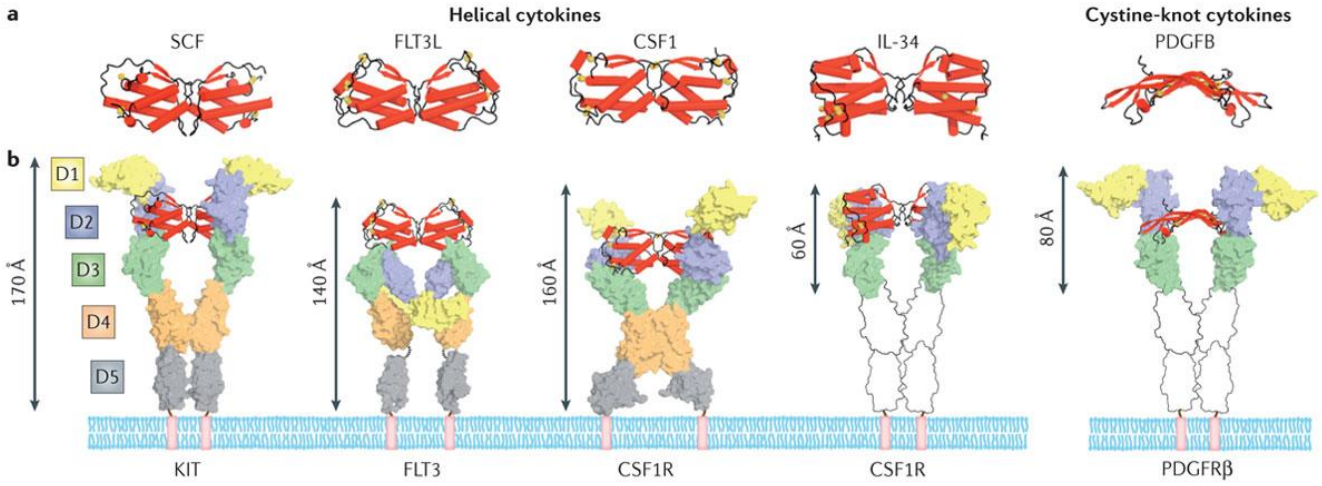



**Figure 6 : Diversité structurelle des cytokines et des complexe RTK-III-cytokine.**

**a.** Représentation des structures des cytokines de chaque RTK-III. Les structures secondaires sont représentées en rouge, les boucles en noir et les ponts disulfures en jaune.

**b.** Représentation des complexes RTK-III-cytokine pour chaque RTK-III. De gauche à droite de la figure : la structure tertiaire obtenue par rayons X du complexe entre la région extracellulaire du récepteur humain $KIT_{D1-D5}$ et son ligand le SCF, la structure tertiaire obtenue par rayons X du complexe entre la région extracellulaire du récepteur humain $FLT3_{D1-D5}$ et son ligand le FLT3L, la structure tertiaire obtenue par rayons X du complexe entre la région extracellulaire du récepteur humain $KIT_{D1-D5}$ et son ligand le SCF, la structure tertiaire obtenue par microscopie électronique du complexe entre la région extracellulaire du récepteur humain $CSFR1_{D1-D5}$ et son ligand le CSF1, la structure tertiaire obtenue par rayons X du complexe entre la région extracellulaire du récepteur humain $CSFR1_{D1-D3}$ et son ligand l'IL-34, la structure tertiaire obtenue par rayons X du complexe entre la région extracellulaire du récepteur humain $PDGFR_{D1-D3}$ et son ligand le PDGFB (Verstraete, 2012).

### *c) Implication de la région transmembranaire dans l'activation du domaine tyrosine kinase*

L'assemblage du complexe RTK-ligand est la base pour engendrer des modifications structurelles des régions transmembranaires et activer le domaine à activité tyrosine kinase des RTK-III. Des preuves structurelles et biochimiques montrent que les hélices transmembranaires ont un rôle clé dans le processus d'activation de nombreux RTK en raison de leur capacité à s'associer. Ceci contribue à la stabilité globale du complexe permettant la signalisation en aval. En effet, les RTK subissent une série de réarrangements en commençant par une dimérisation à la suite d'une liaison avec un ligand sur le domaine extracellulaire. Cette liaison permet de repositionner les domaines catalytiques intracellulaires dans une conformation active engendrant l'activation et la signalisation du récepteur (Figure 7) (Finger, 2009, Li, 2010). L'importance des réarrangements du domaine transmembranaire a été mise en évidence grâce à l'utilisation de mutations dans les hélices transmembranaires de divers récepteurs RTK comme le récepteur KIT (Akin, 2004, Li, 2006).

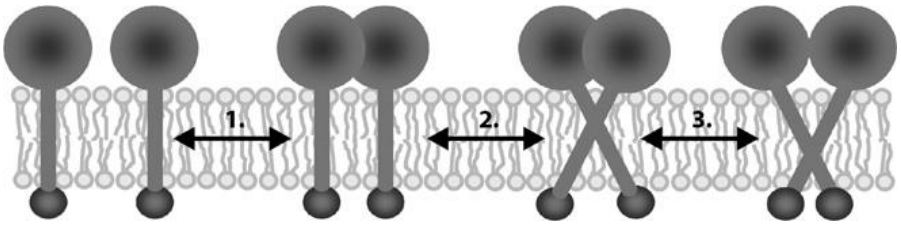



**Figure 7 : Formation du dimère de RTK et rôle du domaine transmembranaire.**

Les interactions spécifiques des domaines extracellulaires (**étape 1**), ainsi que les interactions entre les hélices transmembranaires des RTK (**étape 2**), sont essentielles à la formation ou à la stabilisation du dimère. Les interactions entre les domaines transmembranaires (**étape 3**) peuvent également contribuer à la formation de la conformation active des domaines intracellulaires des récepteurs (Finger, 2009).

### *d) Implication du domaine juxtamembranaire dans l'activation du domaine tyrosine kinase*

Dans divers RTKs, un autre mécanisme de régulation peut être attribué à la région juxtamembranaire mais diffère selon les familles de RTK (Hubbard, 2004). Dans les RTK de classe III, le domaine juxtamembranaire joue un rôle crucial dans le processus d'inhibition et d'activation. Ce domaine est généralement constitué de 40 à 80 acides aminés dont des acides aminés basiques (lysine, arginine) localisés près de la membrane. Ces acides aminés ont été décrits comme des sites de fixation ou de phosphorylation pour des molécules de signalisation (Mori, 1993). Des études structurelles des récepteurs inactifs FLT3, KIT et CSFR1 ont révélé que leur région juxtamembranaire adopte une conformation auto-inhibitrice qui occupe la cavité du site actif du domaine tyrosine kinase. Cette conformation empêche la boucle d'activation de passer à sa conformation active (Griffith, 2004, Schubert, 2007). La longueur de la région juxtamembranaire ainsi que les résidus tyrosines, sont conservés dans toutes les séquences de RTK-III. Des études biochimiques ont montré que l'activation des domaines kinases dépend essentiellement de la phosphorylation des résidus tyrosines du domaine juxtamembranaire. La phosphorylation de ces résidus change la conformation de la région transmembranaire (passage de la conformation *cis* à *trans*). Les régions juxtamembranaires ne peuvent donc plus adopter leur conformation auto-inhibitrice, conduisant à l'activation du domaine kinase (Chan, 2003, Kiyoi, 1998) (Figure 8).

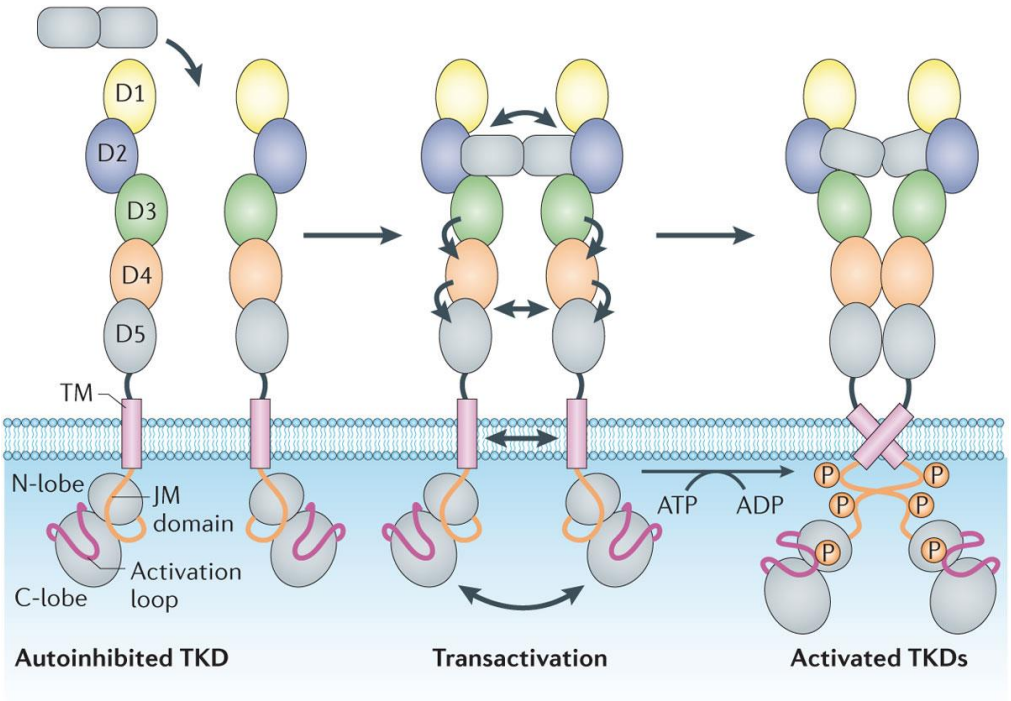



**Figure 8 : Mécanisme général d'activation des RTK-III.**

En absence de ligand, le domaine tyrosine kinase est inhibé par la région juxtamembranaire qui se retrouve entre les lobes C-kinase et N-kinase. La fixation du ligand va permettre la dimérisation du récepteur et le réarrangement de la région extracellulaire. Ce changement structural va engendrer une interaction entre les domaines transmembranaires des deux récepteurs, la phosphorylation de résidus clés au sein de la région juxtamembranaire et ainsi son changement de conformation qui permettra la libération du domaine kinase et son activation (Verstraete, 2012).

## B. Le récepteur FLT3

### 1. Structure du Récepteur FLT3

Le récepteur FLT3 (Fms-like tyrosine kinase 3), également connu sous le nom de FLK2 (fetal liver tyrosine kinase 2), STK-1 (stem cell tyrosine kinase 1) ou CD135, est codé par le gène *FLT3*. Le clonage du gène murin a été réalisé en parallèle par deux laboratoires sur des cellules murines de foie fœtal et sur des cellules murines du placenta (Matthews, 1991, Rosnet, 1991). Le clonage du gène *FLT3* humain a été réalisé plus tard (Rosnet, 1993). Le gène humain, constitué de 24 exons, couvre approximativement 96 kb et est localisé sur le chromosome 13q12. La transcription du gène *FLT3* produit un ARNm qui exprime un récepteur à activité tyrosine kinase de classe III de 933 acides aminés (Figure 9). La protéine mature en passant par le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi afin d'être glycosylée et conjuguée avec des résidus galactose, mannose et N-acétylglusamine sur la partie N-terminal de la protéine, lui permettant d'être adressée à la membrane plasmique. FLT3 peut avoir un poids moléculaire variable, selon son statut de glycosylation, qui peut être observé par Western Blot. En effet, la protéine glycosylée possède un poids moléculaire de 160 kDa et la protéine non glycosylée, qui n'est pas associée à la membrane, un poids moléculaire de 130 kDa (Rosnet, 1993).

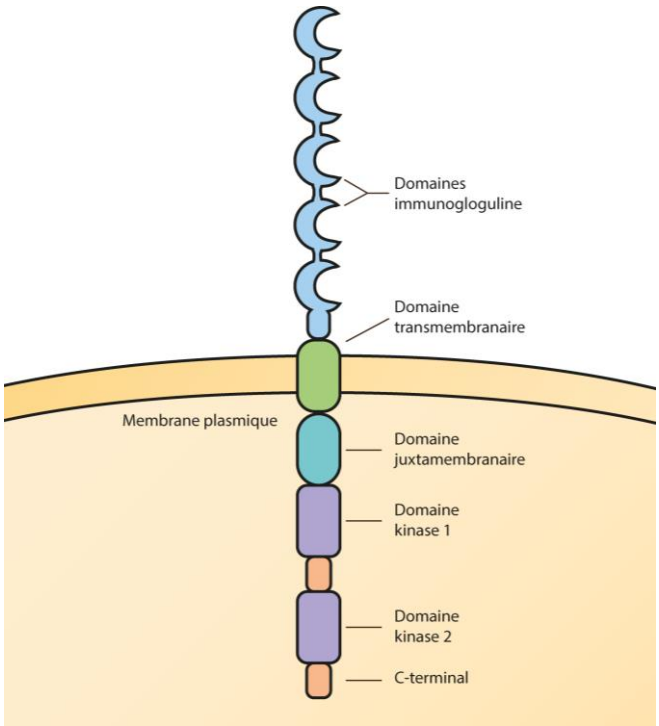



**Figure 9 : Structure du récepteur à activité tyrosine kinase de classe III FLT3.**

Le récepteur FLT3 est composé de 4 régions : une région extracellulaire composée de cinq domaines immunoglobuline-like dont le troisième est responsable de sa liaison avec le ligand FLT3L, une région transmembranaire, une région juxtamembranaire possédant un rôle de régulateur de l'activité kinase et une région intracellulaire possédant le domaine à activité tyrosine kinase. Le domaine kinase est composé de deux lobes, le lobe C-kinase et le lobe N-kinase, séparés par une cavité permettant l'insertion du substrat (adapté de Markovic, 2005).

## 2. Expression du récepteur FLT3

Dans l'hématopoïèse normale, le récepteur FLT3 est exprimé par les cellules souches hématopoïétiques CD34$^+$ et les progéniteurs hématopoïétiques immatures, incluant les progéniteurs lymphoïdes B, les précurseurs myéloïdes et les monocytes (Figure 10) (Rosnet, 1993). Cependant le récepteur n'est pas présent dans les précurseurs érythroïdes. Il a également été montré que les cellules CD34$^+$ pouvaient donner deux populations différentes selon le niveau de FLT3 : les cellules exprimant un haut niveau de FLT3, les progéniteurs CFU-GM, et les cellules n'exprimant pas ou très faiblement le récepteur FLT3, les progéniteurs CFU-E (Gotze, 1998). Le récepteur FLT3 est également exprimé dans les autres organes hématopoïétiques comme la rate, le foie, le thymus et le placenta (Lyman, 1998, Stirewalt, 2003). Le récepteur FLT3 joue un rôle important dans la régulation précoce de l'hématopoïèse. En effet, la signalisation de FLT3 pourrait favoriser la survie cellulaire des cellules souches hématopoïétiques et des progéniteurs myéloïdes par une régulation positive de Mcl-1, une protéine de survie homologue à la protéine anti-apoptotique BCL-2 (Rosnet, 1993, Kikushige, 2008).

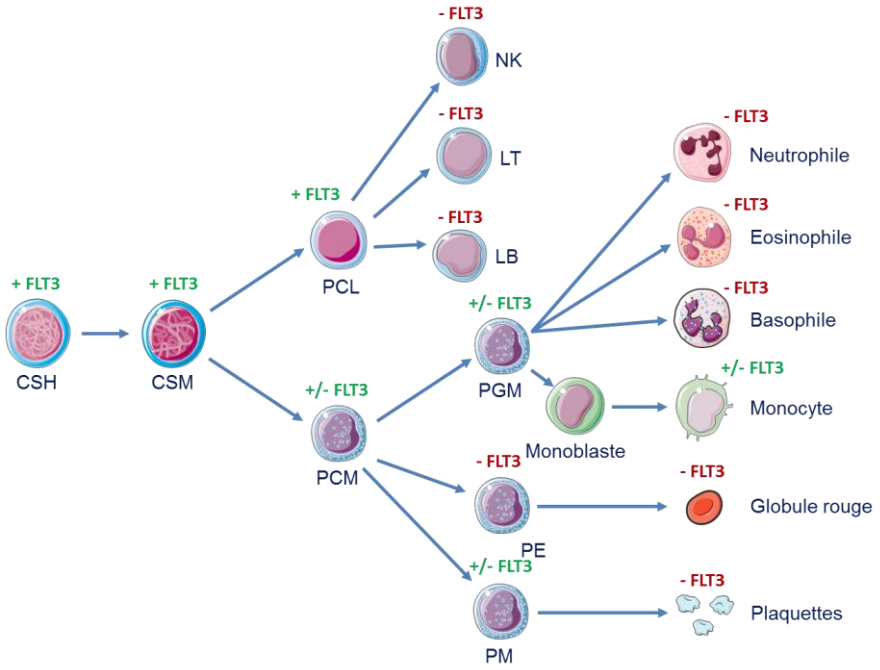



**Figure 10 : Expression de FLT3 au cours de l'hématopoïèse normale.**

Le récepteur est exprimé principalement dans les progéniteurs précoces myéloïdes et lymphoïdes et dans les monocytes matures (adapté de Stirewalt, 2003).

L'utilisation des modèles murins de knockdown du gène *FLT3* a permis d'identifier le rôle du récepteur FLT3 dans l'hématopoïèse physiologique. Les souris *Flt3*$^{-/-}$ se développent normalement et

possèdent une hématopoïèse normale avec une diminution du nombre de précurseurs lymphoïdes B. Or, des études de transplantation ont montré que les cellules issues de souris *Flt3*$^{-/-}$ sont incapables de reconstituer une hématopoïèse complète à la suite d'une irradiation, suggérant ainsi l'importance du récepteur FLT3 dans la régulation de l'hématopoïèse précoce (Mackarehtschian, 1995).

### 3. FLT3 ligand

L'exposition du récepteur FLT3 à son ligand FLT3L (FLT3 ligand) est une étape cruciale dans la régulation du récepteur. Le clonage du ligand a été réalisé par deux laboratoires dans les années 1993-1994 (Lyman, 1993, Hannum, 1994). Il s'agit d'une protéine transmembranaire de type I dont la partie extracellulaire est responsable de l'activation du récepteur FLT3. Cette cytokine appartient à une petite famille de facteurs de croissance qui stimule la prolifération et la différenciation des cellules hématopoïétiques (Wodnar-Filipowicz, 2003). Le FLT3L est la cible de métalloprotéases comme la TACE (TNFα converting enzyme), dont la coupure conduit à la libération de la protéine dans le milieu extracellulaire qui peut ainsi effectuer son rôle de facteur de croissance soluble (Horiuchi, 2009). Un épissage alternatif peut également contribuer à la génération d'une protéine soluble. Les isoformes solubles et transmembranaires du ligand de FLT3 sont biologiquement actives et stimulent l'activité du récepteur FLT3. Contrairement au récepteur FLT3, l'ARNm du ligand de FLT3 est exprimé dans tous les tissus. Cependant, l'expression de la protéine est retrouvée uniquement dans les fibroblastes du microenvironnement de la moelle osseuse et dans les lymphocytes T.

L'utilisation de modèles murins KO *FLT3L*$^{-/-}$ a mis en évidence des déficiences plus sévères que dans les souris KO *FLT3*$^{-/-}$. En effet, ces souris présentent une réduction cellulaire dans les organes hématopoïétiques, une diminution du nombre de progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes, et une déficience importante en cellules NK (natural killer) et en cellules dendritiques dans la lymphe, la rate et le thymus (McKenna, 2000). Ces résultats montrent un rôle central du ligand dans la survie, la prolifération et la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques.

### 4. Synergie du FLT3L avec d'autres cytokines

Des évidences expérimentales montrent que le FLT3L agit en synergie avec d'autres facteurs de croissance pour promouvoir la prolifération des progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes. La réponse médiée par le FLT3L est très dépendante de son association avec d'autres facteurs de croissance comme l'IL3, le G-CSF, le CSF-1, le GM-CSF ou le ligand de KIT. FLT3L seul est insuffisant pour induire une prolifération cellulaire mais induit une différenciation monocytaire *in vitro* (Lyman, 1998, Ebihara, 1997). Cependant, le FLT3L induit la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques lorsque celui-ci agit avec d'autres facteurs de croissance et cytokines. En effet, le FLT3L induit une meilleure stimulation des progéniteurs myléoïdes lorsqu'il est combiné avec l'IL3 et le ligand de KIT (Rusten, 1996). En

revanche, la stimulation avec le FLT3L n'a pas d'impact sur l'érythropoïèse et la mégacaryopoïèse, corrélé avec le fait que le récepteur FLT3 ne soit pas exprimé dans ces lignées (Gabbianelli, 1995).

## 5. Activation et signalisation de FLT3

Le processus d'activation, d'internalisation et de dégradation de FLT3 est le même que pour tous les autres membres de la classe III des RTK. Comme évoqué précédemment, le récepteur sauvage FLT3 reste sous sa forme inactive monomérique en absence de FLT3L grâce à la conformation inhibitrice du domaine juxtamembranaire. La fixation du FLT3L va induire la formation d'un homodimère au niveau de la membrane plasmique. La dimérisation va permettre le rapprochement des domaines cytoplasmiques et la phosphorylation des résidus tyrosines situés au niveau du domaine juxtamembranaire. Cette phosphorylation permet de créer des sites d'ancrage pour différentes molécules effectrices ayant un domaine SH2. La cascade de signalisation en aval implique des phosphorylations et des activations de plusieurs molécules effectrices qui peuvent être impliquées dans l'inhibition de l'apoptose, la prolifération et la différenciation (Takashi, 2011) (Figure 11). Lors de l'activation du récepteur FLT3, le signal est relayé par la sous unité p85 du PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) et la protéine adaptatrice Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2) (Dosil, 1993). Ces deux protéines vont permettre respectivement l'activation des voies PI3K / AKT et des MAP kinases qui sont les voies de signalisation majeures en aval de FLT3. Le récepteur FLT3 peut également activer d'autres effecteurs impliqués dans le métabolisme et la prolifération comme la phospholipase C γ1 et la GTPase Ras (Dosil, 1993, Hayakawa, 2000, Takashi, 2006). Cependant, la signalisation normale de FLT3 induit une faible phosphorylation de STAT5 (phosphorylation de STAT5a et non STAT5b), qui est une cible clé de la signalisation oncogénique de FLT3 (Zhang, 2000).

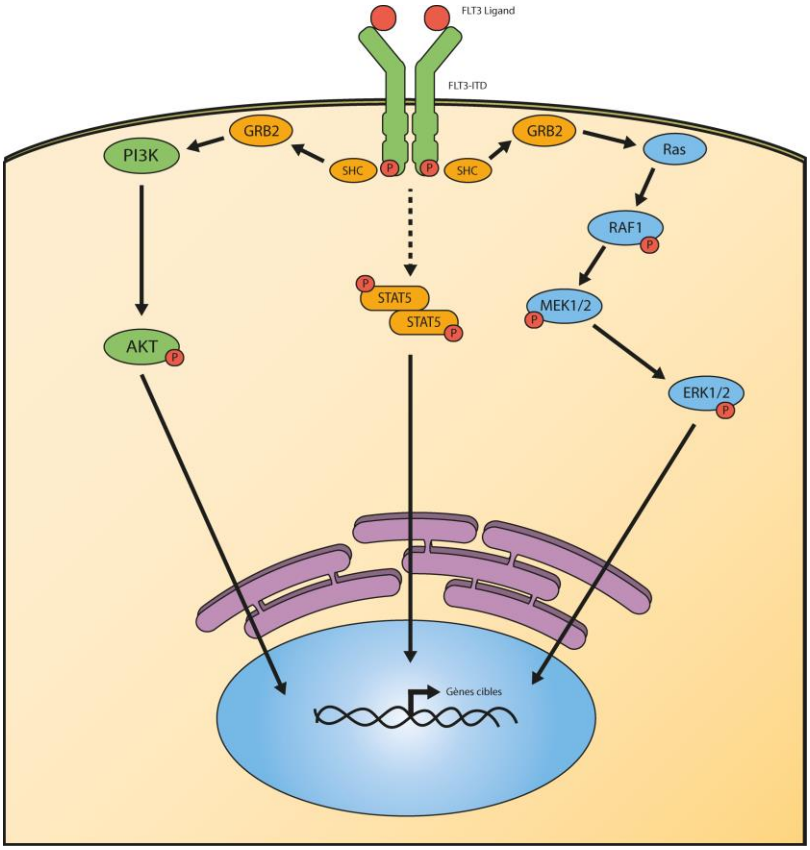



**Figure 11 : Signalisation normale de FLT3.**

La fixation du FLT3L sur son récepteur induit une activation de différentes voies de signalisation comme la voie PI3K/AKT, la voie STAT5 et la voie des MAPK (Parcells, 2006).

## C. Le récepteur FLT3 dans les leucémies

### 1. Expression du récepteur FLT3 dans les leucémies

FLT3 est exprimé dans plusieurs hémopathies malignes, incluant les leucémies lymphoïdes et les leucémies myéloïdes (70 à 100% des cas de LAM) (Birg, 1992). Différentes études ont montré que le niveau d'ARNm est plus important dans les leucémies aiguës myéloïdes et lymphoïdes que dans la moelle osseuse normale. De plus, le niveau protéique de FLT3 n'a pas été retrouvé dans la moelle osseuse normale alors que la protéine est retrouvée dans la plupart des leucémies aiguës myéloïdes et lymphoïdes (Carow, 1996). FLT3 et FLT3L sont exprimés dans les lignées cellulaires leucémiques, incluant les lignées myéloïdes, les pré-B, les lignées cellulaires monocytaires (Meierhof, 1997, Xu, 1999).

### 2. Les mutations de FLT3

L'auto-renouvellement et la prolifération cellulaire sans facteurs de croissance sont deux facultés importantes pour l'oncogenèse. L'implication de FLT3 dans la prolifération de progéniteurs immatures suggère un potentiel oncogénique de la protéine. Des évidences expérimentales indiquent que le gène *FLT3* est un proto-oncogène avec la capacité d'améliorer la survie et la prolifération des cellules leucémiques. Deux types de mutations ont été décrits comme dérégulant le récepteur FLT3.

#### *a) La mutation FLT3-ITD*

La première mutation du gène *FLT3* fut décrite en 1996 et correspond à des duplications internes en tandem (ITD) au niveau du domaine juxtamembranaire de FLT3 (Nakao, 1996). Des études cliniques ont identifié la mutation FLT3-ITD dans 17-26% des cas de LAM (Kottaridis, 2001). Les premières mutations ITD ont été découvertes suite à l'observation que des leucémies primaires, exprimant le récepteur FLT3, avaient des produits de PCR plus longs que la normale (Nakao, 1996). Le séquençage a également révélé que l'insertion mutationnelle se localise principalement au niveau de l'exon 14 du gène qui code pour le domaine juxtamembranaire. La longueur de la mutation ITD peut varier entre 3 à plus de 400 paires de bases mais ne modifie pas le cadre de lecture (Schnittger, 2002).

Les mutations ITD permettent une dimérisation et une phosphorylation du récepteur FLT3 indépendante de la fixation du ligand FLT3L. En effet, le récepteur non muté possède au sein de son domaine juxtamembranaire une structure qui peut inhiber la dimérisation et l'activation du domaine kinase en l'absence de ligand. La présence de la mutation empêche l'association du domaine juxtamembranaire avec le domaine kinase, permettant ainsi son activation constitutive (Kiyoi, 2002, Kottaridis, 2003). La mutation engendre également le changement de conformation, d'une forme inactive à une forme active du récepteur, menant ainsi à une faible activité inhibitrice du domaine juxtamembranaire en absence de ligand (Griffith, 2004). Pour la suite de ce mémoire, nous nous intéressons principalement à ce type de mutation.

### *b) Les mutations du domaine tyrosine kinase (TKD)*

Un deuxième type de mutation a été décrit pour le récepteur FLT3 et correspond à une mutation ponctuelle au niveau du domaine à activité tyrosine kinase. Ces mutations sont retrouvées dans 5 à 10% des cas de LAM. Il s'agit d'une mutation « faux sens » dans laquelle un nucléotide du gène *FLT3* est changé, induisant le remplacement de l'acide aminé associé. Ces mutations principalement localisées au niveau de l'exon 20 du gène permettent également l'activation constitutive du récepteur. Elles peuvent émerger à la suite d'un traitement et avoir pour conséquence une résistance des cellules vis-à-vis des traitements utilisés (Smith, 2012). La principale mutation ponctuelle décrite pour le récepteur FLT3 correspond à la substitution d'une tyrosine en un acide aspartique en position 835, dans la boucle d'activation du domaine kinase. D'autres mutations ponctuelles ont été décrites à d'autres positions, comme en position 836 ou en position 841, associées également à l'activation constitutive du récepteur.

## 3. Signalisation oncogénique de FLT3 muté

Les mutations activatrices perturbent le mécanisme d'auto-inhibition du récepteur FLT3 en maintenant une conformation active du domaine kinase. Le récepteur muté active des protéines effectrices qui vont augmenter la prolifération et la survie cellulaire.

La phosphorylation constitutive des MAP kinases a été observée dans la lignée cellulaire myéloïde murine Baf/3 exprimant le récepteur FLT3-ITD. Cette voie participe à l'activation de la voie Ras qui permet une prolifération et une survie cellulaire indépendante aux facteurs de croissance (Hayakawa, 2000, Mizuki, 2000). En effet, l'inhibition de cette voie empêche la prolifération des cellules et induit une forte apoptose *via* l'inhibition de RSK1. Cette dernière est connue pour réguler négativement la protéine pro-apoptotique BAD (Köthe, 2013, Yang, 2005). La voie des MAP kinases a également été décrite pour bloquer la différenciation cellulaire en inhibant C/EBPα par phosphorylation (Radomska, 2006).

D'autres études montrent que les mutations de FLT3 phosphorylent constitutivement et activent la voie AKT. AKT inhibe l'apoptose en phosphorylant Foxo3α dans les cellules Baf/3 exprimant FLT3-ITD. L'inhibition de Foxo3α prévient la transcription de gènes cibles pro-apoptotiques de la famille de Bcl2 (Scheijen, 2004, Brandts, 2005).

Alors que la signalisation impliquant AKT et MAPK n'est pas très différente de la signalisation en aval du récepteur FLT3 non muté, la voie STAT5 semble être exclusivement activée par la mutation FLT3-ITD (Choudhary, 2005; Hayakawa, 2000; Kiyoi, 2002; Mizuki, 2000). Le mécanisme responsable de l'activation de STAT5 en aval de FLT3-ITD semble passer par les kinases Src et non par les protéines JAK (Choudhary, 2009). En effet, la mutation ITD induit une forte phosphorylation des tyrosines 589 et 591 qui sont essentielles dans la fixation des protéines Src et que l'on ne retrouve pas lors d'une mutation TKD (Leischner, 2012).En effet, des études ont montré que la mutation FLT3-TKD n'induisait pas ou très faiblement l'activation de STAT5 (Choudhary, 2005, Grundler, 2005). Parmi les gènes cibles de

STAT5 connus, des études ont mis en évidence une importante expression des PIM kinases dans les cellules FLT3-ITD. PIM-1 phosphoryle différents substrats dont CDC25A (progression des cellules dans le cycle cellulaire) ou Bad (bloquage de la signalisation pro-apoptotique) (Bertoli, 2015, Kim, 2005). La protéine anti-apoptotique MCL1 a également été retrouvée surexprimée par STAT5 en aval de FLT3-ITD (Yoshimoto, 2009).

### 4. La mutation FLT3-ITD, une mutation « conductrice » des LAM

Une mutation FLT3-ITD présente au diagnostic l'est aussi à la rechute dans plus de 80% des patients atteints de LAM, suggérant que la mutation ITD est une mutation dite « conductrice » impliquée dans le développement des leucémies (Kottaridis, 2001, Shih, 2002). La faible efficacité clinique des inhibiteurs de FLT3 dans certaines études cliniques a généré l'idée que la mutation FLT3-ITD était simplement « une mutation passagère ». Le séquençage du génome de 24 patients atteints de LAM a identifié deux gènes principalement mutés dans les LAM (Welch, 2012), dont l'un des deux correspond à la mutation ITD du gène *FLT3*. De plus, des études plus récentes utilisant un inhibiteur de FLT3, l'AC220 (ou quirzatinib), mettent en évidence que la mutation FLT3-ITD est « une mutation conductrice ». En effet, lors d'une étude clinique de phase II sur l'utilisation de l'AC220 en monothérapie pour 53 patients FLT3-ITD en rechute ou réfractaires aux thérapies conventionnelles, 45% de ces patients présentaient une rémission complète avec moins de 5% de blastes dans la moelle. Une autre étude a exploré l'apparition de mutations secondaires de FLT3 conférant une résistance dans 8 patients FLT3-ITD qui ont rechuté à la suite d'un traitement continu à l'AC220. Les auteurs ont mis en évidence trois mutations au niveau du domaine tyrosine kinase de FLT3 et qui confèrent une résistance à l'AC220 (Smith, 2012). L'utilisation de modèle murin a également permis de définir l'importance de la mutation FLT3-ITD. En effet, les souris knock-in pour FLT3-ITD présentent un syndrome myéloprolifératif qui peut évoluer vers une LAM lorsque la mutation FLT3-ITD est associée à d'autres mutations comme NPM1c ou NUP98-HOXD13 (Greenbalt, 2012, Mupo, 2013). Ces observations suggèrent que FLT3-ITD et les mutations au niveau du domaine kinase sont des mutations « conductrices ».

### 5. Impact clinique des mutations de FLT3

Le gène *FLT3* est un des gènes les plus ciblés par des mutations activatrices qui sont retrouvées dans environ 30% des LAM et le gène muté est associé à un mauvais pronostique (Kindler, 2010). La principale mutation de FLT3 présente dans les leucémies correspond à la mutation ITD qui est identifiée dans 20-25% des LAM, moins de 5% dans les syndromes myéloprolifératifs et occasionnellement dans les LAL (leucémies aiguës lymphoïdes). La mutation gain de fonction TKD est quant à elle présente dans 7% des LAM (Stirewalt, 2003). Les mutations de FLT3 sont également retrouvées dans environ 5 à 15% des LAM de l'enfant (Takahashi, 2011). La présence de la mutation FLT3-ITD est généralement associée à une hyperleucocytose et un haut pourcentage de blastes leucémiques dans la moelle et le sang périphérique. De plus, les mutations FLT3-ITD corrèlent avec un important risque de rechute (74% contre

48% pour les FLT3 non mutés) et une faible survie globale (32% pour les FLT3-ITD et 44% pour les FLT3 non mutés à 5 ans) (Frohling, 2002, Santos, 2011, Thiede, 2002). FLT3-ITD est un facteur de pronostic largement accepté dans la LAM avec un caryotype normal (Santos, 2011). Son association avec d'autres mutations est également un paramètre important dans le diagnostic des LAM. En effet, l'association de FLT3-ITD avec les mutations du gène NPM1 ou C/EBPα augmente la survie globale et diminue le taux de rechutes (Schnittger, 2005, Renneville, 2009).

Différentes caractéristiques des mutations FLT3-ITD ont des impacts cliniques variables. La variation allélique de FLT3 (ratio de FLT3-ITD sur FLT3 non muté) est une valeur pronostique dans les LAM (Kottaridis, 2001, Thiede, 2002). Dans plus de 15% des patients atteints de LAM FLT3-ITD, le ratio entre le récepteur muté et sauvage est supérieur à 1, impliquant une augmentation du nombre de copie de FLT3-ITD ou une perte de l'allèle non muté. Ce ratio est associé à un plus haut risque de rechute et une plus faible survie globale à 5 ans (Griffiths, 2005, Gale, 2008).

La corrélation entre la taille des duplications en tandem du récepteur FLT3 et le mauvais pronostic est une caractéristique qui a également été décrite. Les patients présentant une insertion de plus de 40 nucléotides ont une survie globale plus courte que les autres (Stirewalt, 2006). Cependant, cette valeur pronostique est controversée. Le statut de FLT3 peut changer entre le diagnostic et la rechute. En effet, la taille des duplications ou le taux de FLT3-ITD peuvent varier entre le diagnostic et la rechute, et il se peut même que la mutation FLT3-ITD disparaisse (How, 2012 ; Schnittger, 2002). De plus, la localisation de la duplication en tandem au niveau du premier domaine kinase de FLT3 est associée à un plus faible taux de survie globale (Schlenck, 2014).

La dernière caractéristique correspond au taux de FLT3 ligand dans le sang périphérique. Un haut niveau de FLT3L peut augmenter la stimulation du récepteur muté et mettre en échec les traitements dans les LAM FLT3 ITD. Plusieurs études *in vitro* sur des cellules leucémiques supportent cette hypothèse (Sato, 2011, Zhou, 2009). De plus, on observe chez les patients traités avec des chimiothérapies conventionnelles une augmentation significative du niveau du FLT3L, suggérant un mécanisme de résistance dans les cellules leucémiques (Blumenthal, 2000).

## 6. Thérapeutique ciblée dans les LAM FLT3-ITD

Les observations sur les mutations activatrices de FLT3 dans les LAM ont fait de FLT3 une cible thérapeutique intéressante. Le succès de l'Imatinib ciblant l'oncogène BCR-ABL (Glivec, Novartis) dans le traitement des leucémies myéloïdes chroniques a motivé le développement de plusieurs inhibiteurs de FLT3 (Leung, 2012). Le premier inhibiteur ciblant FLT3 fut l'AG1295 (un dérivé de la quinoxaline). Initialement décrit pour inhiber le récepteur au PDGF, cet inhibiteur cible efficacement FLT3 *in vitro* mais il n'a pas pu être utilisé cliniquement à cause de sa faible solubilité et biodisponibilité (Levis, 2001). D'autres inhibiteurs ont été ou sont en cours d'étude clinique comme le SU11248 (sunitinib, Pfizer), le

Bay 43-9006 (sorafenib, Bayer Pharmaceuticals), un inhibiteur initialement décrit pour les PKC (PKC412, midostaurine), l'AC220 (quirzatinib, Amit Biosciences) ou plus récemment le Gilteritinib (ASP2215, Astellas Pharma) (Kindler, 2010, Leung, 2012, Pemmaraju, 2011, Pratz, 2017, Lee, 2017). La majorité de ces inhibiteurs inhibent l'activité de FLT3 en se logeant dans le site à l'ATP du domaine kinase de la protéine. Le problème de ces inhibiteurs est qu'ils ne sont généralement pas complètement spécifiques de FLT3. Une autre approche de ciblage de FLT3 correspond au développement d'anticorps monoclonaux comme l'IMC-EB10 qui bloque la signalisation par fixation sur le récepteur. Des études précliniques ont observé un effet antiprolifératif de l'IMC-EB10 dans des LAM exprimant le récepteur FLT3-ITD mais aussi dans des LAM exprimant le récepteur sauvage (Piloto, 2006).

Bien que prometteur pour l'élimination des cellules leucémiques exprimant FLT3-ITD *in vitro*, certains essais cliniques sur l'utilisation de ces inhibiteurs en monothérapie sont limités par une réponse clinique partielle. Le problème majeur est que ces inhibiteurs sont généralement efficaces pour cibler les cellules exprimant FLT3-ITD dans le sang périphérique alors que l'effet dans la moelle est limité. De plus, des évidences cliniques suggèrent que la cellule met en place différents mécanismes de résistance. Pour contrer ces résistances, les inhibiteurs sont combinés à une chimiothérapie, améliorant ainsi l'effet des inhibiteurs et le taux de rémission complète mais on observe encore des cas de rechute.

## 7. Mécanismes de résistance aux traitements

L'apparition de résistance à la suite d'un traitement ciblant FLT3 dans les LAM peut avoir plusieurs explications. Certains mécanismes de résistance ont été observés *in vitro*. L'un d'eux correspond à des mutations ponctuelles au sein du domaine kinase au niveau de la poche à ATP, modifiant la structure de la poche, empêchant ainsi aux inhibiteurs de s'y fixer (Bagrintseva, 2004; Cools, 2004). Les cellules leucémiques peuvent également devenir dépendantes d'une autre anomalie génétique ou d'une voie de signalisation alternative (Kornblau, 2006). L'activation de voies de signalisation alternatives peut compenser le blocage de FLT3. C'est ce qui a été montré avec l'activation des voies PI3K/AKT ou Ras lors d'une culture continue des cellules avec une inhibition de FLT3 (Piloto, 2007). Une augmentation de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 a également été observée, indiquant une voie alternative pour résister à l'inhibition de FLT3 (Kohl, 2007). De récentes études ont également montré une implication de régulateurs métaboliques comme ATM (ataxia telangiectasia mutated) et la G6PD (glucose 6-phosphate déhydrogenase) qui permettent de diminuer le niveau des radicaux libres oxygénés (reactive oxygen species) accumulés à la suite d'un traitement (Gregory, 2016).

L'évaluation du niveau de FLT3L avant et après chimiothérapie chez des patients atteints de LAM a révélé une importante augmentation du niveau du FLT3L après chimiothérapie (Sato, 2011). De plus, l'ajout de FLT3L dans le milieu de culture réduit la réponse cytotoxique de plusieurs inhibiteurs de FLT3, suggérant que la chimiothérapie elle-même pourrait entraver l'efficacité des molécules ciblant FLT3

(Zheng, 2011). Les données d'une autre étude ont montré une expression hautement élevée de FLT3-ITD au niveau de la surface cellulaire comme mécanisme de résistance due à une exposition prolongée à la midostaurine (PKC412) dans des lignées cellulaires (Weisberg, 2011). Une autre cytokine, le FGF2 (fibroblast growth factor 2), a été retrouvée sécrétée par les cellules stromales du microenvironnement à la suite d'un traitement à l'AC220 et procurant une résistance des cellules (Traer, 2016).

## 8. FLT3-ITD, un récepteur délocalisé

Les récepteurs cellulaires sont modifiés après leur synthèse par glycosylation dans le réticulum endoplasmique (RE) puis transférés dans l'appareil de Golgi où ils finiront leur maturation. Ce processus, appelé maturation de la glycoprotéine, est couplé à un contrôle qualité rigoureux dans le RE. Certaines mutations qui affectent les récepteurs cellulaires peuvent impacter ces contrôles qualité. Des évidences expérimentales suggèrent que le récepteur FLT3-ITD est séquestré au niveau du RE. En effet, la forme sauvage du récepteur FLT3 est exprimée sous sa forme mature glycosylée de 150 kDa au niveau de la membrane plasmique alors que le récepteur muté est majoritairement exprimé sous sa forme immature de 130 kDa riche en mannose au niveau des compartiments intracellulaires, ce qui peut être causé par une maturation inefficace de FLT3-ITD (Koch, 2008; Schmidt-Arras, 2005). L'activation constitutive de FLT3 par des mutations gains de fonctions peut exploiter les compartiments cellulaires pour induire des cascades de signalisations aberrantes et ainsi échapper aux régulations négatives (Choudhary, 2009).

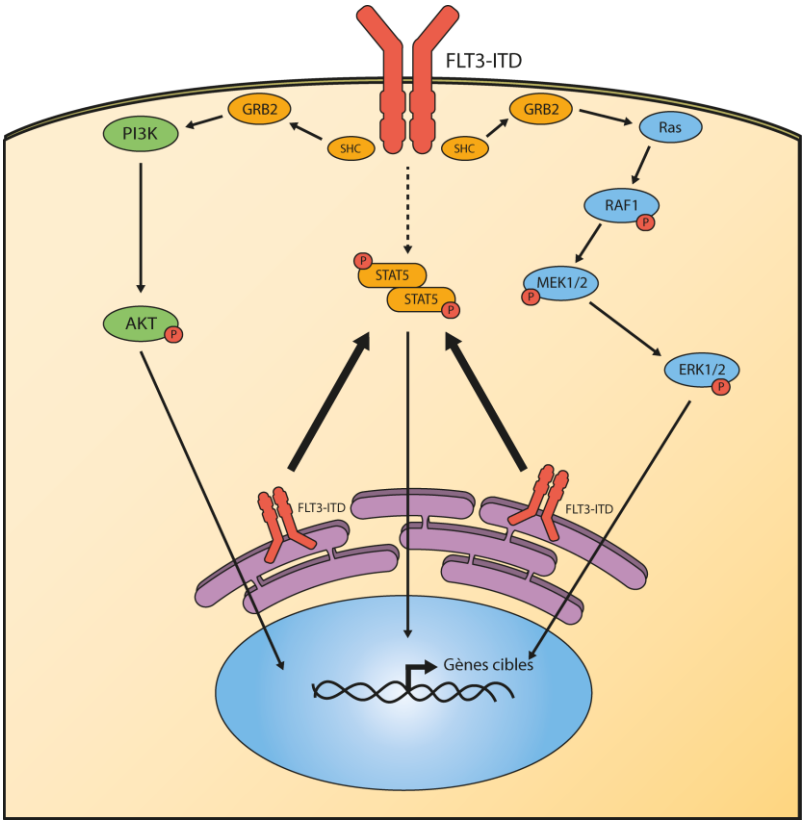



**Figure 12 : FLT3-ITD est un récepteur délocalisé au niveau du réticulum endoplasmique.**

La séquestration de FLT3-ITD au niveau du RE est essentielle à l'activation de la voie STAT5. En effet, le récepteur FLT3-ITD active STAT5 (et PIM-1) mais n'active pas les voies PI3K et MAPK lorsqu'il est retrouvé au niveau du RE. Inversement, la localisation à la surface de FLT3-ITD n'induit pas la voie STAT5 mais induit fortement les voies PI3K et MAPK (Choudhary, 2009). Contrairement à FLT3-ITD, l'expression intracellulaire de FLT3-TKD conduit à la suppression de son activité de transformation, ce qui suggère que les mécanismes moléculaires sont différents pour la signalisation mutagène par rapport à FLT3-ITD (Schmidt-Arras, 2005), mais explique aussi pourquoi la transformation FLT3-ITD dépend de STAT5.

Comme décrit précédemment, la mutation FLT3-ITD altère l'oligomérisation du récepteur induisant sa séquestration au niveau du RE. Le récepteur muté ne peut donc plus se diriger vers la membrane plasmique et il s'accumule dans la lumière du RE. L'activation oncogénique de FLT3-ITD peut donc engendrer un stress du RE dont la réponse est appelée réponse intégrée au stress ou ISR (integrated stress response). De plus, l'induction de la réponse ISR par le RE peut être cytoprotectrice et donc promouvoir la leucémogénèse dépendante de FLT3-ITD.

# III. La réponse intégrée aux stress

## A. Le stress du réticulum endoplasmique

### 1. Le réticulum endoplasmique

#### *a) Structure du RE*

Le réticulum endoplasmique (RE) est un organite intracellulaire majeur des cellules eucaryotes. Il représente à lui seul plus de la moitié des membranes cellulaires et sa taille varie d'une cellule à l'autre selon l'activité et les besoins de la cellule en protéines. Le RE est un réseau membranaire étendu dans la continuité de la membrane nucléaire et sa lumière constitue un environnement favorable à la synthèse, aux modifications, au repliement et à la maturation des protéines. Le RE peut être classé en deux groupes visuellement et fonctionnellement différents, le réticulum endoplasmique rugueux (RER) et le réticulum endoplasmique lisse (REL). Le RER est défini par la présence de ribosomes liés à la surface des membranes du RE et est responsable de la synthèse, du repliement et des modifications post-traductionnelles des protéines. L'absence de ribosomes définit le REL qui est responsable de la synthèse des lipides et des stérols. Le RER et le REL partagent une membrane continue mais sont séparés spatialement dans la cellule. En effet, le RER est principalement localisé dans la continuité du noyau et le REL est éloigné.

#### *b) Une fonction de contrôle qualité*

Les protéines nouvellement synthétisées subissent différentes modifications post-traductionnelles dans le RE pour être, à terme, transportées vers l'appareil de Golgi, où elles achèveront leur maturation et seront distribuées vers les différents compartiments cellulaires. Avant d'être transportées vers l'appareil de Golgi, les protéines sont soumises à des contrôles de qualité stricts qui vont s'assurer du bon repliement et de la conformation correcte des protéines. Si ces contrôles sont un succès, les protéines nouvellement synthétisées pourront être transportées vers leur destination finale alors que les protéines incorrectement repliées ou modifiées seront séquestrées dans la lumière du RE pour y être dégradées (Ellgaard, 2003, Araki, 2011). Cela implique la reconnaissance sélective du substrat à dégrader, l'utilisation d'un système d'exportation vers le cytosol et la dégradation par le protéasome. Cette série d'évènements est appelée ERAD (ER-associated degradation) (Hegde, 2010, Healy, 2009).

### 2. Le stress du réticulum endoplasmique

Une accumulation excessive de protéines incorrectement repliées ou modifiées va engendrer un stress du RE. Les effets du stress du RE ne sont pas localisés uniquement dans le RE, mais se propagent à l'ensemble de la cellule car les protéines fonctionnelles requises ne sont pas produites. La réponse à ce stress, appelée réponse UPR (unfolded protein response), est donc un mécanisme de pro-survie qui vise à diminuer le taux de protéines mal repliées et à restaurer une homéostasie intracellulaire. Cependant, si la

cellule n'arrive pas à corriger ce stress, elle va entrer en apoptose afin de minimiser les risques d'endommagement des cellules environnantes par la nécrose mais aussi d'éviter de transmettre les défauts génétiques accumulés au sein des cellules filles. La réponse UPR est médiée par l'activation de trois senseurs transmembranaires du RE : la protéine IRE1 (inositol-requiring enzyme 1), le facteur de transcription ATF6 (activating transcription factor 6) et la protéine PERK (protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase) (Figure 12) (Schröder, 2005, Healy, 2009). A l'état physiologique, ces protéines sont maintenues dans un état inactif médié par la fixation de la protéine chaperonne Bip (Binding immunoglobulin protein), également appelée GRP78 (78 kDa glucose-regulated protein), au niveau de leur domaine luminal. L'accumulation de protéines mal conformées au sein du RE engendre la redirection de Bip vers ces protéines, ce qui libère et active les senseurs du RE et lance la réponse UPR. La protéine chaperonne BiP possède une affinité plus élevée pour les protéines mal conformées que pour les trois transducteurs. Ceci fait de lui un régulateur majeur de la réponse UPR (Luo, 2006).

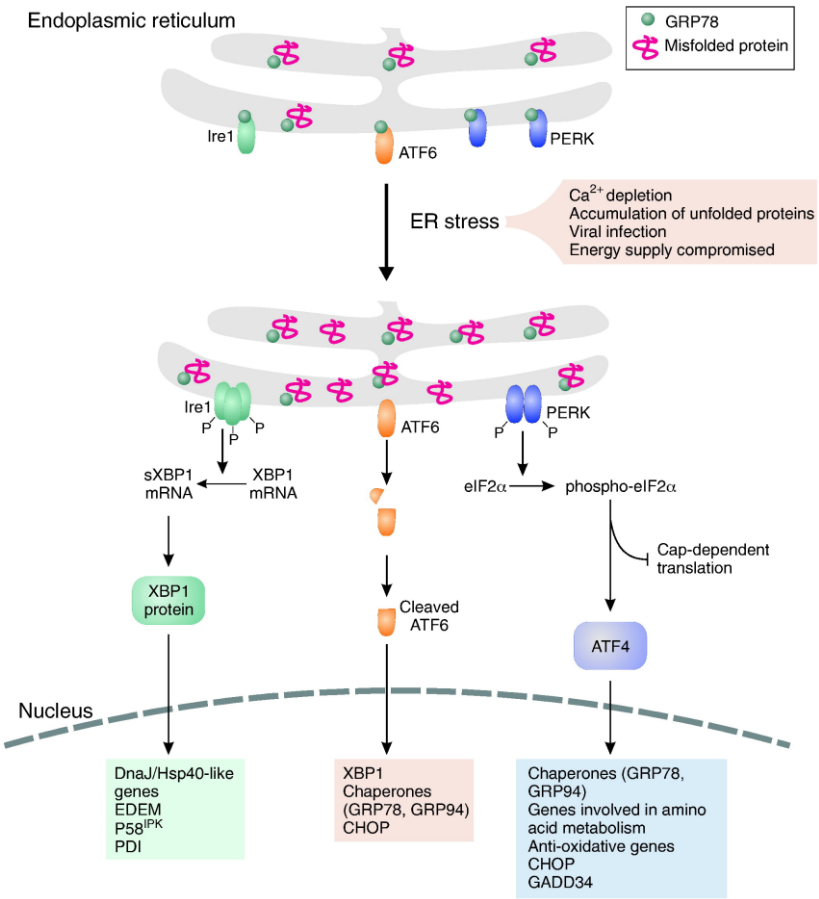



**Figure 13 : Représentation des trois voies de la réponse UPR.**

A l'état physiologique, GRP78/Bip se lie à IRE1, ATF6 et PERK alors que sous un stress du RE, GRP78/Bip va se fixer sur les protéines mal conformées libérant ainsi IRE1, ATF6 et PERK. IRE1 va s'oligomériser, s'autophosphoryler et activer XBP1 qui pourra activer des gènes de stress qui ont un rôle de chaperonne ou de dégradation. ATF6 va s'activer au niveau de l'appareil de Golgi et transloquer dans le noyau où il pourra permettre l'expression des gènes de stress comme XBP1. PERK va se dimériser, s'autophosphoryler et inactiver eIF2α par phosphorylation, menant à une inhibition de la traduction protéique cap dépendante et permettre ainsi la traduction

de protéine cap indépendante comme le facteur de transcription ATF4 et ainsi exprimer des gènes de stress impliqués notamment dans le processus d'autophagie (Healy, 2009).

### *a) IRE1*

IRE1 est une protéine transmembranaire du RE retrouvée sous forme monomérique liée avec Bip à l'état physiologique. Libérée lors d'un stress du RE, IRE1 se dimérise et s'autophosphoryle pour activer son domaine endonucléase. L'activité RNAse de IRE1 va épisser l'ARNm de XBP1 (X-box binding protein 1), qui peut alors être utilisé comme un marqueur du stress du RE (Brüning, 2011). L'épissage de XBP1 va permettre l'expression de la protéine XBP1s (spliced XBP1) qui est une protéine de survie et qui permet l'expression de protéines chaperonnes et d'acteurs du système ERAD. Cette protéine est régulée négativement par la protéine XBP1u (unspliced XBP1) qui cible la protéine XBP1 pour la dégrader par le protéasome (Yoshida, 2006). La signalisation en aval d'IRE1 est une signalisation de survie qui peut évoluer en une signalisation de mort *via* la protéine pro-apoptotique TRAF2 (tumour necrosis factor (TNF) associated factor 2). Ce facteur va activer la protéine JNK (C-Jun N-terminal kinase) qui va réguler positivement différentes protéines apoptotiques comme Bim et réguler négativement différentes protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 (Zhu, 2014).

### *b) ATF6*

A l'état physiologique, le facteur de transcription ATF6 est séquestré par Bip et la calréticuline. Lors d'un stress du RE, Bip va se fixer préférentiellement sur les protéines mal conformées, permettant ainsi la glycosylation d'ATF6, ce qui va interférer avec sa fixation à la calréticuline (Schröder, 2005). Une fois libéré, ATF6 va être transporté vers l'appareil de Golgi pour y être clivé puis transloqué dans le noyau où il pourra se fixer au promoteur de différents gènes de stress et permettre leur expression comme des protéines chaperonnes ou des protéines impliquées dans le système ERAD. De plus, ATF6 active la transcription de la protéine XBP1 (Jager, 2012).

### *c) PERK*

PERK est une protéine transmembranaire du RE qui est séquestrée par la protéine Bip et libérée lors d'un stress du RE. Ceci va permettre sa dimérisation puis son autophosphorylation. Une fois activé, le domaine cytosolique C-terminal de PERK phosphoryle eIF2α (eukaryotic initiation factor 2α), inhibant ainsi la synthèse protéique globale cap dépendante (Healy, 2009). Cette phosphorylation impacte sur de nombreuses fonctions cellulaires, comme la synthèse des protéines, l'expression des gènes, le trafic membranaire, l'autophagie et l'apoptose. Toutefois, en fonction du type cellulaire, les facteurs de stress et la phosphorylation d'eIF2α peuvent induire spécifiquement différentes fractions d'un programme d'expression génique global, qui ne sont pas toujours équivalentes et peuvent aboutir à des résultats physiologiques complètement différents. Ces différents programmes transcriptionnels sont connus comme la réponse intégrée au stress (ISR).

## B. La réponse intégrée au stress

La réponse intégrée au stress est une voie de signalisation qui est présente dans les cellules eucaryotes et qui est activée en réponse à différents changements physiologiques comme le stress du réticulum endoplasmique, l'hypoxie, les carences ou les infections virales (Harding, 1999, Harding, 2003, Rzymski, 2010). De plus, l'ISR peut être activée lors de l'activation d'oncogènes (Denoyelle, 2006, Hart, 2012). Le point commun de tous ces stress qui activent l'ISR correspond à la phosphorylation de la sous unité α du facteur eIF2 sur la sérine 51. Dans les cellules de mammifère, cette phosphorylation est assurée par une famille de quatre sérines/thréonines kinases qui sont activées par différents stimuli (Donnelly, 2013, Taniuchi, 2016). La phosphorylation d'eIF2α cause la diminution de la synthèse protéique globale avec la synthèse spécifique de certains gènes comme le facteur de transcription ATF4 (activating transcription factor 4), favorisant la survie et l'homéostasie cellulaire (Lu, 2004).

### 1. Les kinases de eIF2α

Les kinases d'eIF2α sont les premiers acteurs à réagir à la suite de différents stress cellulaires. Il existe quatre membres au sein de cette famille : PERK, PKR (double-stranded RNA-dependent protein kinase), GCN2 (general control nonderepressible 2) et HRI (heme-regulated eIF2a kinase). Ces quatre kinases partagent une forte homologie au sein de leur domaine kinase mais sont régulées de différentes manières. De plus, toutes ces kinases se dimérisent et s'autophosphorylent pour s'activer (Lavoie, 2014). Cependant, chaque kinase répond à des contraintes environnementales et physiologiques distinctes, qui reflètent leur mécanisme de régulation (Donnelly, 2013).

#### *a) La kinase PERK*

Comme décrit précédemment, la kinase PERK est une protéine transmembranaire localisée au niveau du RE où son domaine luminal est normalement lié avec la protéine chaperonne Bip. Deux mécanismes d'activation de PERK ont été décrits à la suite d'un stress du RE. Le mécanisme le plus connu correspond à l'accumulation de protéines mal conformées dans la lumière du RE qui va mener à la dissociation de la protéine PERK avec la chaperonne Bip et donc à son activation (Carrara, 2015). De récentes études ont décrit un deuxième mécanisme d'activation de PERK, suggérant une fixation directe des protéines mal conformées sur le domaine luminal de PERK (Gardner, 2011). Ceci est supporté par l'étroite homologie du domaine luminal de PERK avec un autre senseur de la réponse au stress du RE, IRE1 (Gardner, 2011). L'activation de PERK a également été observée en réponse à une carence en glucose dans des cellules neurales et pancréatiques (de la Cadena, 2014). De plus, PERK est souvent retrouvée activée dans les cellules cancéreuses. En effet, une amplification de Ras dans le mélanome et une augmentation de l'oncogène myc induisent la voie PERK/eIF2α/ATF4 permettant ainsi la tumorigénèse (Denoyelle, 2006, Hart, 2012).

### b) La kinase PKR

La protéine PKR est la kinase d'eIF2α la mieux décrite en ce qui concerne sa structure et son mécanisme d'activation. Comparée à la kinase PERK, PKR est localisée dans le cytoplasme et le noyau. Sa régulation se fait au niveau de sa région N-terminale qui contient un domaine de fixation à l'ARN double brin (double-stranded RNA binding domain). La région C-terminale de la protéine contient quant à elle le domaine de dimérisation et le domaine catalytique de la protéine. La présence d'ARN double brin viral permet donc l'activation de la kinase menant à l'inhibition de la synthèse des protéines virales *via* l'inhibition d'eIF2α (Balachandran, 2000). D'autres stress cellulaires peuvent activer PKR comme le stress oxydatif ou le stress du RE (Shimazawa, 2006) et la carence en facteur de croissance (Williams, 1999).

### c) La kinase GCN2

La kinase GCN2 est une protéine très conservée qui a largement été étudiée dans la levure (Castilho, 2014). GCN2 est activée en réponse à une carence en acides aminés via la fixation de l'ARNt (deacylated transfer RNAs) avec son domaine de fixation à l'ARNt (histidyl-tRNA synthetase-related domain). Comme les autres kinases d'eIF2α, la dimérisation de GCN2 est l'étape clé de l'activation de la kinase, permettant son autophosphorylation (Narasimhan, 2004). L'activation de GCN2 a également été décrite en réponse à une carence de glucose due à la consommation indirecte d'acides aminés (Ye, 2010).

### d) La kinase HRI

Contrairement aux autres kinases d'eIF2α qui sont des protéines ubiquitaires, HRI est une protéine qui est principalement exprimée dans les érythrocytes où elle est impliquée dans la différenciation érythroïde (Han, 2001). Comme les autres membres de la famille des kinases d'eIF2α, l'activation de HRI a besoin de la dimérisation de la protéine permettant son autophosphorylation (Rafie-Kolpin, 2003). La régulation de l'activité kinase de HRI est médiée par ses deux domaines de fixation aux hèmes qui sont localisés au niveau de sa région N-terminale.

## 2. Le facteur de la traduction eIF2

### a) Structure

Le facteur eIF2 est une protéine multimérique composée de trois sous-unités distinctes α, β et γ. Le séquençage de chaque sous unité a permis de montrer une forte homologie entre les espèces, suggérant un haut niveau de conservation au cours de l'évolution. Par exemple, les séquences des sous-unités humaines eIF2α, eIF2β et eIF2γ sont respectivement homologues à 58%, 47% et 72% avec les sous-unités d'eIF2 de la levure *S. cerevisiae.* La conservation entre les espèces suggère un rôle important d'eIF2 dans la survie cellulaire (Kimball, 1999).

La sous-unité eIF2α est la sous-unité régulatrice d'eIF2. Elle possède en position sérine 51 un site de phosphorylation menant à l'inhibition du complexe par les kinases PERK, PKR, GCN2 et HRI. La sous-unité eIF2β est celle qui permet l'association du complexe avec le facteur eIF2B et avec l'ARNt initiateur de la traduction, Met-ARNti (Kimball, 1998). La sous-unité eIF2γ possède le site de fixation au GDP (Gaspar, 1994).

### *b) Fonction biologique du complexe eIF2*

A l'état physiologique, le complexe eIF2 joue un rôle clé dans l'initiation de traduction et la reconnaissance du codon initiateur AUG (Figure 13). L'initiation de la traduction commence par le recrutement de l'ARNt initiateur-méthionine (Met-ARNti) et d'une molécule de GTP (guanosine triphosphate) par le facteur d'initiation eIF2, formant ainsi un complexe ternaire eIF2-GTP-MetARNti (Jackson, 2010). Ce dernier va alors interagir avec les facteurs eIF5 et eIF3, préalablement fixés à la sous-unité 40S du ribosome, pour former le complexe 43S (Das, 1997). Le facteur eIF3 stabilise la sous-unité 40S du ribosome et empêche sa réassociation avec la sous-unité 60S car cela aboutirait à la formation de ribosomes 80S monomères inactifs. Le complexe 43S se fixe alors à l'ARNm et forme le complexe de pré-initiation (ou 48S), grâce à eIF4F qui joue le rôle d'adaptateur entre la coiffe et la petite sous-unité 40S. L'holoenzyme eIF4F est composé des trois facteurs protéiques eIF4E, eIF4A et eIF4G qui ont chacun une fonction propre. Le facteur eIF4E est une phosphoprotéine qui reconnaît la coiffe méthylée et s'y attache, eIF4A est une hélicase à ARN et eIF4G contient plusieurs sites de liaison à des facteurs eIF comme eIF3. L'interaction entre eIF4G et eIF3 va stabiliser le complexe menant à sa migration vers le codon AUG (Aitken, 2012, Lomakin, 2013). Lors de la fixation de l'anticodon de l'ARNt initiateur-méthionine sur le codon AUG, eIF1 se dissocie du complexe et le GTP d'eIF2 est hydrolysé par le facteur eIF5. Ceci mène à la dissociation du complexe eIF2-GDP de la sous-unité 40S du ribosome et à son recyclage pour pouvoir faire un autre tour pour une initiation de traduction. Le complexe eIF2 est recyclé par le facteur eIF2B qui va échanger le GDP (guanosine diphosphate) par du GTP pour que le complexe eIF2 soit de nouveau sous sa forme active.

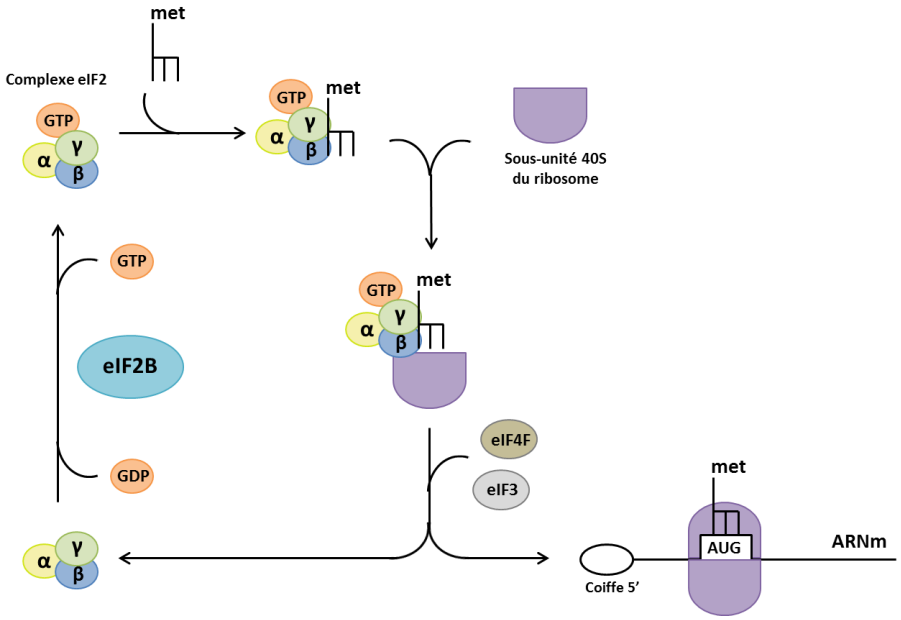



**Figure 14 : Représentation du rôle du complexe eIF2 dans l'initiation de la traduction.**
(adapté de Kimball, 1999).

### *c) La phosphorylation du facteur eIF2α*

Le complexe eIF2 peut être régulé négativement lors d'un stress par phosphorylation du facteur eIF2α sur sa sérine 51. La mutation homozygote sur ce site de phosphorylation empêche la phosphorylation du facteur eIF2α et permet la synthèse protéique normale même lors d'un stress ou d'une carence en glucose (Scheuner, 2001). De plus, les modèles murins ayant une mutation homozygote de la phosphorylation en sérine 51 meurent peu de temps après la naissance suite à une hypoglycémie sévère (Back, 2009). Ces données suggèrent que la phosphorylation d'eIF2α est cruciale pour maintenir une fonction physiologique appropriée du foie et du pancréas après la naissance, car la phosphorylation d'eIF2α est nécessaire pour l'induction d'enzymes gluconogènes (Scheuner, 2001, Back, 2009).

### *d) Le facteur eIF2α en réponse à l'ISR*

En réponse à l'activation de l'ISR, la phosphorylation d'eIF2α sur sa sérine 51 bloque l'échange du GDP par le GTP médié par le facteur eIF2B, inhibant ainsi la formation du complexe ternaire eIF2-GTP-MetARNti. Ceci empêche donc la synthèse protéique globale coiffe dépendante et permet la traduction sélective d'ARNm contenant un uORF (upstream open reading frame) dans leur région 5'. Ces ARNm n'ont pas besoin d'une reconnaissance de la coiffe par le complexe eIF4F mais leur traduction repose le recrutement direct des ribosomes sur un IRES (internal ribosome entry sites) (Lee, 2009, Palam, 2011). L'une des protéines traduites de cette façon est le facteur de transcription ATF4 (activating transcription factor 4) qui est un facteur clé de la réponse ISR (Chan, 2013).

## C. Le modulateur de l'ISR, la protéine ATF4

### 1. Structure de la protéine ATF4

Le gène *ATF4* est localisé sur le chromosome 22q13.1 et l'ARNm humain de la protéine ATF4 est constitué de trois uORF (short open reading frame) dans la région 5'UTR suivis de la séquence codante de la protéine (Harding, 2000). Cette séquence code pour une protéine de 351 acides aminés qui correspond à un facteur de transciption bZip (basic region-leucine zipper). Ce facteur appartient à la famille des facteurs de transcription ATF/CREB (activating transcription factor/cyclic AMP (adénosine mono phosphate) response element binding protein) (Ameri, 2008). Il possède différents domaines impliqués dans l'homo/hétérodimérisation d'ATF4, la liaison à l'ADN ou la régulation de la stabilité de la protéine. C'est une protéine hautement régulée au niveau de la transcription, de la traduction et sa capacité à interagir avec d'autres protéines fournit un autre niveau de régulation.

### 2. Régulation d'ATF4

#### *a) Régulation transcriptionnelle d'ATF4*

En absence de stress cellulaire, le niveau de l'ARNm d'ATF4 est relativement bas (Jackson, 2010). La transcription du gène *ATF4* est induite en réponse à différents stress cellulaires et est médiée par différents facteurs de transcription (Dey, 2010). Par exemple, le facteur NRF2 (nuclear factor-like 2) induit la transcription du gène *ATF4* en réponse à un stress oxydatif (Afonyushkin, 2010), les facteurs TFEB (Transcription factor EB) et TFE3 (Transcription factor E3) en réponse à un stress du RE ou à une carence (Martina, 2016) et le facteur PDX1 (pancreatic and duodenal homeobox 1) en réponse à un stress du RE (Sachdeva, 2009). En revanche, l'hypoxie n'induit pas une élévation de la transcription d'*ATF4* mais augmente le niveau de la protéine via une régulation traductionnelle et post-traductionnelle (Blais, 2004). De plus, des évidences expérimentales ont montré une diminution des transcrits d'*ATF4* par des répresseurs comme C/EBPβ lors d'une irradiation aux UV (Dey, 2012, Collier, 2015).

#### *b) Régulation traductionnelle d'ATF4*

La régulation traductionnelle est le principal mécanisme qui ajuste le niveau d'ATF4 en réponse à différents stress cellulaires comme le stress du RE, l'hypoxie ou le stress oxydatif. Ce mécanisme de régulation est très conservé chez la levure avec la régulation de Gcn4p (l'homologue fonctionnel d'ATF4 chez la levure). Alors que la levure ne possède pas la kinase PERK, l'inhibition globale de la traduction est assurée par l'activation de Gcn2p (l'homologue fonctionnel de GCN2 chez la levure) et la phosphorylation d'eIF2α (Hinnebusch, 2002, Hinnebusch, 2005). La régulation traductionnelle de *GCN4* nécessite quatre uORFs. En absence de phosphorylation d'eIF2α, le complexe ternaire eIF2-GTP-MetARNti est abondant. Les ribosomes traduisent uORF1 en 5' et scannent l'ARNm de *GCN4* en réinitialisant efficacement la traduction en aval de l'uORF2, de l'uORF3 et de l'uORF4. L'uORF4 inhibiteur chevauche le codon de départ de la CDS (coding séquence) de *GCN4* et, par conséquent, la

traduction de Gcn4p est empêchée à cause du codon STOP de l'uORF4. Dans les conditions de stress où la phosphorylation d'eIF2α augmente, la disponibilité d'eIF2-GTP est réduite et les ribosomes prennent plus de temps pour scanner l'ARNm de *GCN4* et pour réinitialiser correctement la traduction. Ceci permet donc aux ribosomes de contourner l'uORF4 inhibiteur et à réinitialiser la traduction au niveau de la CDS de *GCN4* (Hinnebusch, 1994).

Chez l'homme, le mécanisme de régulation traductionnelle d'ATF4 fait intervenir deux uORFs au niveau de la région 5' UTR de l'ARNm d'ATF4. En absence de phosphorylation d'eIF2α, le complexe ternaire eIF2-GTP-MetARNti est abondant. Les ribosomes traduisent uORF1 en 5' et scannent l'ARNm de *ATF4* en réinitialisant efficacement la traduction en aval de l'uORF2 (Vattem, 2004, Lu, 2004). La séquence de l'élément inhibiteur uORF2 chevauche le codon de départ de la CDS d'*ATF4* et, par conséquent, la traduction d'ATF4 est empêchée à cause du codon STOP de l'uORF2. Dans les conditions de stress où la phosphorylation d'eIF2α augmente, la disponibilité d'eIF2-GTP est réduite et les ribosomes prennent plus de temps pour scanner l'ARNm d'*ATF4* et pour réinitialiser correctement la traduction. Ceci permet donc aux ribosomes de contourner l'uORF2 inhibiteur et à réinitialiser la traduction au niveau de la CDS d'*ATF4* (Figure 14).

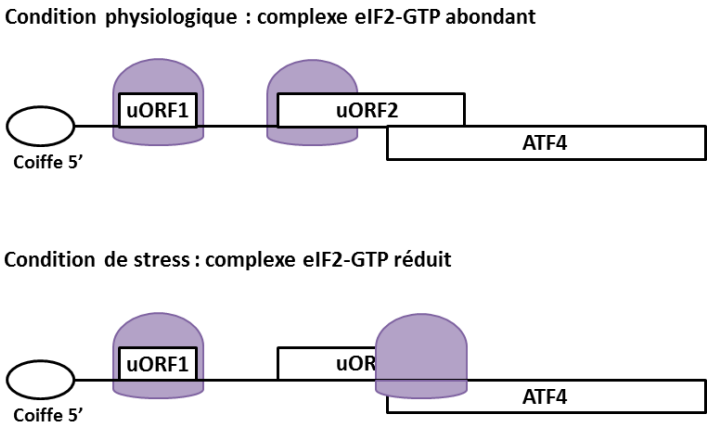



**Figure 15 : Régulation traductionnelle d'ATF4.**

L'ARNm d'ATF4 représenté sous forme de ligne est constitué de deux uORFs (1 et 2) et de la CDS d'ATF4 illustrés sous forme de boîtes. Les ribosomes associés au complexe eIF2-GTP-MetARNti sont représentés en violet. La phosphorylation d'eIF2α réduit la disponibilité d'eIF2-GTP et favorise le « bypass » de l'uORF2 inhibiteur permettant ainsi la traduction d'ATF4 en présence d'un stress cellulaire (adapté de Vattem, 2004).

Un autre mécanisme de traduction d'ATF4 impliquant le facteur de la traduction eIF6 a récemment été décrit dans un modèle murin de diabète. En effet, il a été décrit que la phosphorylation d'eIF6 sur sa sérine 235 facilite la traduction d'ARNm possédant une région riche en G/C ou des séquences uORFs en 5'UTR ce qui est le cas d'ATF4 (Brina, 2015). Le facteur eIF6 est nécessaire à la maturation de la sous-unité 60S du ribosome et est impliqué dans l'initiation de la traduction (Ceci, 2003). La fonction

principale d'eIF6 est de réguler l'association des sous-unités 40S et 60S du ribosome. Ceci est modulé par le complexe RACK1-PKC. La kinase PKC est recrutée au niveau de la sous-unité 40S par RACK1 et phosphoryle eIF6 sur sa sérine 235, libérant la sous-unité 60S et activant ainsi la traduction (Miluzio, 2009, Miluzio, 2016) (Figure 15).

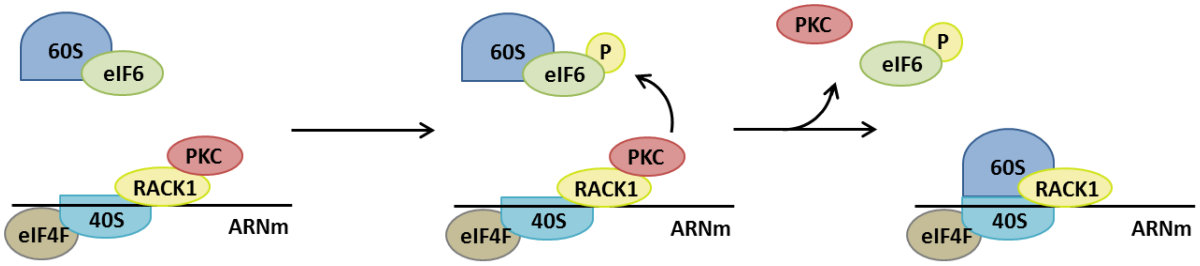



**Figure 16 : Régulation de l'association de la sous-unité du ribosome par eIF6.**

Le facteur eIF6 séquestre la sous-unité 60S du ribosome, l'empêchant de s'associer à la petite sous-unité 40S et d'initier la traduction. La phosphorylation du facteur eIF6 par le complexe RACK1-PKC libère la sous-unité 60S, lui permettant de s'associer à la petite sous-unité 40S (adapté de Miluzio, 2009).

### *c) Régulation post-traductionnelle d'ATF4*

Le facteur de transcription ATF4 est une protéine relativement instable avec une demi-vie d'environ 30 min dans des conditions normales. Différentes modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation ou l'ubiquitinylation régulent la stabilité d'ATF4. L'ubiquitinylation d'ATF4 est responsable de la dégradation de la protéine par la voie du protéasome (Lassot, 2001). Les inhibiteurs du protéasome comme le bortézomib ou le MG132 augmentent le niveau protéique d'ATF4 du à l'inhibition de sa dégradation mais aussi dû à l'activation de l'ISR (Milani, 2009, Suraweera, 2012). La phosphorylation d'ATF4 sur sa sérine 219 est essentielle pour son interaction et son ubiquitinylation par le complexe $SCF^{\beta TRCP}$ (SCF (F-box containing complex) E3 ubiquitin ligase complexe) ainsi que sa dégradation par le protéasome (Lassot, 2001). En plus des phosphorylations et ubiquitinylations, la stabilité d'ATF4 peut être régulée négativement par une hydroxylation sur des résidus proline. La protéine PDH3 (prolyl hydroxylase domain protein 3) est responsable de cette hydroxylation qui peut être régulée négativement par les ubiquitine ligases Siah 1 et 2 (Scortegagna, 2014).

L'activité transcriptionnelle d'ATF4 peut également être activée par phosphorylation. C'est le cas de la phosphorylation sur sa sérine 245 par RSK2 (ribosomal protein S6 kinase α-2), ou sur sa sérine 254 par PKA (protéine kinase A). Ces phosphorylations ont été décrites pour augmenter l'activité d'ATF4 dans la différenciation des ostéoblastes (Elefteriou, 2005). L'activité d'ATF4 peut également être activée par l'association directe avec EP300 (Histone acetyltransferase p300) qui empêche l'ubiquitinylation d'ATF4 (Lassot, 2005, Chérasse, 2007).

## 3. Fonctions d'ATF4

### *a) Apport des modèles murins*

ATF4 joue un rôle essentiel dans l'homéostasie et le développement cellulaire. L'utilisation de modèles murins *ATF4*$^{-/-}$ a permis de mettre en évidence un rôle de la protéine dans l'hématopoïèse du foie fœtal (Masuoka, 2002), le développement des os (Yang, 2004) et la formation de la lentille l'œil chez l'embryon (Hettmann, 2000). Ces souris KO sont plus petites, plus maigres et plus légères. La diminution de masse graisseuse dans ces souris est causée par une consommation accrue des graisses et une inhibition de la synthèse des acides gras, suggérant un rôle d'ATF4 dans le métabolisme lipidique ce qui est également le cas pour eIF6 (Wang, 2010, Brina, 2015). Les souris ATF4$^{-/-}$ ont également permis de mettre en évidence un rôle physiologique d'ATF4 dans la régulation thermique car ces souris présentent des augmentations de température corporelle en réponse au froid. En effet, ATF4 régule négativement PGC1α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α), qui contrôle l'homéostasie et le métabolisme énergétique (Wang, 2013). ATF4 est un médiateur essentiel de la faiblesse musculaire et de l'atrophie des muscles vieillissants car l'invalidation de la protéine améliore la force et la masse des muscles de la souris (Ebert, 2015). Bien que le rôle de l'ATF4 dans les fonctions neuronales soit un peu controversé, le KO ciblé d'ATF4 dans l'hippocampe de la souris indique qu'il est nécessaire pour la formation de la mémoire et la plasticité neuronale (capacité du cerveau à remodeler ses connexions en fonction de stimuli) (Costa-Mattioli, 2005). En effet, la protéine ATF4 régule Cdc42, une petite GTPase de famille Rho, qui est impliquée dans la régulation du cytosquelette d'actine (Pasini, 2015).

### *b) ATF4 un acteur clé de l'autophagie*

En condition de stress, l'expression augmentée d'ATF4 facilite la transcription de différents gènes de stress. La protéine ATF4 cible spécifiquement la transcription de gènes qui possèdent une séquence CARE (C/EBP-ATF response element) en réponse à différents stimuli (Fawcett, 1999). Parmi les nombreux gènes présentant une séquence CARE, on retrouve les gènes de l'ASNS (asparagine synthase), TRB3 (tribbles 3), ATF3 (activating transcription factor 3), SNAT2 (System A neutral amino acid transporter 2), 4EBP1 (eukaryotic initiation factor 4$^{E}$ binding protein 1) et CHOP (C/EBP homology protein) (Kilberg, 2009). Lors de carences en acides aminés, ces séquences fonctionnent comme des séquences AARE (amino acid response element) et ATF4 est le seul facteur de transcription connu pour se fixer à toutes les séquences AARE (Siu, 2002). ATF4 peut également former des homodimères ou des hétérodimères avec d'autres facteurs de transcription bZip comme CHOP (Siu, 2002). De récentes études ont montré qu'ATF4 avec la présence ou non de CHOP est responsable de la transcription de différents gènes clés nécessaire à une voie majeure du catabolisme lysosomique, l'autophagie (Rouschop, 2010, B'Chir, 2013).

# IV. L'autophagie

## A. Généralités sur l'autophagie

L'autophagie est un processus cellulaire catabolique conservé au cours de l'évolution des eucaryotes utilisé par les cellules pour dégrader et recycler du matériel cellulaire. Le mot 'autophagie' signifie littéralement « se manger soi-même », et se réfère à la dégradation se déroulant à l'intérieur des lysosomes. Les produits de dégradation comme les acides aminés sont alors transférés du lysosome dans le cytoplasme et peuvent ainsi être utilisés par la cellule pour maintenir l'homéostasie intracellulaire. Le mécanisme d'autophagie fut découvert dans les années 1950s par l'équipe pionnière dans le domaine de la microscopie électronique, de Keith Porter (Klionsky, 2008). Il a observé des vésicules intracellulaires ressemblant à des lysosomes près du noyau qui étaient considérablement augmentées lors de carences. De plus, la majorité de ces vésicules contenaient des mitochondries et autres compartiments cytoplasmiques. Mais le mot autophagie fut utilisé pour la première fois en 1963 lors d'une conférence sur les lysosomes par le prix Nobel Christian de Duve.

Depuis trois types d'autophagie ont été décrits dans les cellules de mammifères : la micro-autophagie, l'autophagie médiée par les chaperonnes et la macro-autophagie. Toutes ces voies autophagiques convergent à la dégradation de matériel cellulaire au niveau des lysosomes (Figure 16).

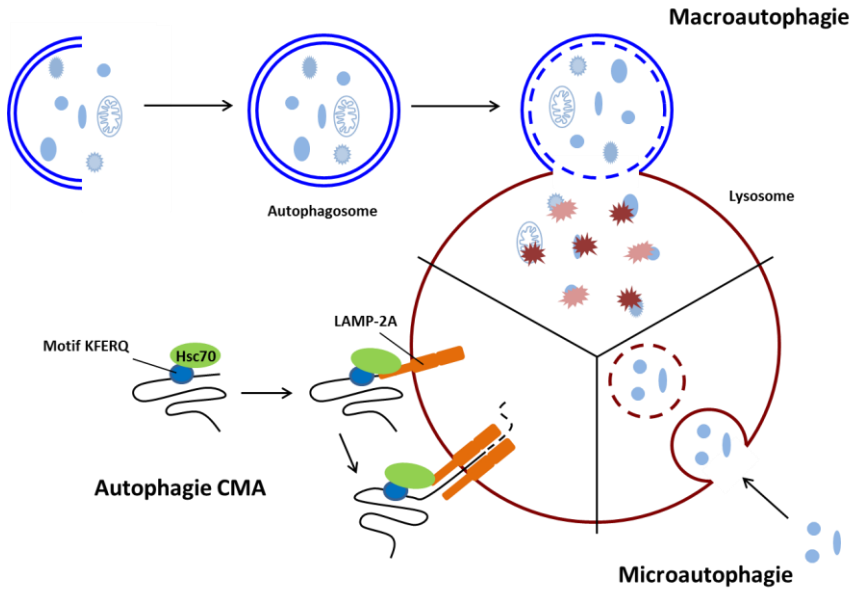



**Figure 17 : Représentation des trois types d'autophagies connues.**

La macroautophagie permet le recyclage des composants cellulaires grâce à la formation d'un autophagosome. Lors de la microautophagie, les composants à dégrader sont internalisés directement dans le lysosome. L'autophagie CMA (chaperone-mediated autophagy) permet de dégrader spécifiquement les protéines ayant un motif KFERQ dans leur séquence. Ce motif est reconnu par la chaperonne Hsc70 qui permet d'amener la protéine au lysosome pour la dégrader.

### 1. La micro-autophagie

Ce type d'autophagie est principalement décrit dans des cellules eucaryotes inférieures (les levures). Ce processus catabolique correspond à l'internalisation directe par le lysosome de portions cytoplasmiques et d'organites (ex : peroxysomes, mitochondries) où ils seront dégradés (Marzella, 1981, Sakai, 1998, Cuervo, 2004). Le déroulement de la micro-autophagie consiste en une invagination de la membrane lysosomale et de la formation d'une vésicule à l'intérieur de la lumière vacuolaire, grâce à laquelle des portions cytoplasmiques sont internalisées (Mijaljica, 2011, Li, 2012).

### 2. L'autophagie dépendante des chaperonnes

L'autophagie dépendante des chaperonnes, ou CMA (chaperone mediated autophagy), est un mécanisme de dégradation protéique spécifique. Le principe de la CMA est basé sur la reconnaissance d'un motif consensus composé de cinq acides aminés, le motif KFERQ, par une protéine chaperonne constitutive : Hsc70 (Heat Shock Cognate protein of 70 kDa) (Agarraberes et Dice, 2001). Une fois liée à la protéine « cible », Hsc70 forme un complexe avec d'autres protéines chaperonnes (Hsp40, Hsp90, Hip, Hop, Bag1). Ce complexe est transloqué dans le lysosome où il va être dégradé grâce à une protéine particulière localisée sur la membrane lysosomale LAMP-2A, protéine issue de l'épissage alternatif du gène LAMP2 (Majeski et Dice, 2004).

### 3. La macro-autophagie

Il s'agit du mécanisme autophagique le plus étudié. La macro-autophagie est un processus extrêmement bien conservé de la levure aux protozoaires, des insectes aux mammifères en passant par les végétaux. En effet, on retrouvera chez tous ces organismes des acteurs protéiques, un déroulement et un mécanisme moléculaire similaires. L'autophagie apparaît à partir de membranes isolées (ou phagophore) qui vont englober une partie du cytoplasme et se réarranger de façon dynamique pour former une structure composée d'une double membrane, l'autophagosome (Juhasz, 2006). La formation de l'autophagosome est régulée par les protéines ATG (AuTophaGy-related) (Klionsky, 2003). Une trentaine de gènes ATG ont été identifiés chez la levure, dont 18 gènes orthologues ont été identifiés chez les eucaryotes supérieurs. A la fin du processus autophagique, l'autophagosome fusionne avec le lysosome pour former un autolysosome. Dans cet autolysosome, l'apport des enzymes lysosomales permet de dégrader le matériel cytoplasmique séquestré. En condition basale, l'autophagie est essentielle pour préserver l'homéostasie cellulaire. Elle permet l'élimination des protéines et organites malformés ou superflus et des agrégats protéiques et fournit un apport de constituants de base pour la synthèse protéique ou lipidique. Cependant, l'autophagie est un processus complexe qui peut aussi participer à la mort cellulaire et est impliquée dans de nombreuses pathologies humaines (Figure 17) (Joffre, 2017).

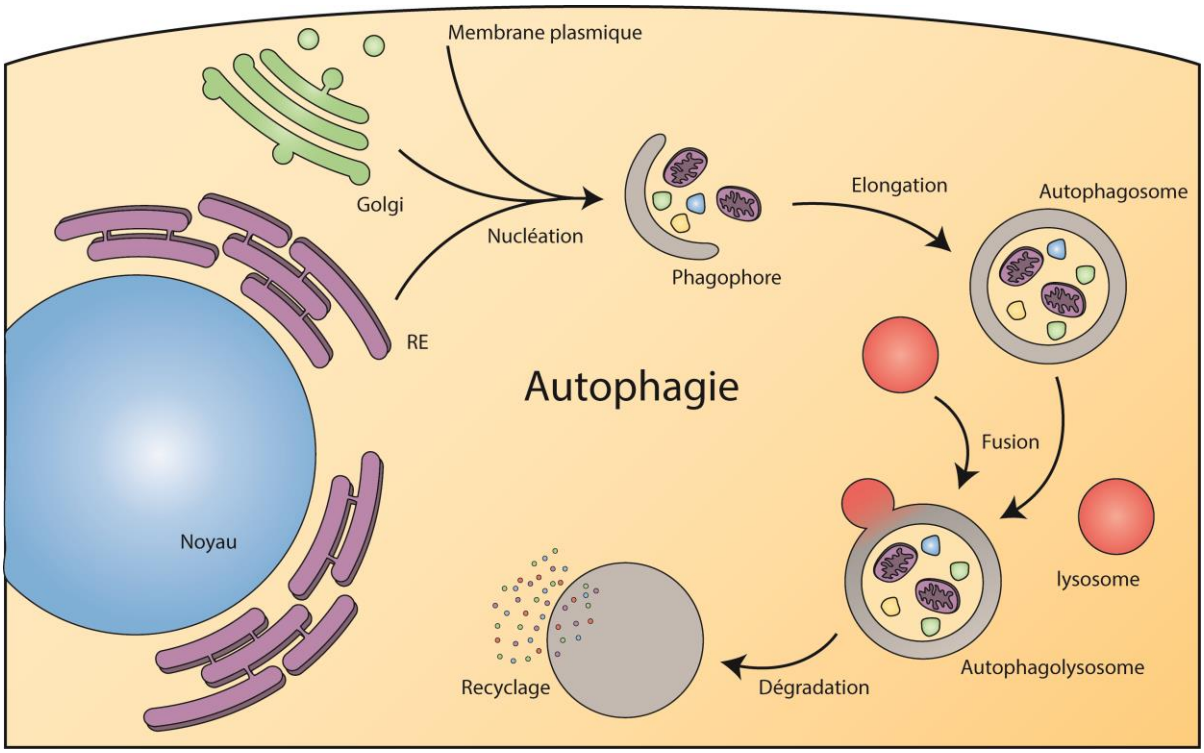



**Figure 18 : Mécanisme général de la macro-autophagie.**

L'autophagie débute avec la formation d'un phagophore à partir de membranes de compartiments cellulaires (étape de nucléation). Le phagophore, grâce aux différentes protéines ATG, va ensuite s'allonger pour former un autophagosome (étape d'élongation). L'autophagosome peut séquestrer des organites ou des protéines à recycler. L'autophagosome va finalement fusionner avec un lysosome pour dégrader le matériel séquestré et ainsi le recycler.

La suite du mémoire portera principalement sur le processus de macro-autophagie que je mentionnerai sous le terme d'autophagie.

## B. Machinerie moléculaire de l'autophagie

### 1. Les protéines ATG

Les autophagosomes sont observés par microscopie électronique dans des cellules de mammifères depuis les années 1950, alors que l'ère moléculaire de l'étude de l'autophagie n'a commencé qu'à partir des années 1990. Ces études ont débuté par des cribles génétiques chez la levure qui ont permis l'identification de 31 protéines clés de l'autophagie (Takeshige, 1992). Pour cette découverte, le professeur Yoshinori Ohsumi a reçu le prix Nobel de médecine en 2016. Afin de permettre une meilleure harmonisation de la nomenclature des gènes impliqués dans l'autophagie, le professeur Klionsky a proposé en 2003 le terme ATG (AuTophagy Related Gene). Chez la levure, différents ATG ont été décrits (Klionsky, 2003), et aujourd'hui, on en dénombre trente-cinq chez cet organisme (Nazarko, 2011). Pour la plupart d'entre eux, des homologues ont été décrits chez les mammifères (Mizushima, 1998, Kabeya, 2000, Codogno, 2004). L'autophagie est divisée en trois étapes distinctes : l'initiation, l'élongation et la maturation avec sa fusion avec les lysosomes. Différents ensembles de protéines ATG sont impliqués dans ces étapes et composent la machinerie moléculaire de l'autophagie (Tableau 4).

| | Levure | Mammifère | Fonction |
|---|---|---|---|
| **Etape d'initiation** | | | |
| **Complexe ULK** | ATG1 | ULK1/2 | Substrat de mTOR impliqué dans l'initiation de l'autophagie. |
| | ATG13 | ATG13 | Substrat d'ULK1/2 impliqué dans la modulation l'activité du complexe ULK. |
| | ATG17 | FIP200 | Substrat d'ULK1/2 impliqué dans la modulation de l'activité du complexe ULK. |
| | ATG11 | – | Recrute le complexe au niveau de la structure pré-autophagosomale. |
| | ATG29 | – | Recrute d'autres ATG au niveau de la structure pré-autophagosomale. |
| | ATG31 | – | Interagit avec ATG17 et ATG29. |
| | – | ATG101 | Interagit avec ULK1 et ATG13. |
| **Complexe PI3K de classe III** | VPS34 | PIK3C3 (VPS34) | Sous-unité catalytique du complexe PI3K. |
| | VPS15 | PIK3R4 (VPS15, p150) | Recrute le complexe PI3K au niveau des membranes. |
| | ATG6 (VPS30) | Beclin 1 | Sous-unité du complexe PI3K. |
| | ATG14 | ATG14 | Recrute le complexe PI3K au niveau de l'omégasome. |
| | VPS38 | UVRAG | Sous-unité du complexe PI3K. |
| | – | AMBRA 1 | Recrute le complexe au niveau du RE. |
| **Autres protéines** | ATG2 | ATG2 | Localisé au niveau de l'omégasome. |
| | ATG9 | ATG9 | Protéine membranaire. Interagit avec ATG2. |
| | ATG18 | WIPI1/2/3/4 | Localisé au niveau de l'omégasome. Se lie avec le PI3P. |
| | – | DFCP1 | Localisé au niveau de l'omégasome. Se lie avec le PI3P via son domaine FYVE. |
| | – | VMP1 | Protéine transmembranaire. Interagit avec Beclin 1. |
| **Etape d'élongation** | | | |
| **Système ATG12/ATG5** | ATG12 | ATG12 | Se conjugue avec ATG5, permettant l'activation d'ATG3. |
| | ATG7 | ATG7 | Enzyme ATP-dépendante *E1-like* permettant la conjugaison et l'activation d'ATG12 avec ATG5 et d'ATG8 avec le PE. |
| | ATG10 | ATG10 | Enzyme ATP-dépendante *E2-like* permettant la conjugaison d'ATG8 avec le PE. |
| | ATG5 | ATG5 | Se conjugue avec ATG12, permettant l'activation d'ATG3. |
| | ATG16 | ATG16L1/2 | Sous-unité du complexe ATG12-ATG5-ATG16 |
| **Système ATG8-PE** | ATG8 | LC3A/B/C, GABARAP | Protéine se conjuguant avec le PE. Composant essentiel de la membrane des autophagosomes. |
| | ATG4 | ATG4 | Protéase permettant le clivage du pré-ATG8 en ATG8 |
| | ATG7 | ATG7 | Enzyme ATP-dépendante *E1-like* permettant la conjugaison et l'activation d'ATG12 avec ATG5 et d'ATG8 avec le PE. |
| | ATG3 | ATG3 | Enzyme E2-like permettant la conjugaison de ATG8 avec le PE |

**Tableau 4 : Protéines clés impliquées dans la formation des autophagosomes chez la levure et les mammifères.**

(adapté de Mizushima, 2011).

## 2. Les étapes du processus autophagique

### *a) Origines des membranes des autophagosomes*

Au cours de la dernière décennie, un énorme effort a été fait pour essayer de comprendre comment se forment les autophagosomes. L'une des questions clés qui reste encore à être élucidée correspond à l'identité de la source des membranes qui composent les autophagosomes (Tooze, 2010, Mari, 2011). Le problème est que les phagophores, ainsi que les autophagosomes, peuvent être considérés comme des organites à part entière car ils ne possèdent aucun biomarqueur des autres compartiments cellulaires. Le premier organite proposé comme source de membrane aux autophagosomes a été le réticulum endoplasmique, suite à des études de microscopie électronique dans les années 1960s (Arstila, 1968, Ericsson, 1969). En 2010, le groupe du Dr. J. Lippincott-Schwartz propose la membrane externe des mitochondries comme source des bicouches lipidiques de l'autophagosome (Hailey, 2010, McEwan, 2010). En parallèle, le laboratoire Dr. D. Rubinztein a reporté que la membrane plasmique contribuait aussi directement à la formation de la membrane des autophagosomes (Ravikumar, 2010). Deux études supplémentaires ont permis d'émettre l'idée que l'appareil de Golgi pouvait également être une source de membranes autophagosomales grâce au complexe d'exocytose et des vésicules Golgiennes (Bodemann, 2011, Farre, 2011).

### *b) Initiation de l'autophagosome*

Le complexe autophagique d'initiation, directement régulé par quelques kinases comme TORC1 (TOR kinase complex 1) et AMPK (AMP-activated protein kinase), représente le noyau de la structure pré-autophagosomale (PAS) et fonctionne en amont de la machinerie autophagique (Noda, 2015, Lin, 2016). Tous les composants du noyau du PAS sont très conservés au cours de l'évolution. Chez les mammifères, l'initiation de l'autophagie nécessite le complexe ULK qui est composé de 4 protéines : ULK1/2 (Unc-51-Like kinase 1/2), FIP200 (FAK family kinase-interacting protein of 200kDa), ATG13 et ATG101 (Suzuki, 2017). En condition physiologique, le complexe ULK est inactif de par sa liaison et de sa phosphorylation par mTORC1 (Figure 18). En condition de carences, mTORC1 est inactivé et dissocié du complexe ULK, libérant ainsi l'activité d'ULK1 et ULK2. Ces dernières sont des sérine/thréonine kinases qui, activent, s'auto-phosphorylent et phosphorylent à leur tour les autres membres du complexe initiateur de l'autophagie Atg13 et FIP200 pour activer le complexe ULK. Le domaine carboxy-terminal (CTD) d'ULK1 et ULK2 permet de se lier aux membranes et ainsi de recruter le complexe ULK au niveau du site de l'initiation de l'autophagosome (Chan, 2009).

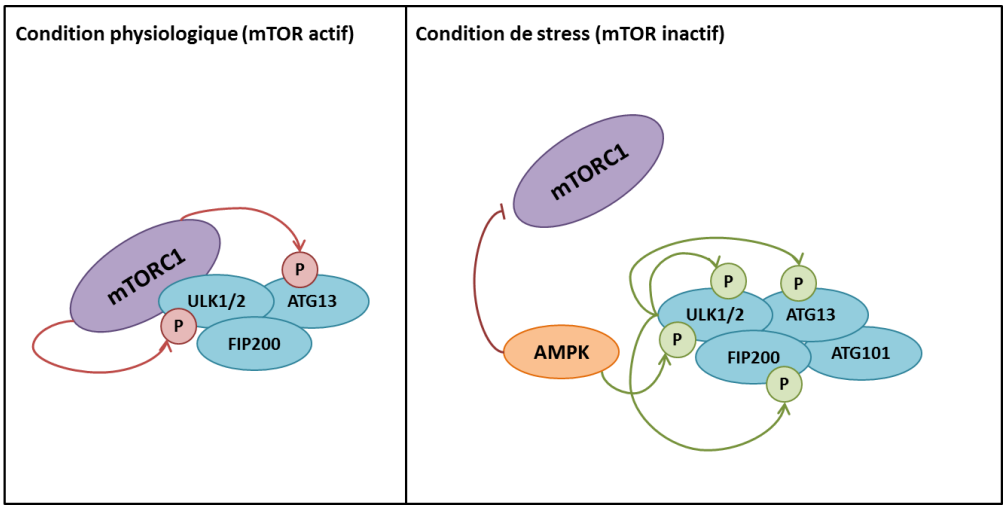



**Figure 19 : Représentation de la régulation du complexe ULK.**

En condition physiologique, mTORC1, actif, phosphoryle et séquestre le complexe ULK1-FIP200-ATG13-ATG101. Lors de carences, AMPK est activée et inhibe mTORC1. L'AMPK va aussi s'associer à ULK1 et l'activer par phosphorylation. ULK1 est une sérine/thréonine kinase qui, active, s'auto-phosphoryle et agit également sur les autres membres du complexe initiateur de l'autophagie Atg13 et FIP200.

### *c) Le complexe PI3K de classe III et omégasome*

Le complexe ULK peut ensuite recruter la protéine VPS34 (vacuolar protein sorting 34) au niveau du site d'initiation de l'autophagosome (ou complexe Beclin 1) (Russell, 2013). Chez les mammifères, VPS34 forme avec 4 autres protéines : Beclin 1, p150, ATG14 et AMBRA 1, un complexe appelé complexe PI3K de classe III. Ce dernier permet la production du phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) au niveau du site d'initiation de l'autophagosome (Dall'Armi, 2013). La formation de PI3P est indispensable à la poursuite du processus autophagique. En effet, ce lipide permet le recrutement de protéines se liant au PI3P de la famille des WIPI (WD repeat domain phodpoinositide-interacting protein 1) et de DFCP-1 (Double-FYVE-containing protéine 1) (Dall'Armi, 2013). DFCP1 a été identifiée comme un effecteur en aval du PI3P via son domaine FYVE. En condition de carences, la protéine DFCP1 est alors recrutée vers des portions membranaires riches en PI3P spécifiques du RE appelées omégasomes et qui serviront alors de plateforme pour la formation du phagophore, la double membrane qui va englober une partie du cytoplasme (Axe, 2008). Le terme omégasome a été donné aux portions du RE enrichies en PI3P pour leur structure en forme de Ω. Ainsi, DFCP1 est un marqueur de l'omégasome bien que sa fonction n'est pas encore clairement identifiée car l'extinction de cette protéine n'inhibe pas l'autophagie (Hayashi-Nishino, 2009).

L'étude de l'initiation de l'autophagie peut être réalisée grâce à des inhibiteurs comme la 3-méthyladénine (3-MA), la wortmannine ou encore le SAR405 qui inhibent l'activité de la PI3K de classe III et inhibent donc la formation de l'autophagosome. Ces inhibiteurs sont utilisés comme inhibiteur de

l'autophagie (Petiot, 2000, Ronan, 2014). L'invalidation de la Becline-1 par siRNA conduit également à une inhibition de la formation des autophagosomes (Liang, 2008).

### *d) Elongation de l'autophagosome*

Par la suite, un système moléculaire permet le recrutement séquentiel de protéines ATG dont la fonction principale est l'adressage de la protéine LC3 à la membrane du phagophore. Il s'agit du complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 dont la sous unité ATG16L1 interagit notamment avec la protéine WIPI2 qui est recrutée au niveau des régions riches en PI3P du phagophore. Cette étape, liant le complexe ATG5-ATG12-ATG16L1 à la membrane du phagophore, participe au recrutement de la protéine LC3 par conjugaison à une molécule, le phosphatidyléthanolamine (PE), qui la stabilise à la surface des autophagosomes (on parle alors de LC3II) (Morel, 2017). Ces deux systèmes, ATG12-ATG5-ATG16L1 et ATG8-PE, servent de marqueurs pour la détection de l'autophagie (Kabeya, 2000, Mizushima, 2001) (Figure 19).

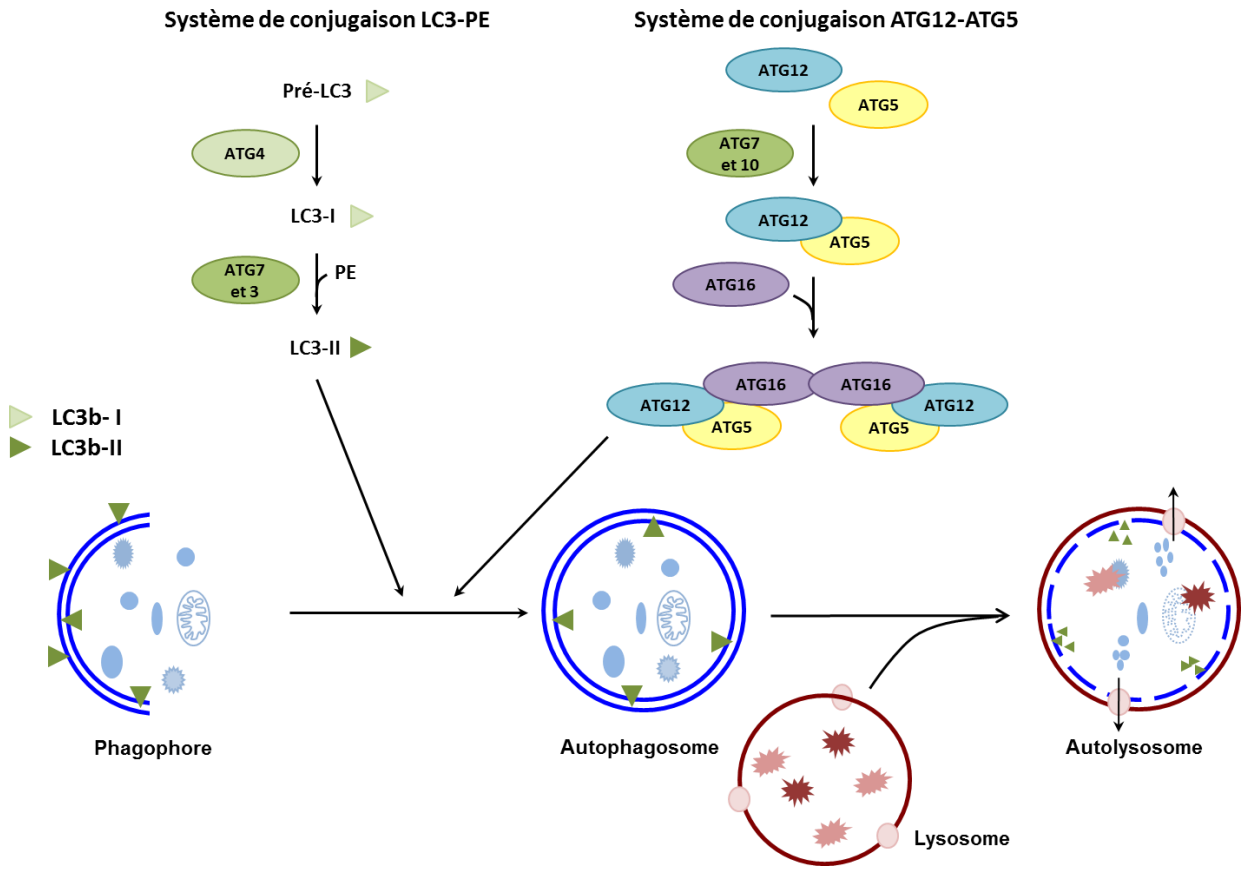



**Figure 20 : Représentation des deux systèmes ubiquitine-like qui régulent la formation de l'autophagosome.**

Le premier système permet la maturation de LC3 avec son association avec le PE. Le deuxième système permet la formation du complexe ATG12-ATG5-ATG16 qui est responsable de l'insertion du complexe LC3-PE au niveau de la membrane de l'autophagosome.

Le système de conjugaison ATG12-ATG5-ATG16L1 :

La protéine ATG12 possède une glycine au niveau de sa partie C-terminale qui est la cible des protéines ATG7 et ATG10 pour permettre sa conjugaison avec ATG5 (Mizushima, 1998). Le complexe ATG12-ATG5 interagit par la suite avec un nouvel acteur, ATG16L, afin de former un complexe. Chez les mammifères, ce complexe est principalement localisé au niveau de la membrane externe de l'autophagosome et se dissocie avant la formation complète de l'autophagosome (Mizushima, 2001).

Le système de conjugaison LC3-PE :

ATG8 et ses homologues chez les mammifères comme LC3, GABARAP et GATE-16 (GABARAPL2) sont des protéines ubiquitines-like qui sont synthétisées en tant que précurseurs avec une séquence additionnelle au niveau de leur partie C-terminale qui est la cible de la cystéine protéase ATG4 (Kabeya, 2004, Satoo, 2009). La coupure par ATG4 induit la conjugaison de LC3 avec un phosphadityléthanolamine (PE) grâce aux actions successives d'ATG7 et ATG3 (Tanida, 2001). LC3-PE est retrouvé au niveau de site d'initiation de l'autophagosome et au niveau de l'autophagosome (Kirisako, 1999). LC3 reste associée de manière spécifique aux autophagosomes jusqu'à ce qu'ATG4 coupe cette liaison juste avant la fusion de l'autophagosome avec le lysosome, où elle sera dégradée. La protéine LC3 est considérée comme un excellent marqueur de l'autophagie puisque sa quantité est corrélée au nombre d'autophagosomes (Mizushima, 2004).

Ces deux systèmes de conjugaison sont étroitement liés car le complexe ATG12-ATG5-ATG16L permet la formation du complexe LC3-PE et sa liaison au niveau de l'autophagosome (Mizushima, 2011). L'étape d'élongation de l'autophagosome peut être étudiée par des approches d'invalidation des gènes ATG5, ATG7 ou encore ATG12.

### *e) Maturation de l'autophagosome*

La maturation correspond à la fusion d'un autophagosome avec un lysosome afin d'acquérir les propriétés et les enzymes nécessaires à la dégradation de son contenu. Les autophagosomes se forment aléatoirement dans le cytoplasme alors que les endosomes tardifs et les lysosomes sont principalement périnucléaires. Une fois formés, les autophagosomes doivent atteindre les lysosomes, au niveau du centre organisateur de microtubules (MTOC), afin de fusionner avec eux et de dégrader leur contenu. Les dynéines semblent être essentielles pour le mouvement des autophagosomes (Kimura, 2008, Jahreiss, 2008, Fass, 2006, Kochl, 2006). Alors que chez la levure, cette maturation est présumée s'accomplir en une étape unique de fusion de l'autophagosome avec la vacuole, chez les mammifères, elle constitue un processus séquentiel de fusion avec divers composants de la voie lysosomale (Eskelinen, 2005). Après leur formation, les autophagosomes sont à même de fusionner avec des endosomes précoces et ainsi

constituer des amphisomes avant leur fusion avec les lysosomes (Razi, 2009, Metcalf, 2010). Les autophagosomes peuvent également fusionner entre eux (fusion homotypique) (Jahreiss, 2008).

Une fois que l'autophagosome est arrivé à sa destination, il fusionne avec un lysosome grâce à la coordination de trois ensembles de familles de protéines : les GTPases Rab, les complexes de fixation à la membrane et les complexes SNAREs (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment protein receptor) (Ganley, 2013).

## D. Régulation de l'autophagie

### 1. Régulation par les acides aminés

L'implication de l'autophagie en réponse à des variations en acides aminés a été découverte bien avant la machinerie de l'autophagie avec l'identification des gènes ATG. En 1977, l'équipe de Schworer a montré que la perfusion de foies de rat avec un milieu ne contenant pas d'acides aminés induisait rapidement une augmentation du nombre d'autophagosomes (Mortimore, 1977). L'un des effecteurs clé de la répression de l'autophagie médiée par les acides aminés est mTOR (mammalian target of rapamycin) (Iwamaru, 2007). mTOR est une sérine/thréonine kinase extrêmement conservée qui est modulé par différents types de stimuli comme les niveaux en acides aminés, en énergies, en oxygène ou encore en facteurs de croissance.

Le niveau basal d'autophagie est faible dans des conditions physiologiques, il est donc important pour l'organisme de pouvoir induire l'autophagie pour s'adapter aux conditions de stress ou de carences nutritionnelles. La protéine mTOR est un inhibiteur central de l'autophagie. En condition physiologique, les acides aminés intracellulaires activent mTOR qui régule positivement les processus anaboliques et négativement les processus cataboliques comme l'autophagie. mTOR, en phosphorylant ULK1 sur les sérines 638 et 758 et ATG13 sur la sérine 258 (Wong, 2013, Puente, 2016), inhibe le complexe ULK. Lors d'une carence nutritionnelle, mTOR est inactivé et libère ULK1 qui pourra alors phosphoryler ses partenaires ainsi que les différentes protéines ATG en aval certains membres du complexe PI3K dont VPS34, la Bécline 1 et ATG14 permettant ainsi la formation du PI3P nécessaire à la formation des autophagosomes (Russell, 2013, Antonioli, 2017).

### 2. Régulation par les facteurs de croissance

#### *a) La voie PI3K/AKT/mTOR*

Chez les mammifères, les voies de signalisation régulant l'autophagie par les facteurs de croissance sont différentes de celles induites par les acides aminés, mais convergent toutes vers la protéine mTOR (Lum, 2005). Les facteurs de croissance comme l'insuline régulent la protéine mTOR *via* les PI3K de classe I. En présence d'insuline, l'autophosphorylation sur les résidus tyrosine du récepteur à l'insuline permet le recrutement et la phosphorylation des protéines IRS1 et IRS2 (Insuline Receptor Substrate 1 and 2) (Sun, 1991). Une fois phosphorylées, les protéines IRS servent de point d'ancrage aux molécules contenant un ou plusieurs domaine(s) SH2 permettant ainsi de propager le signal émanant du récepteur de l'insuline (Virkamaki, 1999). Les sous-unités régulatrices de la PI3-kinase de classe I comme p85 peuvent se lier à au moins quatre sites contenus dans IRS-1. La PI3K est une enzyme qui phosphoryle les phosphatidylinositol en position 3 (PI3P). Il a été observé que suite à une stimulation avec de l'insuline, le niveau de PI3P augmentait rapidement dans la cellule. La famille des PI 3-kinases compte quatre classes

distinctes, nommées Ia, Ib, II et III (Sheperd, 1998). La classe 1a serait celle majoritairement recrutée par la signalisation issue du récepteur de l'insuline et des protéines IRS (Sheperd, 1998).

La génération de PI3P, par la PI3K de classe I, permet le recrutement à la membrane de la protéine kinase B (AKT) et son activateur PDK1 (phosphoinositide-dependent protein kinase 1), menant à la phosphorylation et à l'activation d'AKT par PDK1 (Stokoe, 1997). L'intensité de l'activation de la PI3K de classe I est régulée négativement par plusieurs protéines. La principale protéine régulatrice est la 3'-phosphoinositide phosphatase PTEN. En effet, PTEN réverse la production de PI3P menant ainsi à la diminution de la signalisation en aval d'AKT (Carracedo, 2008). L'activation d'AKT conduit à la phosphorylation d'une protéine encodée par le gène suppresseur de tumeur TSC2. La phosphorylation de TSC2 bloque l'interaction de TSC2 avec TSC1 et la formation du complexe TSC1-TSC2 (Manning, 2002) et donc son activité GAP (GTPase activating protein) sur la protéine Rheb (Inoki, 2003). Rheb, sous sa forme GTP active, peut alors se lier et activer la protéine mTOR et ainsi réguler négativement l'autophagie (Long, 2005). Lorsque les hormones sont absentes du milieu, mTOR est inactivé et l'autophagie est induite (Figure 20).

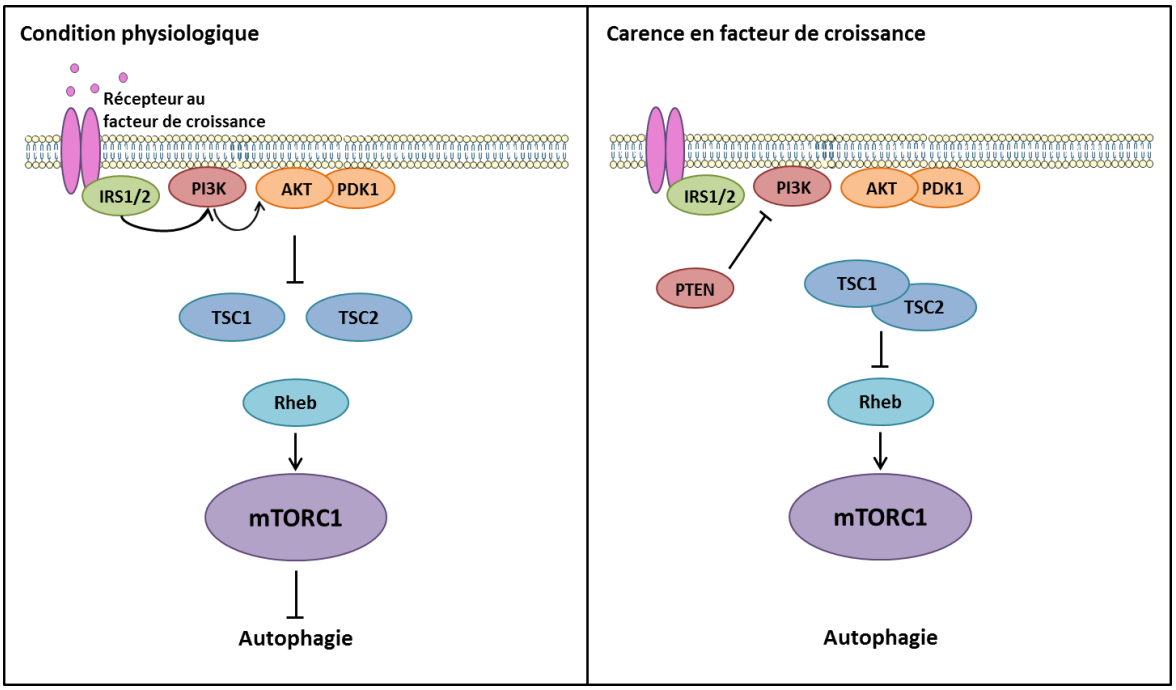



**Figure 21 : Représentation de la régulation de l'autophagie par les facteurs de croissance.**

### *b) La voie MAPK/ERK*

Outre mTOR, la protéine RAS joue également un rôle dans la régulation de l'autophagie par les facteurs de croissance. Les protéines RAS font partie de la famille des GTPases, et jouent un rôle important dans la transmission de signaux extracellulaires provenant des récepteurs membranaires (Bos, 1989). Les protéines RAS jouent un rôle « d'interrupteur » au sein des voies de signalisation et oscillent entre deux états : un état actif où elles sont liées au GTP (Guanosine Tri-Phosphate), ce qui permet transitoirement l'interaction de RAS avec d'autres molécules intracellulaires effectrices et un état inactif où elles sont liées au GDP. Sous leur forme active, les protéines RAS permettent l'activation d'effecteurs intracellulaires comme Raf-1 ou la PI3K de classe I.

Dans des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF), l'activation de RAS permet l'inhibition de l'autophagie via la PI3K de classe I mais pas via Raf-1 (Furuta, 2004). En comparaison avec la PI3K, Raf-1 est un capteur d'acides aminés qui régule positivement l'autophagie dans des cellules cancéreuses de colon (Pattingre, 2003). Dans ce contexte, les acides aminés ciblent et inhibent l'activité de Raf-1, inhibant ainsi les protéines en aval MEK1/2 (Mitogen-activated protein kinase ERK kinase 1/2) et ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) et l'autophagie. L'absence d'acides aminés réverse cette inhibition et induit ERK1/2 et l'autophagie. Par conséquent, les deux effecteurs en aval de RAS, la PI3K de classe I et Raf-1, possèdent des actions opposées dans la régulation de l'autophagie vis-à-vis de la réponse aux facteurs de croissance ou de l'absence d'acides aminés.

A l'inverse, il a également été montré que l'autophagie pouvait à son tour réguler la phosphorylation de la protéine ERK (Martinez-Lopez, 2013). Dans cette étude les auteurs montrent que la présence de facteurs de croissance permet l'interaction d'ERK et de MEK à la surface des autophagosome. Cette localisation autophagosomale serait alors requise pour l'activation de la voie ERK/MEK. En effet l'invalidation des gènes ATG5 ou ATG7 inhibe la phosphorylation d'ERK, alors que la déplétion d'ATG4B, qui résulte en l'augmentation de LC3-II, et donc du nombre d'autophagosomes stimule son activation.

## 3. Régulation par le niveau d'énergie

Lors d'un stress métabolique, l'activation de l'autophagie est importante pour la survie cellulaire. Dans les cellules de mammifères, une diminution du niveau énergétique de la cellule peut être identifiée par la protéine kinase AMPK (5'-AMP-activated protein kinase). La protéine AMPK est activée lors d'une diminution du ratio ATP sur AMP grâce à la protéine kinase LKB1. En condition de stress énergétique, LKB1 va phosphoryler AMPK pour permettre son activation (Shackelford, 2009) menant à la phosphorylation et à l'activation du complexe TSC1/2 qui inhibe l'activité de mTOR via Rheb (Inoki, 2003). L'autophagie induite par l'inhibition de mTOR va conduire à une élévation du niveau d'ATP intracellulaire grâce au recyclage des nutriments (Figure 21).

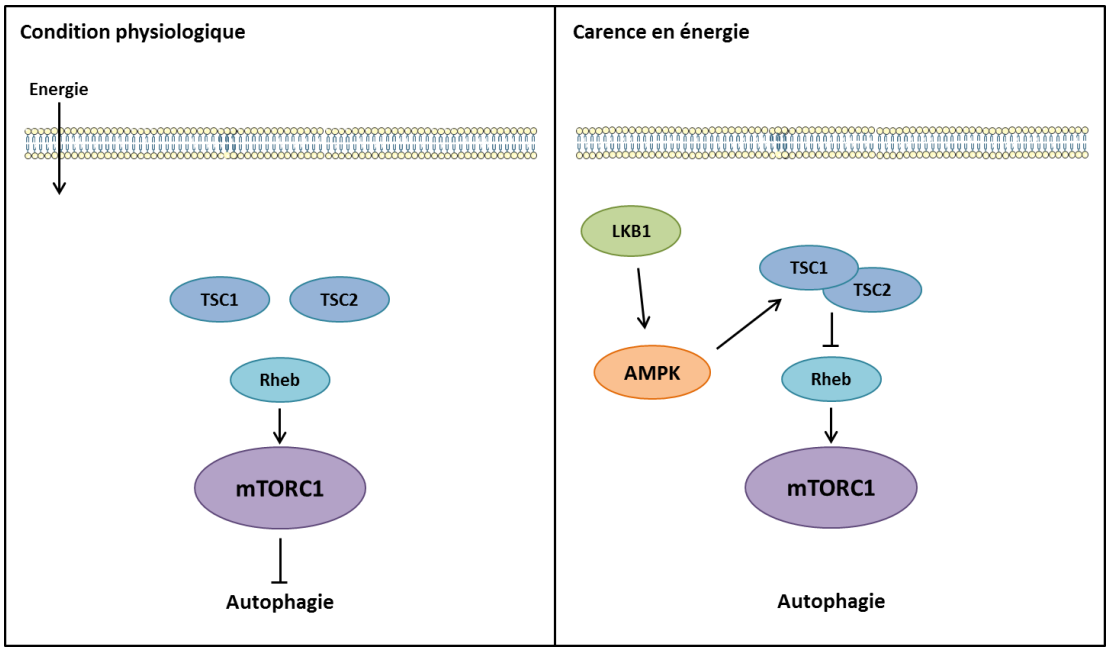



**Figure 22 : Représentation de la régulation de l'autophagie par les variations d'énergie.**

## 4. Régulation en réponse à un stress du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique est un compartiment cellulaire clé qui facilite le repliement des protéines nouvellement synthétisées et qui initie les voies de transports vésiculaires. De nombreux stress du réticulum mènent à une accumulation de protéines mal repliées. Parmi ces stress, on retrouve les stress hypoxiques ou oxydatifs, les carences en glucose ou encore les anomalies de glycosylation. Plusieurs études ont démontré que ces stress du réticulum peuvent activer le processus d'autophagie. En effet, le knockdown du régulateur Grp78/Bip inhibe la formation des autophagosomes par les différents stress du réticulum endoplasmique mais n'affecte pas la conversion de LC3-I en LC3-II. Ceci suggère que le régulateur Grp78/Bip est un facteur essentiel pour l'autophagie au niveau de la formation du phagophore (Li, 2008). D'autres études menées sur les voies de signalisation des UPR ont fourni des informations complémentaires sur les mécanismes d'induction de l'autophagie en réponse à un stress du RE.

Les voies des UPR impliquent trois acteurs : IRE1, ATF6, et PERK. Ces facteurs sont activés lors d'une augmentation du niveau de protéines mal repliée et activent la transcription de différents gènes cibles. L'un des gènes cibles de IRE1 est JNK (c-Jun N-terminal kinase) qui phosphoryle Bcl2. Cette phosphorylation va dissocier le complexe Bcl2-Beclin et libérer Beclin, induisant ainsi l'autophagie (Wei, 2008). Cette protéine est également importante pour la conjugaison lipidique de LC3 induit par la tunicamycine ou par l'accumulation de protéines cytosoliques mal repliées due à une inhibition du protéasome dans des MEFs ou des cellules cancéreuses (Ding, 2007, Otaga, 2006). D'autres études menées sur des cellules murines suggèrent que la phosphorylation d'eIF2α par la kinase PERK est requise pour l'induction d'autophagie en réponse à l'expression d'un mutant protéique de la dysferline ou de

protéines mal repliées (Kouroku, 2007, Fujita, 2007). Ainsi, les voies IRE1-JNK et PERK-eIF2α semblent jouer un rôle important dans l'activation de l'autophagie par les UPR.

## 5. Régulation en réponse à l'hypoxie

Lors d'une réponse à un stress hypoxique, les cellules subissent des changements rapides afin d'adapter leur métabolisme et leur expression génétique. Selon la durée ou la sévérité de la privation d'oxygène, l'hypoxie régule l'autophagie par différentes voies de signalisation. Lors d'une hypoxie chronique ou modérée, l'autophagie peut être induite par les voies HIF-1α et PKCδ-JNK1 (Mazure, 2010). Inversement, lors d'une privation d'oxygène rapide et sévère, qui est souvent associée à une restriction en énergie et en glucose, l'autophagie est induite par des voies HIF-1α indépendante. Ces voies font appel à mTOR (Papandreou, 2008) et aux stress du réticulum endoplasmique (Roushop, 2010) (Figure 22).

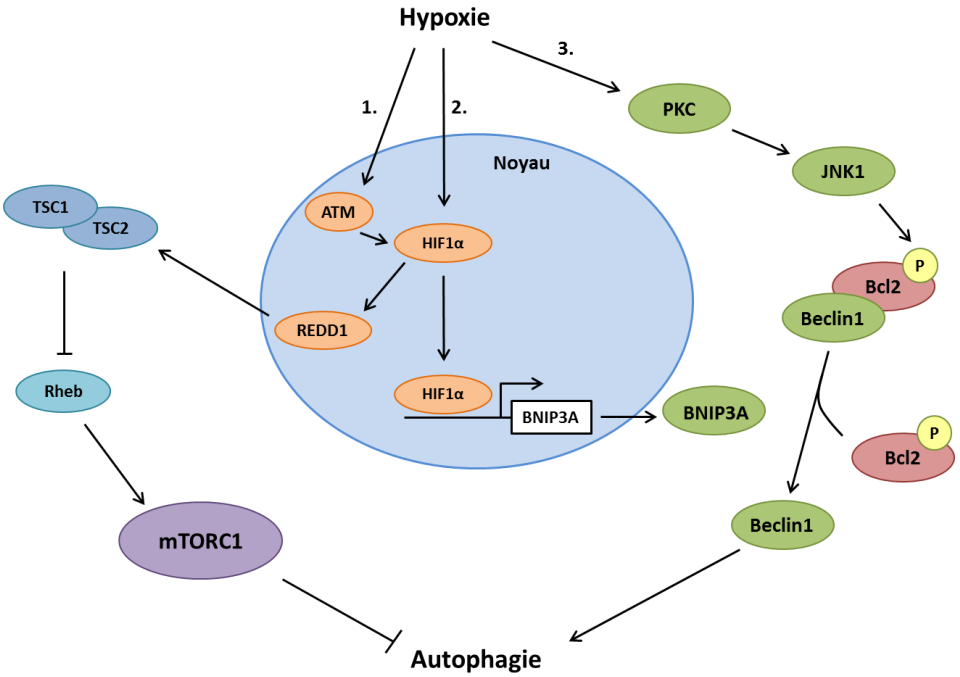



**Figure 23 : Représentation des voies d'induction de l'autophagie par l'hypoxie.**

**1.** La signalisation dépendante de mTOR : l'hypoxie induit une activation de la protéine de stress ATM (ataxia telangiectasia mutated). ATM va induire l'expression de la protéine REDD1 via le facteur HIF1α. REDD1 séquestre la protéine 14-3-3, un régulateur négatif du complexe TSC, induisant ainsi une inhibition de mTOR et une activation de l'autophagie.

**2.** La signalisation dépendante d'HIF1α : le facteur de l'hypoxie HIF1α déclenche l'autophagie en induisant l'expression de BNIP3. BNIP3 libère la Bécline 1 de Bcl2 par une interaction concurrentielle avec Bcl-2.

**3.** La signalisation PKC-JNK1: PKC-JNK1 induit l'autophagie par phosphorylation de la protéine BCL-2. Cette phosphorylation perturbe l'interaction inhibitrice de Bcl2 avec la Bécline 1. La Bécline 1 dissocié interagira avec Vps34, afin d'améliorer l'activité du complexe PI3K et d'induire l'autophagie (Adapté de Fang, 2015).

### *a) L'hypoxie, le facteur HIF et l'autophagie*

HIF est un facteur de transcription clé en réponse à l'hypoxie (Brocato, 2014). Cette protéine est un hétérodimère constituée d'une sous unité α régulée par le niveau d'oxygène et une sous unité β. Lors d'une hypoxie avec une concentration en oxygène inférieure à 5%, la sous unité α dimérise directement avec la sous unité β permettant ainsi l'expression de gènes et l'induction du métabolisme cellulaire (Semenza, 2013). Lors d'une hypoxie modérée, le facteur HIF peut également induire la protéine BNIP3 (BCL2 interacting protein 3) qui permet d'empêcher la liaison inhibitrice de BCL2 avec Beclin 1 (Zhang, 2008). La transcription de BNIP3 est donc responsable de la formation des autophagosomes en réponse à un stress hypoxique.

### *b) L'hypoxie, mTOR et l'autophagie*

Lors d'une hypoxie sévère, accompagnée d'une restriction en glucose et en énergie, l'inhibition de mTOR joue un rôle important dans l'activation de l'autophagie. La protéine REDD1 (protein regulated in development and DNA damage response 1), également connue sous le nom de DDIT4 (DNA-damage-inducible transcript 4 protein), est responsable de l'inhibition de mTOR (Wolff, 2011). Dans les cellules eucaryotes, l'augmentation de l'expression de REDD1 est suffisante pour inhiber mTOR. En effet, REDD1 va séquestrer la protéine 14-3-3, un régulateur négatif du complexe TSC. REDD1 permet ainsi d'empêcher la protéine 14-3-3 de se lier à la protéine TSC2 et permettra indirectement d'inhiber la protéine mTOR (DeJoung, 2008). Cependant, la façon dont REDD1 séquestre la protéine 14-3-3 est encore inconnue. De plus, l'activation de la protéine d'ATM (ataxia telangiectasia mutated) en cas de stress hypoxique permettrait la transmission du signal vers mTOR. En effet, dans des fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) ATM - /-, l'induction de HIF et de REDD1 est fortement diminuée (Cam, 2011). Ces résultats démontrent que la protéine ATM est impliquée dans le lien entre REDD1 et le complexe TSC de la voie mTOR.

### *c) L'hypoxie, le complexe PKCδ-JNK1 et l'autophagie*

Dans les premières étapes du stress hypoxique, la protéine kinase C (PKC) est activée et promeut l'autophagie en induisant la phosphorylation inhibitrice de BCL2 par la kinase JNK1 (cJun-N-terminal kinase 1) (Chen, 2008, Cho, 2009). PKC est une sérine thréonine kinase qui régule beaucoup de processus cellulaires comme la mort cellulaire, la prolifération et la survie.

## F. Rôles physiologiques de l'autophagie

### 1. Développement : embryogénèse et morphogénèse

Initialement, les études génétiques d'invalidation des gènes ATG dans les eucaryotes inférieurs ont révélé un rôle essentiel de l'autophagie dans les processus de différenciation et dans le développement (Mizushima, 2010). Ces dernières années, les analyses des modèles knockout des gènes ATG chez la souris ont conduit à une explosion de connaissances sur les fonctions de l'autophagie chez les mammifères (Tableau 5).

| Gènes | Phénotypes | Références bibliographiques |
|---|---|---|
| **ATG3$^{-/-}$, ATG5$^{-/-}$, ATG7$^{-/-}$, ATG9$^{-/-}$, ATG16L1$^{-/-}$** | Mort néonatale accompagnée d'une diminution du niveau d'acides aminés et d'un défaut d'allaitement. | Komatsu, 2005, Kuma, 2004, Saitoh, 2008, Saitoh, 2009, Sou, 2008 |
| **Beclin 1$^{-/-}$** | Mort embryonnaire précoce (les souris hétérozygotes présentent une augmentation du taux de tumeurs spontanées) | Qu, 2003, Yue, 2003 |
| **FIP200$^{-/-}$** | Mort embryonnaire en fin de gestation associée à une insuffisance cardiaque et un défaut du développement hépatique | Gan, 2006 |
| **Ambra$^{gt/gt}$** | Mort embryonnaire en fin de gestation associée à un défaut du développement du tube neural et une hyperprolifération des tissus neuraux | Fimia, 2007 |
| **ULK1$^{-/-}$** | Augmentation du nombre de réticulocytes avec des défauts d'élimination des mitochondries | Kundu, 2008 |
| **ATG4c$^{-/-}$** | Viable, fertile | Mariño, 2007 |
| **MAP1LC3$^{-/-}$** | Phénotype normal | Cann, 2008 |
| **GABARAP$^{-/-}$** | Phénotype normal | O'Sullivan, 2005 |

**Tableau 5 : Phénotypes de l'invalidation de gènes de l'autophagie dans des modèles murins.**
(Mizushima, 2010)

L'autophagie, qu'elle soit basale ou induite, est un mécanisme indispensable tout au long de la vie d'un organisme des premiers stades développementaux à sa mort. La suppression de l'expression d'un grand nombre de gènes essentiels à la conduite de l'autophagie est, à l'échelle de l'organisme, dans la majorité des cas, incompatible avec la vie. Du fait de la mort précoce des animaux, il est impossible de déterminer l'implication des processus autophagiques dans le développement et la fonctionnalité des différents tissus de l'organisme. Pour cela, de nombreux modèles murins d'invalidation tissu-spécifique de gènes de l'autophagie ont été générés (Tableau 6).

| Modèle murin | Tissu cible | Phénotype | Référence biblio. |
|---|---|---|---|
| **ATG5$^{F/F}$, Nestin-*Cre* ; ATG7$^{F/F}$, Nestin-*Cre*** | Cellules neuronales | Neurodégénérescence accompagnée d'une accumulation d'ubuquitine et de p62. | Hara, 2006, Komatsu, 2006 |
| **FIP200$^{F/F}$, Nestin-*Cre*** | Cellules neuronales | Neurodégénérescence accompagnée d'une accumulation d'ubiquitine de p62 et de mitochondries. | Liang, 2010 |
| **ATG5$^{F/F}$, Pcp2-*Cre* ; ATG5$^{F/F}$, Pcp2-*Cre*** | Cellules de Purkinje | Dégénérescence axonale accompagnée d'une accumulation de p62. | Komatsu, 2007, Nishiyama, 2007 |
| **ATG5$^{F/F}$, Mx1-*Cre* ; ATG7$^{F/F}$, Mx1-*Cre*; ATG7$^{F/F}$, Alb-*Cre*** | Hépatocytes | Rupture hépatique accompagnée d'une accumulation d'ubiquitine, de p62 et de mitochondries. | Komatsu, 2005 |
| **ATG5$^{F/F}$, MCL2v-*Cre*** | Cardiomyocytes | Relativement normal. | Nakai, 2007 |
| **ATG5$^{F/F}$, Mer*Cre*Mer** | Cardiomyocytes | Hypertrophie cardiaque accompagnée d'une accumulation d'ubiquitine, de p62 et de mitochondries. | Nakai, 2007 |
| **ATG5$^{F/F}$, HSA-*Cre*** | Muscle squelettique | Atrophie des fibres musculaires accompagnée d'une accumulation d'ubiquitine et de p62. | Raben, 2008 |
| **ATG5$^{F/F}$, Mlc1-*Cre*** | Muscle squelettique | Atrophie et faiblesse musculaire accompagnée d'une accumulation d'uiquitine, de p62 et de mitochondries. | Masiero, 2009 |
| **ATG7$^{F/F}$, Ap2-*Cre*** | Adipocytes | Diminution de la masse adipeuse blanche, résistance à l'obésité accompagné d'une accumulation de p62 et de mitochondries. | Singh, 2009, Zhang, 2009 |
| **ATG5$^{F/F}$, EL-*Cre*** | Cellules acinaires pancréatiques | Pas de phénotype anormal. | Hashimoto, 2008 |
| **ATG7$^{F/F}$, Rip-*Cre*** | Cellules β du pancréas | Fonction et masse des cellules β altérées accompagnées d'une accumulation d'ubiquitine, de p62 et de mitochondries. | Ebato, 2008, Jung, 2008 |
| **ATG5$^{F/F}$, Zp3-*Cre*** | Ovocytes | Mort embryonnaire au stade 4-8 cellules. | Tsukamoto, 2008 |
| **ATG5$^{F/F}$, Lck-*Cre* ; ATG7$^{F/F}$, Lck-*Cre*** | Lymphocytes T | Diminution du nombre de lymphocytes T accompagnée d'une augmentation de mitochondries. | Pua, 2009, Stephenson, 2009 |
| **ATG5$^{F/F}$, CD19-*Cre*** | Lymphocytes B | Diminution du nombre de lymphocytes B. | Miller, 2008 |
| **ATG7$^{F/F}$, Vav-*Cre*** | Cellules hématopoïétiques | Anémie sévère, Lymphopénie (cellules B et T). | Mortensen, 2010 |
| **ATG5$^{F/F}$, CD11c-*Cre*** | Cellules dendritiques | Mort suite à une infection virale. | Lee, 2010 |

**Tableau 6 : Phénotypes de l'invalidation de gènes tissu-spécifique dans des modèles murins.**

## 2. L'autophagie dans le système hématopoïétique

Comme évoqué précédemment, le système hématopoïétique est basé sur les cellules souches hématopoïétique (CSH) qui sont caractérisées par un état combinant un potentiel de quiescence, des propriétés d'auto-renouvellement et qui ont la capacité à donner plusieurs lignées. De récentes études sur des animaux transgéniques ont déterminé l'importance de l'autophagie dans le maintien de la capacité d'auto-renouvellement des CSH. Ainsi, l'ablation conditionnelle d'ATG7 dans le système hématopoïétique des souris (Vav-ATG7$^{-/-}$) cause une sévère déficience dans la capacité d'auto-renouvellement. Ceci a été démontrée *in vitro* par la perte de la facultée des cellules à former des colonies secondaires dans des essais de clonogénie, et, *in vivo*, par une diminution de la population de CSH et l'incapacité de ces cellules à reconstituer un système hématopoïétique dans des souris irradiées (Mortensen, 2011). Ceci a été confirmé par l'inhibition de l'autophagie avec de la 3MA (3-méthyladénine), un inhibiteur de VPS34, ou un shRNA dirigé contre ATG5 (Salemi, 2012). Des dysfonctionnements de l'autophagie semblent également affecter la différenciation des CSH en cellules matures du sang. En effet, les souris ATG7$^{-/-}$ présentent une réduction du nombre de progéniteurs lymphoïdes et myéloïdes accompagnée d'un déficit en cellules T, cellules B et cellules NK dans le système sanguin périphérique (Mortensen, 2011). D'autres études ont montré qu'une déplétion de FIP200 dans des CSH menait à une mortalité périnatale et une sévère anémie. FIP200 a été retrouvé important dans la maintenance et les fonctions des CSH fœtale (Liu, 2010).

L'autophagie est également importante dans la protection des CSH en réponse à des stress pro-apoptotique, comme les restrictions caloriques ou les carences en cytokines, grâce au facteur de transcription FoxO3 (Forkhead box O3) (Warr, 2013). Ce facteur est connu pour permettre la transcription de différents gènes de l'autophagie comme LC3b, Atg12, Atg4b, Ulk2, Vps34 et Beclin 1 (van der Vos, 2012, Warr, 2013). Un autre mécanisme impliqué dans l'induction de l'autophagie par FoxO3 est basé sur la capacité des radicaux libres oxygénés à activer les facteurs FoxO qui en augmentant les niveaux de sestrin, permettent une inhibition de mTOR par la voie AMPK et donc conduisent à une inhibition de l'autophagie (Lee, 2010).

## G. Autophagie et hémopathies malignes

### 1. Généralités sur l'autophagie et les cancers

L'autophagie est un processus cellulaire essentiel dont le rôle a beaucoup été étudié dans le développement et la progression tumorale ainsi que dans la réponse aux thérapies anti-cancéreuses. Néanmoins, le rôle de l'autophagie dans ces processus est compliqué et peut avoir des rôles opposées sur l'évolution de la tumeur selon les stades de la tumorigénèse (Joffre, 2017). Différentes études ont montré que l'invalidation de gènes impliqués dans l'autophagie peut augmenter ou prévenir la mort des cellules cancéreuses (White, 2009).

Cependant, les deux facettes de l'autophagie peuvent être comprises si l'on dissèque ses rôles au cours des différentes étapes de la tumorigénèse. A l'état physiologique, l'autophagie basale peut prévenir l'initiation des cancers, fonctionnant comme un mécanisme suppresseur de tumeur. Cette autophagie suppresseur de tumeur permet par exemple d'éliminer les organites endommagés, comme les mitochondries produisant une quantité plus importante de radicaux libres oxygénés. Ceci protège les cellules contre une possible instabilité génomique ou une inflammation, empêchant ainsi la tumorigénèse (Mathew, 2007, Mathew, 2009). En revanche, lorsque la tumeur est établie, l'autophagie peut fonctionner comme un mécanisme pro-tumoral. De plus, l'autophagie est retrouvée augmentée lorsque les cellules cancéreuses sont confrontées à un stress comme une carence en énergie ou en facteurs de croissance, des dommages à l'ADN, l'hypoxie ou encore des thérapies anti-cancéreuses (chimiothérapies, radiothérapies) (Thorburn, 2014).

### 2. Un acteur suppresseur de tumeur

Un des premiers mécanismes anti-tumoraux décrits correspond au processus autophagique induisant de la mort cellulaire. Des études morphologiques ont mis en évidence une accumulation d'autophagosomes dans les cellules sur le point de mourir (Schweichel, 1973). Ces observations ont permis de lier l'autophagie à un processus de mort cellulaire indépendant de l'apoptose, appelé mort cellulaire programmée de type II (Clarke, 1990). Le rôle de suppresseur de tumeur de l'autophagie a été validé avec la découverte et la caractérisation des protéines ATG trouvés déplétées dans plusieurs types de cancers. C'est le cas de la Bécline 1 qui fut la première à être proposée comme un gène suppresseur de tumeur car sa délétion allélique est observée dans une grande proportion de cancers du sein, de l'ovaire et de la prostate (Saito, 1993, Aita, 1999).

L'inflammation chronique représente un avantage pour la tumeur puisqu'une part importante du processus inflammatoire intervient dans la tumorigénèse. L'autophagie a été proposée comme un mécanisme pouvant freiner ce processus inflammatoire par différents mécanismes. En effet, dans des tumeurs dépourvues d'autophagie une inflammation accrue et de la nécrose sont observés. Dans les polynucléaires neutrophiles, l'activation de l'autophagie est associée à une mort cellulaire, menant à une

diminution de l'inflammation ainsi qu'à la multiplication des cellules cancéreuses (Mihalache, 2011). Un autre mécanisme expliquant le rôle tumeur suppresseur de l'autophagie, est que celle-ci a été décrite comme impliquée dans la libération de la protéine « puromycin-senstive aminopeptidase epitope ». Cette protéine permet la formation d'un épitope qui mime un antigène associé aux tumeurs et qui pourra alors être reconnu par les cellules T cytotoxiques entrainant ainsi la lyse des cellules cancéreuses (Demachi-Okamura, 2012).

L'autophagie est également impliquée dans la modulation des stress oxydatifs et dans la protection de l'intégrité du génome. Des études d'invalidation génétique de ATG5 et de la Bécline 1 ont permis de montrer une réponse accrue aux dommages à l'ADN ainsi qu'une baisse de la survie des souris génétiquement modifiées en réponse à un stress métabolique. La perte de fonction de la protéine Bécline 1 est également associée à une instabilité génomique menant à une aneuploïdie (Mathew, 2007). Les propriétés anti-tumorales de l'autophagie permettent donc de limiter les dommages à l'ADN, l'aneuploïdie et l'instabilité génomique. L'autophagie a été identifiée comme un nouveau mécanisme effecteur de la sénescence, important pour le recyclage des protéines nécessaires pour effectuer la transition d'un état prolifératif à un état sénescent, permettant ainsi la prolifération de cellules anormales (Young, 2009).

### 3. Un acteur pro-tumoral

En plus de son rôle suppresseur de tumeur, l'autophagie est également décrite pour jouer un rôle majeur dans la survie des cellules cancéreuses en réponse à un stress. Par exemple, l'induction de l'autophagie dans des cellules où l'apoptose a été inactivée lors de carences promeut la survie des cellules en réponse à une carence en facteur de croissance (Boya, 2005). Inversement, l'invalidation génétique de l'autophagie, indirectement par l'activation constitutive de la voie PI3K ou directement par l'utilisation de siRNA contre les ATG (Bécline 1, ATG5, etc), empêche la survie des cellules cancéreuses lors d'un stress métabolique même quand l'apoptose est inactivée (Lum, 2005, Karantza-Wadsworth, 2007). Ainsi, l'autophagie confère aux cellules cancéreuses une grande tolérance aux stress cellulaires tels que le stress métabolique, les carences énergétiques ou l'hypoxie.

Lors de carences énergétiques, des études ont montré que les cellules cancéreuses produisent des ROS, ROS décrits comme pouvant activer l'autophagie (Li, 2013). La production de ROS permettrait l'activation de la voie AMPK et donc l'inhibition de mTOR et par conséquent conduirait à l'activation de l'autophagie (Li, 2013). Dans un microenvironnement hypoxique, les cellules tumorales ont besoin de trouver des sources d'énergie alternatives. Des études ont montré que les cellules cancéreuses peuvent activer le processus d'autophagie pour leur permettre de proliférer. Cette autophagie peut être induite par le facteur HIF-1α (Nelson, 2004) et par la voie AMPK (Papandreou, 2008). En plus de ces deux voies, des miRNAs ont également été décrits dans la régulation de l'autophagie lors d'un stress hypoxique.

L'un de ces mi-RNA correspond au mir-376b dont les cibles sont ATG4c et la Bécline 1 (Korkmaz, 2012).

## 4. L'autophagie dans les leucémies myéloïdes

L'autophagie est un acteur important dans la progression des hémopathies myéloïdes (Jacquel, 2017). Considérant son rôle essentiel dans la survie et l'homéostasie cellulaire en condition de stress, il est logique de penser que l'autophagie peut atténuer l'action cytotoxique des thérapies anti-cancéreuses et ainsi représenter un mécanisme de résistance dans le traitement des leucémies. L'autophagie apparaît donc comme une cible thérapeutique intéressante pour améliorer l'action des thérapies utilisées couramment. Cependant, selon le contexte, l'autophagie peut comme dans les autres types de cancers être également associée à de la mort cellulaire dans les hémopathies malignes.

### *a) L'autophagie dans la leucémie myéloïde chronique*

La leucémie myéloïde chronique est une pathologie caractérisée par une prolifération augmentée de cellules myéloïdes matures dans le sang périphérique. Cette maladie est liée à l'apparition d'un chromosome de fusion, le chromosome de Philadelphie, qui code pour une protéine kinase appelée BCR/ABL responsable de la prolifération des cellules myéloïdes. Cette protéine est une cible thérapeutique intéressante dans les LMC. Les inhibiteurs de tyrosines kinases, comme l'Imatinib, sont développés pour inhiber l'activité tyrosine kinase d'oncogènes comme BCR/ABL. Ces inhibiteurs sont très largement utilisés pour traiter les patients mais des résistances et des rechutes peuvent apparaitre suite à l'utilisation de ces traitements. Des études ont montré que l'Imatinib induisait de l'apoptose dans les cellules exprimant BCR/ABL, mais également de l'autophagie due au stress du réticulum induit par le traitement. Cette autophagie induite inhiberait l'effet cytotoxique induit par l'Imatinib (Bellodi, 2009). Suite à ces études, la notion d'utilisation d'inhibiteurs de l'autophagie en combinaison avec un traitement induisant de l'autophagie cytoprotectrice a fait son apparition (Salomoni, 2009). D'autres études ont confirmé ces observations avec l'invalidation génétique de l'autophagie (siRNA ATG3) ou d'inhibiteur de l'autophagie, montrant ainsi l'effet bénéfique des inhibiteurs de tyrosine kinase avec les inhibiteurs de l'autophagie (Altman, 2011, Calabretta, 2011).

Contrairement à ces effets, on observe également des effets cytotoxiques de l'autophagie en réponse à des traitements dans les cellules exprimant BCR/ABL. C'est le cas pour l'inhibiteur de tyrosine kinase, le Lapatinib, qui induit de l'apoptose et de la mort cellulaire médiée par l'autophagie dans les cellules K562. Cette mort cellulaire est d'ailleurs diminuée avec l'utilisation d'inhibiteur de l'autophagie ou l'utilisation de knockdown pour la Bécline 1, ATG5 ou ATG7 (Huang, 2011) (tableau 7).

| Drogue | Cible | Type d'autophagie | Mort cellulaire | Référence biblio. |
|---|---|---|---|---|
| **Imatinib** | BCR/ABL | Cytoprotectrice | Combinaison avec un inhibiteur de l'autophagie | (Bellodi, 2009) |
| **SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid)** | Histone désacétylase | Cytoprotectrice | Combinaison avec un inhibiteur de l'autophagie | (Carew, 2007) |
| **OSI-027** | mTOR | Cytoprotectrice | Combinaison avec un inhibiteur de l'autophagie | (Carayol, 2010) |
| **Perifosine** | Protéine kinase B | Cytoprotectrice | Combinaison avec un inhibiteur de l'autophagie | (Tong, 2012) |
| **Lapatinib** | Epidermal Growth Factor (EGFR) | Cytotoxique | Apoptose et autophagie | (Huang, 2011) |
| **Resveratrol** | JNK/AMPK/mTOR | Cytotoxique | Apoptose et autophagie | (Puissant, 2010) |
| **Arsenic trioxide** | | Cytotoxique | Apoptose et autophagie | (Goussetis, 2012) |

**Tableau 7 : Traitements induisant l'autophagie dans les leucémies myéloïdes chroniques.**

### *b) L'autophagie dans les leucémies aiguës myéloïdes*

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) correspondent à un ensemble de pathologies caractérisées par une accumulation dans la moelle et le sang périphérique de progéniteurs hématopoïétiques ayant perdu leur capacité à se différencier. Les chimiothérapies couramment utilisées pour traiter les patients atteints sont basées sur la combinaison entre une anthracycline et de la cytarabine. Des études ont montré que la cytarabine induit une autophagie cytoprotectrice *via* l'activation de la voie mTOR dans des cellules primaires et des lignées cellulaires de LAM (Bosnjak, 2014). L'inhibition de cette autophagie par un inhibiteur comme la Bafilomycine A1 et la chloroquine ou par l'invalidation génétique d'ATG7 améliore l'effet cytotoxique de la cytarabine dans les cellules de LAM (Palmeira-dos-Santos, 2014, Sumitomo, 2016). L'autophagie cytoprotectrice est également stimulée par le traitement anthracycline/cytarabine dans cellules stromales mésenchymateuses de la moelle osseuse. Une invalidation génétique d'ATG7 dans ces cellules stromales et les cellules de LAM permet une meilleure action de ces agents cytotoxiques comparée à l'inhibition de l'autophagie dans les cellules de LAM uniquement (Piya, 2016). D'autres études ont identifié la protéine S100A8 (membrane de la famille de protéine fixant le calcium S100) comme un acteur important dans les mécanismes d'induction de l'autophagie cytoprotectrice. La protéine S100A8 est surexprimée dans les cellules chimiorésistantes et interagit directement avec la Bécline 1 pour activer le processus d'autophagie. L'invalidation de S100A8 bloque l'autophagie et améliore la sensibilité des cellules leucémiques en réponse aux anthracyclines (Yang, 2014).

Les statines appartiennent à une autre classe d'agents anti-leucémiques qui sont en train d'être évalués en essais cliniques en combinaison avec des chimiothérapies conventionnelles utilisées dans les LAM. Les statines sont des inhibiteurs d'une enzyme clé dans la synthèse du cholestérol intracellulaire, la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A (Hartwell, 2013). La diminution du taux de cholestérol intracellulaire induit un effet cytostatique sur les cellules leucémiques et active une autophagie cytoprotectrice (Hartwell, 2013). Dans ce contexte, l'inhibition de l'autophagie potentialise l'effet anti-leucémique des statines (Vilimanovich, 2015).

Le dasatinib qui est un multi-inhibiteur de tyrosine kinase (principalement décrit pour inhiber BCR/ABL) a été décrit comme pouvant induire la différenciation cellulaire myéloïde des cellules de LAM *via* l'induction de l'autophagie. L'utilisation d'inhibiteurs de l'autophagie comme la 3MA (3-méthyladénine) inhibe ce processus de différenciation alors que l'utilisation d'activateurs de l'autophagie comme la rapamycine le renforce (Xie, 2014). Un exemple d'autophagie cytotoxique dans les LAM correspond à l'utilisation de l'inhibiteur APO866, un inhibiteur du nicotinamide phosphoribosyltransferase, qui tue les cellules primaires de LAM indépendamment de la voie des caspases. L'utilisation d'inhibiteurs de l'autophagie comme la 3MA ou la bafilomycine A1 empêche cette mort cellulaire (Nahimana, 2014) (tableau 8).

| **Drogue** | **Cible** | **Type d'autophagie** | **Mort cellulaire** | **Référence biblio.** |
|---|---|---|---|---|
| **Cytarabine** | Analogue nucléosidique de la pyrimidine | Cytoprotectrice | Combinaison avec un inhibiteur de l'autophagie | (Bosnjak, 2014) |
| **Statines** | 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A | Cytoprotectrice | Combinaison avec un inhibiteur de l'autophagie | (Hartwell, 2013) |
| **Daunorubicine** | Intercalant de l'ADN | Cytoprotectrice | Combinaison avec un inhibiteur de l'autophagie | (Han, 2011) |
| **Dasatinib** | Tyrosine kinase | Différenciation cellulaire | | (Xie, 2014) |
| **APO866** | nicotinamide phosphoribosyl-transferase | Cytotoxique | Autophagie | (Ginet, 2014) |

**Tableau 8 : Traitements induisant l'autophagie dans les leucémies aiguës myéloïdes.**

### c) Conclusions sur le rôle cytoproctecteur ou cytotoxique de l'autophagie en réponse aux traitements

L'ensemble des données présentées précédemment amène à une conclusion : le rôle de l'autophagie en réponse aux traitements utilisés dans les leucémies peut être très variable. L'autophagie peut protéger les cellules cancéreuses des traitements anti-leucémiques et parfois, l'autophagie est requise pour l'efficacité des thérapies. Ces différentes formes d'autophagie sont différentes selon le contexte, que ce soit en fonction des agents utilisés, des cellules cancéreuses ciblées mais aussi du sous type de LAM étudié. De plus, rien n'est connu sur la réponse autophagique en fonction de l'expression de FLT3-ITD ou FLT3 sauvage dans les LAM. De nombreux essais cliniques visent à inhiber l'autophagie. Pour le moment, uniquement la chloroquine ou l'hydroxychloroquine peuvent être utilisé en clinique chez l'homme mais ces inhibiteurs ne sont pas spécifiques du processus autophagique. C'est pour cela que les industries pharmaceutiques développent des inhibiteurs de gènes clés de l'autophagie, comme le SAR405 qui cible VPS34, qui sont en développement préclinique. Cependant, il est difficile de prévoir quelle forme d'autophagie sera induite lors de l'utilisation d'un traitement en clinique. En conclusion, il se peut que les essais cliniques actuels soient basés sur des informations insuffisantes sur les formes d'autophagie qui pourraient être induites par la thérapie conventionnelle. De plus, concernant les résultats des essais cliniques en cours, qu'il s'agisse de réussite ou d'échec, ils doivent être consolidés par l'analyse et l'identification des formes d'autophagie induites par les thérapies.

## H. Les outils pour monitorer l'autophagie

Les études de l'autophagie ont toujours été confrontées à un problème majeur : il s'agit d'un processus complexe, dynamique qui doit être analysé avec des mesures statiques. Son étude nécessite donc l'utilisation de plusieurs approches afin de pouvoir réellement tirer des conclusions dans un modèle donné (Mizushima, 2010, Klionsky, 2012).

### 1. Les modulateurs de l'autophagie

On s'intéresse de plus en plus aux modulateurs de l'autophagie, non seulement à des fins de recherche, mais aussi à des fins thérapeutiques potentielles (Figure 23). Il existe plusieurs méthodes différentes pour activer l'autophagie, mais elles manquent de spécificité. L'inducteur physiologique le plus connu de l'autophagie est la condition de carence en acides aminés. Une autre approche pour activer l'autophagie consiste à moduler les voies de signalisation régulant l'autophagie. La meilleure cible est mTOR, avec la rapamycine ou la torine-1, qui est un puissant suppresseur de l'autophagie.

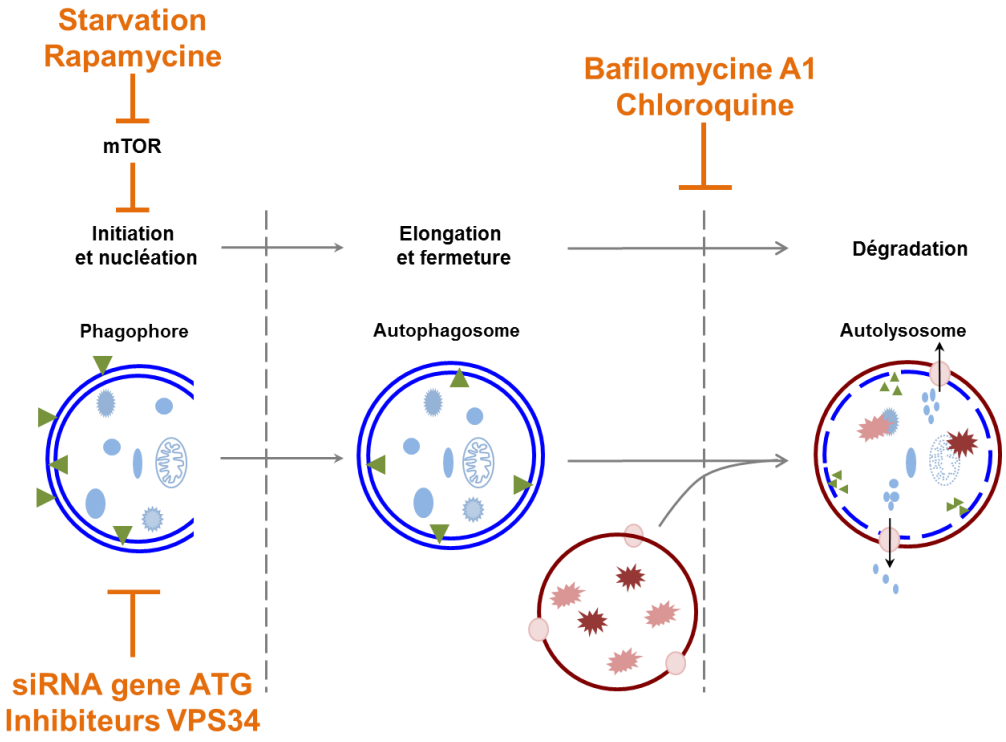



**Figure 24 : Différents modulateurs de l'autophagie.**

L'autophagie peut être activée par une carence en acides aminés (milieux EBSS) ou par des inhibiteurs de la voie mTOR (rapamycine, torine-1). Au contraire, elle peut être inhibée par des inhibiteurs de l'autophagie précoce (inhibiteurs de la voie PI3K, la 3MA ou le SAR405) ou tardif (chloroquine, bafilomycine A1) et par des invalidations des différents gènes de l'autophagie ATG.

Comme la formation d'autophagosome nécessite l'activité de la PI3-kinase de classe III, VPS34, l'une des approches pharmacologiques les plus couramment utilisée pour inhiber l'autophagie *in vitro* implique l'utilisation d'inhibiteurs de la PI3-kinase tels que la wortmanine, LY294002 ou la 3MA (Blommaart, 1997). Récemment, un autre inhibiteur plus spécifique de VPS34, le SAR405, a été décrit comme prometteur pour l'utilisation clinique de l'inhibition de l'autophagie (Ronan, 2014, Pasquier, 2015). Ces approches permettent d'inhiber le processus d'autophagie à des étapes précoces, mais il existe également des inhibiteurs permettant d'inhiber l'autophagie à des étapes plus tardives. C'est le cas de la chloroquine et de la bafilomycine A1 qui altèrent le pH lysosomal ou qui bloquent la fusion d'autophagosomes avec des lysosomes. En plus des inhibiteurs pharmacologiques, une inhibition plus spécifique de la voie d'autophagie peut être obtenue par l'invalidation de différents gènes ATG.

## 2. Les techniques d'imagerie

### *a) La microscopie électronique*

L'autophagie a été initialement détectée dans les années 1950 par des techniques de microscopie électronique. La dégradation de parties du cytoplasme séquestrées par le phagophore (une structure en double membrane sans ribosome), qui évolue en autophagosome (vésicule possédant également une double membrane sans ribosome) est la caractéristique de l'autophagie. Les autophagosomes renferment souvent des organites intracellulaires tels que les mitochondries et des fragments du réticulum endoplasmique (Figure 24). Il est donc facile d'identifier les autophagosomes ainsi que les organites qui y sont séquestrés. Cependant, la distinction des autolysosomes des autres compartiments cellulaires est souvent plus difficile.

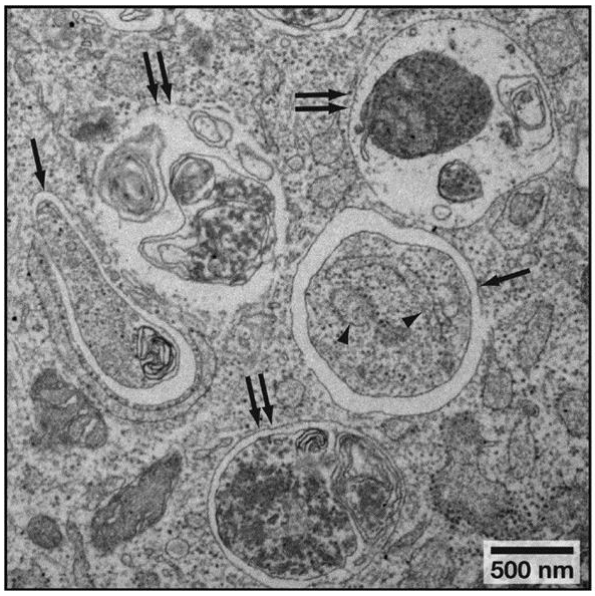


**Figure 25 : Analyse par microscopie électronique de fibroblastes embryonnaires de souris sans nourriture.**
Les flèches indiquent les autophagosomes et les flèches doubles indiquent les autolysosomes (Mizushima, 2010).

Les autolysosomes sont des vésicules générées par la fusion d'un autophagosome et d'un lysosome, qui a une seule membrane et qui contient des matériaux cytoplasmiques à divers stades de dégradation (Figure 24). L'utilisation de la microscopie électronique est une méthode valable et sure à la fois pour l'analyse qualitative et quantitative des changements des diverses structures autophagiques qui se forment séquentiellement, le phagophore et l'autophagosome et l'autolysosome même si ce dernier est plus difficile à distinguer.

### *b) La microscopie à fluorescence*

Comme décrit précédemment, la protéine LC3 est un marqueur de la surface des autophagosomes. Malgré le fait qu'elle possède 4 isoformes, la protéine LC3B est la plus couramment utilisée pour monitorer l'autophagie. Il est possible d'utiliser des anticorps ciblant LC3B ou des constructions de LC3 couplée à la GFP (green fluorescent protein) pour suivre les points représentant les autophagosomes par microscopie à fluorescence. L'avantage de ces approches est qu'elles sont plus simples à mettre en œuvre que la microscopie électronique, mais les structures et les différences entre les vésicules d'autophagie sont plus difficiles à déterminer. En revanche, pour différencier les autophagosomes des autolysosomes, il est possible d'utiliser des doubles sondes fluorescentes GFP-RFP-LC3. Ces constructions exploitent la caractéristique que la GFP est neutralisée à pH acide dans les lysosomes. Ainsi cette double sonde émettra un signal jaune (GFP+RFP) dans les autophagosomes et un signal rouge (RFP) dans les autolysosomes. Lorsque le flux est augmenté, les points jaunes et rouges le sont également (Figure 25).

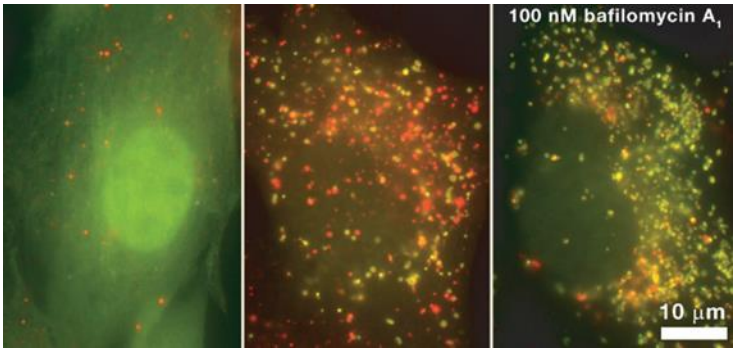



**Figure 26 : Visualisation des vésicules d'autophagie avec la sonde GFP-RFP-LC3 par microscopie à fluorescence.**

A gauche : condition physiologique, au milieu : carence des cellules, à droite : traitement bafilomycine A1 seul. Les points jaunes (autophagosomes) et rouges (autolysosomes) augmentent dans le panneau du milieu, alors que la plupart des points dans le panneau de droite sont jaunes (autophagosomes) (Mizushima, 2010).

### 3. L'étude du flux autophagique

Les méthodes décrites ci-dessus sont utiles pour évaluer le nombre d'autophagosomes cellulaires, ce qui n'est pas toujours un indicateur du niveau d'activité autophagique cellulaire. Le flux autophagique désigne le processus complet d'autophagie, c'est à dire de la formation des autophagosomes jusqu'à la fusion avec le lysosome et donc à la dégradation du matériel séquestré. Ainsi, l'augmentation du taux de LC3 (LC3-II) modifiée par la phosphatidyléthanolamine ou même l'apparition d'autophagosomes ne sont pas des mesures du flux autophagique en soi, mais peuvent refléter l'induction de l'autophagie et / ou l'inhibition de l'élimination des autophagosomes. Ce dernier point peut se produire s'il y a un défaut de fusion entre l'autophagosome et le lysosome.

L'une des principales méthodes utilisées pour mesurer le flux autophagique est le suivi du renouvellement de la protéine LC3. Cette protéine est présente sous deux formes : la forme LC3-I présente dans le cytoplasme et la forme LC3-II qui est liée au phosphatidyléthanolamine et qui est présent à la surface de l'autophagosome. La mesure du flux autophagique est basée sur l'observation que LC3-II est dégradée dans les autolysosomes. Le flux autophagique peut être mesuré en inhibant cette dégradation en présence et en l'absence de traitements inhibant la dégradation de LC3 ce qui va conduire à son accumulation. L'inhibition de la dégradation lysosomale peut être obtenue en utilisant des inhibiteurs de protéases (l'E64d et la pepstatine A), des inhibiteurs tels que la bafilomycine A1, qui empêche la fusion du lysosome avec l'autophagosome ainsi que de son acidification, ou la chloroquine qui altèrent le pH lysosomique ou qui bloquent la fusion d'autophagosomes avec des lysosomes. L'utilisation de ces inhibiteurs nous permettent donc de quantifier les différences dans la quantité de LC3-II entre les échantillons en présence et en l'absence d'inhibiteurs lysosomaux et représentant ainsi la quantité de LC3 qui est délivrée aux lysosomes pour sa dégradation. Et donc d'évaluer si la biogénèse des autophagosomes est stimulée ou pas. Par exemple, les niveaux de LC3-II sont augmentés par traitement avec la chloroquine même dans des conditions physiologiques (comparer les colonnes 1 et 2, Figure 26). Cependant, la différence des niveaux de LC3-II en présence et en absence de chloroquine est plus importante dans les conditions de carences (comparer les voies 3 et 4, Figure 26), ce qui indique que le flux autophagique augmente pendant la carence.

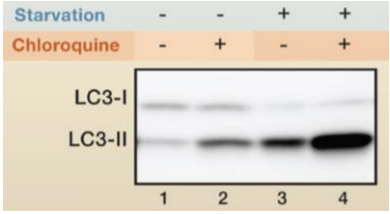



**Figure 27 : Etude du flux autophagique par western blot.**

La condition de carence en présence de chloroquine (colonne 4) montre une quantité de LC3-II plus importante qu'en condition physiologique en présence de chloroquine (colonne 2) traduisant une augmentation du flux autophagique en condition de carence (Mizushima, 2010).

Cette méthode peut également être appliquée en imagerie dans des études de flux par microscopie à fluorescence ou par microscopie électronique. Cependant, ce n'est plus le niveau de LC3-II que l'on compare entre les différentes conditions sous chloroquine ou bafilomycine A1, mais les vésicules d'autophagie.

# V. Contexte scientifique et présentation des études

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sont des hémopathies malignes caractérisées par une accumulation dans la moelle et le sang de progéniteurs hématopoïétiques, appelés blastes, bloqués à un stade de leur différenciation. Le gène *FLT3* est l'un des gènes les plus ciblés par des mutations activatrices qui sont retrouvées dans environ 30% des LAM (Kindler, 2010). La principale mutation de FLT3 identifiée dans les LAM correspond à la mutation ITD (Internal Tandem Duplication) et est présente dans 20-25% des cas. De plus elle est associée à un mauvais pronostic chez les patients atteints de LAM à caryotype normal. FLT3 une donc une cible thérapeutique intéressante dans le traitement des LAM. Actuellement, des inhibiteurs pharmacologiques ciblant FLT3, comme l'AC220 (quizartinib) ou la midostaurine, ont été élaborés et sont en cours d'étude clinique (Pratz, 2017). Cependant, des évidences cliniques suggèrent que la cellule met en place différents mécanismes de résistance comme des mutations secondaires dans le domaine tyrosine kinase comme la mutation D835 (Bagrintseva, 2004). Il est donc nécessaire d'identifier de nouvelles approches pour cibler les cellules leucémiques exprimant le récepteur mutant FLT3-ITD. Si la majorité des efforts est consacrée au développement d'inhibiteurs pharmacologiques, il est également envisageable, non pas de bloquer directement leur activité, mais également de mieux comprendre la biologie des LAM et les différentes voies induites en aval FLT3-ITD.

Un des mécanismes de résistance décrits en réponse aux traitements dans les cellules cancéreuses correspond au processus d'autophagie (Bellodi, 2009).C'est un processus catabolique qui permet la dégradation des protéines et des organites endommagés. Il contribue au maintien de l'homéostasie intracellulaire et permet une adaptation métabolique en réponse à différents stress. Dans les leucémies, l'implication de l'autophagie est encore mal connue, mais il semble que ce processus constitue un mécanisme développé par les cellules tumorales qui leur permet résister à différents types de traitements, et que son inhibition représente une stratégie thérapeutique prometteuse.

Mon projet de thèse, réalisé sous la direction des Drs. Véronique De Mas et Carine Joffre, a été essentiellement focalisé sur l'étude du statut et du rôle de l'autophagie dans la biologie des LAM exprimant l'oncogène FLT3-ITD et si FLT3-ITD pouvait réguler ce mécanisme d'autophagie.

# VI. Activité anti-leucémique de l'inhibition de l'autophagie dans le contexte FLT3-ITD

## 1. Le récepteur FLT3-ITD supporte l'autophagie basale des cellules de LAM

Afin de connaître l'influence du récepteur FLT3-ITD sur le niveau autophagique des cellules leucémiques, nous avons étudié dans un premier temps l'effet de l'inhibition pharmacologique de FLT3 par Western Blot et par immunofluorescence. Pour cela, nous avons utilisé deux lignées cellulaires : les cellules MOLM-14 qui sont hétérozygotes pour le gène *FLT3-ITD* (deux allèles mutés pour un allèle sauvage) et les cellules MV4-11 qui sont homozygotes pour le gène *FLT3-ITD* (deux allèles mutés). Afin d'évaluer le statut autophagique dans ces cellules à la suite de l'inhibition de FLT3, nous avons suivi la protéine LC3 en présence de chloroquine, un inhibiteur de l'autophagie. La protéine LC3 constitue un bon marqueur des vésicules autophagiques grâce à la conversion de sa forme LC3-I, localisée dans le cytoplasme, en LC3-II lié au (phosphatidyléthanolamine) et localisée au niveau de la membrane des autophagosomes. L'inhibition pharmacologique de FLT3 pendant 16h induit une diminution significative de la forme LC3-II, localisée à la membrane des autophagosomes, en présence de chloroquine par rapport à la condition contrôle, traduisant une diminution du flux autophagique (Figure 28 A, B). On observe des effets similaires par cytométrie en flux dans les cellules MOLM-14 (Figure 28 C). De plus, cette diminution du flux autophagique est observée par immunofluorescence dans les cellules MOLM-14. En effet, l'inhibition pharmacologique de FLT3 induit une diminution du nombre d'autophagosomes, traduit par une diminution du marquage LC3 par rapport au contrôle (Figure 28 D, E). Ces premiers résultats suggèrent que l'autophagie basale dans ces cellules est régulée par le récepteur constitutivement actif FLT3-ITD.

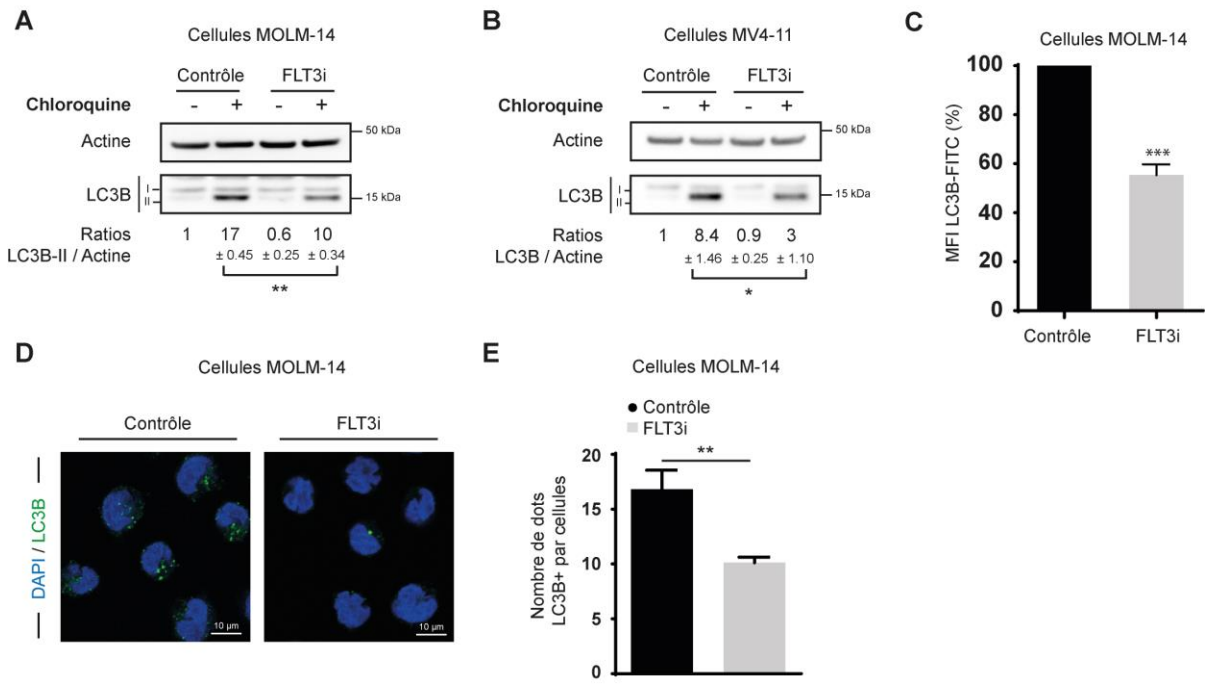



**Figure 28 : L'inhibition pharmacologique de FLT3-ITD diminue l'autophagie basale des cellules.**

**A-B.** Les cellules MOLM-14 (**A**) et MV4-11 (**B**) ont été traitées 16h avec l'inhibiteur de FLT3 à 100 nM (FLT3i) en présence ou non de chloroquine à 15µM. Les cellules ont ensuite été lysées et le niveau de LC3B a été analysé par Western Blot. **C.** Les cellules MOLM-14 ont été traitées pendant 16h avec l'inhibiteur de FLT3 à 100 nM (FLT3i) en présence ou non de chloroquine à 15µM puis ont été marquées avec un anticorps anti-LC3B et analysées par cytométrie en flux. **D-E.** Immunofluoresence de cellules MOLM-14. Les cellules ont été traitées 16h avec l'inhibiteur de FLT3 à 100 nM (FLT3i) en présence de chloroquine puis marquées avec un anticorps anti-LC3B. Les photos ont été prises avec un microscope confocal (**D**) et ont été analysées avec le logiciel Image J (**E**).

Ces observations ont été confirmées avec l'invalidation génétique de FLT3. Nous avons invalidé FLT3 dans les cellules MV4-11 avec un shARN inductible à la doxycycline (don du Dr. Jérôme Tamburini, INSERM U1016 Cochin) et dans les cellules MOLM-14 avec un siARN. La déplétion du récepteur par ces deux méthodes a donné des résultats similaires a ceux obtenus par l'inhibition pharmacologique de FLT3. En effet, la diminution d'expression de FLT3 est associée à une inhibition significative du flux autophagique observée avec la perte de LC3-II (Figure 29 A). L'imagerie confocale a confirmé cette inhibition avec la diminution du nombre d'autophagosomes dans les cellules après induction du shARN FLT3 (Figure 29 B, C). Cette inhibition du flux autophagique a également été observée par Western Blot dans les cellules MOLM-14 traitées avec un siARN dirigé contre FLT3 (Figure 29 D).

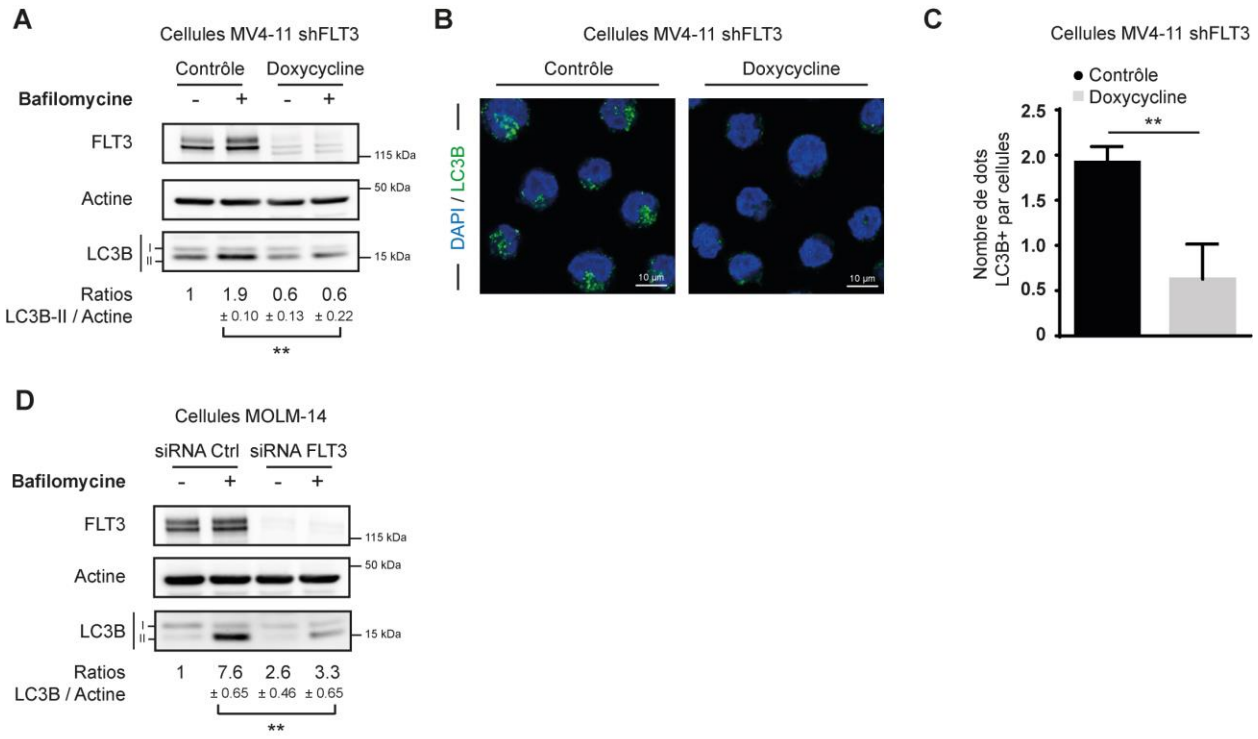



**Figure 29 : L'invalidation génétique de FLT3-ITD diminue l'autophagie basale des cellules.**

**A.** Les cellules MV4-11 shFLT3 ont été traitées 3 jours avec de la doxycycline à 2 µg/mL puis 2h avec de la Bafilomycine à 20 nM. Les cellules ont ensuite été lysées et les niveaux de LC3B et de FLT3 ont été analysés par Western Blot. **B-C.** Immunofluoresence de cellules MV4-11 shFLT3. Les cellules ont été traitées 3 jours avec de la doxycycline en présence de bafilomycine puis marquées avec un anticorps anti-LC3B. Les photos ont été prises avec un microscope confocal ZEISS 710 (**B**) et analysées avec le logiciel Image J (**C**). **D.** Les cellules MOLM-14 ont été traitées 16h avec un siARN dirigé contre FLT3 puis 2h avec de la Bafilomycine à 20 nM. Les cellules ont ensuite été lysées et les niveaux de LC3B et de FLT3 ont été analysés par Western Blot.

Afin de confirmer la relation entre l'induction de l'autophagie et le récepteur FLT3-ITD, nous avons évalué le niveau basal d'autophagie dans des cellules exprimant de manière ectopique le récepteur muté FLT3-ITD. Nous avons utilisé les cellules TF-1 qui sont des cellules humaines érythroblastiques qui n'expriment pas naturellement le récepteur FLT3. Ces cellules ont été transduites avec un vecteur d'expression codant pour le récepteur FLT3-ITD (don du Dr Paulo De Sepulveda, INSERM U1068 CRCM). Nous avons pu observer par Western Blot (Figure 30 A) et par immunofluorescence (Figure 30 B, C) que les cellules TF-1 exprimant le récepteur FLT3-ITD de manière ectopique présentent une autophagie basale plus importante que dans les cellules TF-1 parentales. Ces résultats confirment que l'expression de FLT3-ITD augmente le niveau basal d'autophagie de ces cellules.

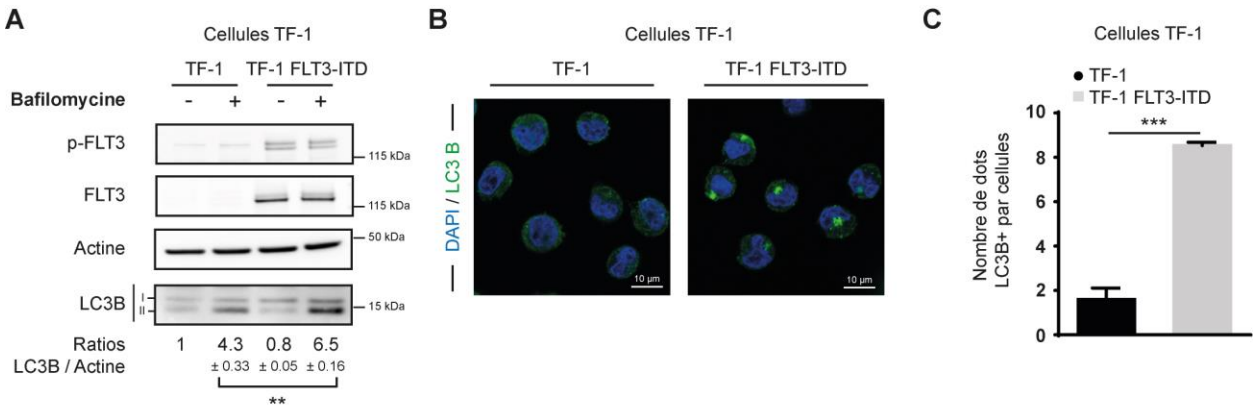



**Figure 30 : L'expression de FLT3-ITD augmente l'autophagie basale des cellules.**

**A.** Les cellules TF-1 ont été traitées 2h avec de la bafilomycine à 20nM. Les cellules ont ensuite été lysées et le niveau de LC3B et de FLT3 a été analysé par Western Blot. **B-C.** Immunofluoresence de cellules TF-1. Les cellules ont été traitées 2h avec de la bafilomycine à 20nM puis marquées avec un anticorps anti-LC3B et le DAPI. Les photos ont été prises par microscopie confocale (**B**) et analysées avec le logiciel Image J (**C**).

Nous avons voulu par la suite valider si FLT3-ITD pouvait également réguler l'autophagie basale dans des échantillons primaires de patient. Nous avons donc comparé l'impact de l'inhibition de FLT3 sur l'autophagie dans des cellules primaires de LAM exprimant le récepteur FLT3-ITD ou le récepteur FLT3 sauvage. Ces échantillons sont issus du centre de ressources biologiques HIMIP (Hémopathies Malignes INSERM Midi-Pyrénées). Comme le montrent les figures 31 A, B et C, l'inhibition de FLT3 diminue l'autophagie basale des cellules de patients exprimant le récepteur FLT3-ITD. Cependant, l'inhibition de FLT3 ne change pas le statut autophagique des cellules de patient exprimant le récepteur FLT3 sauvage (Figure 31 D, E). L'ensemble de ces résultats montre que l'expression et l'activité de FLT3-ITD sont responsables d'une augmentation de l'autophagie basale dans les cellules.

L'ensemble de ces résultats démontre que la signalisation dépendante de FLT3 promeut l'autophagie

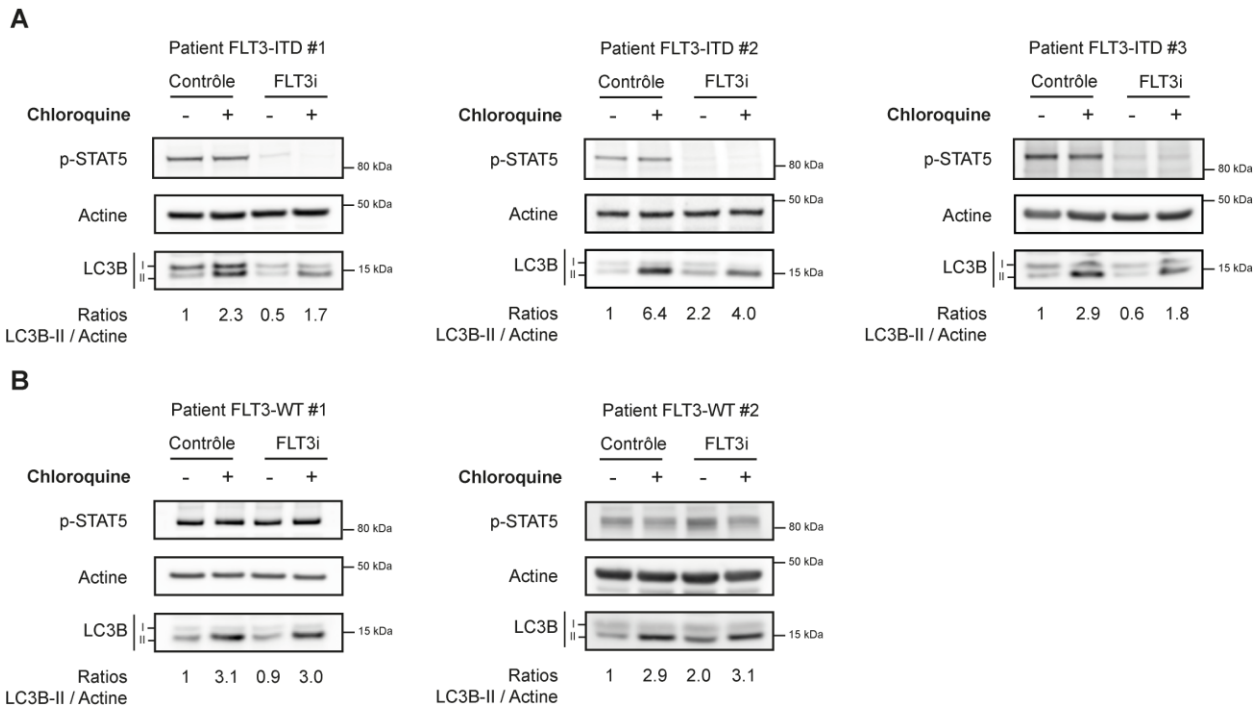



**Figure 31 : L'inhibition pharmacologique de FLT3-ITD diminue l'autophagie basale des cellules primaires.**

**A-B.** Les cellules de patients exprimant le récepteur oncogénique FLT3-ITD (**A**) et les cellules de patients exprimant le récepteur sauvage FLT3 (**B**) ont été traitées 16h avec l'inhibiteur de FLT3 à 100 nM (FLT3i) en présence ou non de chloroquine à 15µM. Les cellules ont ensuite été lysées et le niveau de LC3B a été analysé par Western Blot.

## 2. L'autophagie est essentielle à la prolifération des cellules FLT3-ITD

Nous nous sommes ensuite demandé quel était le rôle de cette importante autophagie basale contrôlée par FLT3-ITD. Pour répondre à cette question, nous avons étudié la conséquence de l'inhibition de l'autophagie dans ces cellules sur la prolifération et l'apoptose. Dans un premier temps, nous avons inhibé l'autophagie avec un inhibiteur pharmacologique, le SAR405. Cette inhibiteur a été récemment décrit pour bloquer l'initiation de l'autophagie en ciblant spécifiquement la protéine VPS34 du complexe PI3K (Ronan, 2014, Pasquier, 2015). L'effet de cet inhibiteur sur la prolifération et la viabilité des cellules MOLM-14 et MV4-11 a été analysé par comptage au bleu trypan et par cytométrie en flux. Comme le montre la figure 32 A, le SAR405 inhibe l'autophagie dans nos cellules. En effet, l'accumulation de LC3-II est moins importante dans la condition traitée avec le SAR405 après blocage du flux par la bafilomycine. Cette inhibition de l'autophagie est accompagnée d'une diminution d'environ 50 % de la prolifération des cellules (Figure 32 B), sans pour autant induire significativement de mort cellulaire (Figure 32 C). Etant donné le faible effet sur la mort cellulaire, nous nous sommes demandé si l'autophagie avait un impact sur le cycle cellulaire. Après un marquage en iodure de propidium en présence ou non de SAR405, nous avons pu voir que l'inhibition de prolifération est associée à une accumulation significative des cellules en phase G1 du cycle cellulaire, selon un mécanisme qui reste

encore à déterminer (Figure 32 D). Ces résultats montrent que l'autophagie régule la prolifération et le cycle cellulaire dans le modèle FLT3-ITD.

Enfin, nous avons ensuite regardé si la dépendance des cellules pour le processus autophagique était restreinte à la mutation FLT3-ITD. Pour cela, nous avons utilisé une lignée de LAM sur-exprimant le récepteur FLT3 sauvage mais ne présentant pas la mutation FLT3-ITD, les cellules OCI AML3. Dans cette lignée, l'inhibition de l'autophagie n'impacte pas la prolifération et la survie des cellules (Figure 32 E, F). L'autophagie semble donc nécessaire à la prolifération cellulaire uniquement dans les cellules expriment le mutant FLT3-ITD. Des résultats similaires ayant été obtenus avec des inhibiteurs de FLT3, l'autophagie semble donc nécessaire à la prolifération de cellules dont la progression dans le cycle dépend de FLT3-ITD. Ces résultats originaux indiquent que l'autophagie pourrait réguler des protéines contrôlant le cycle cellulaire

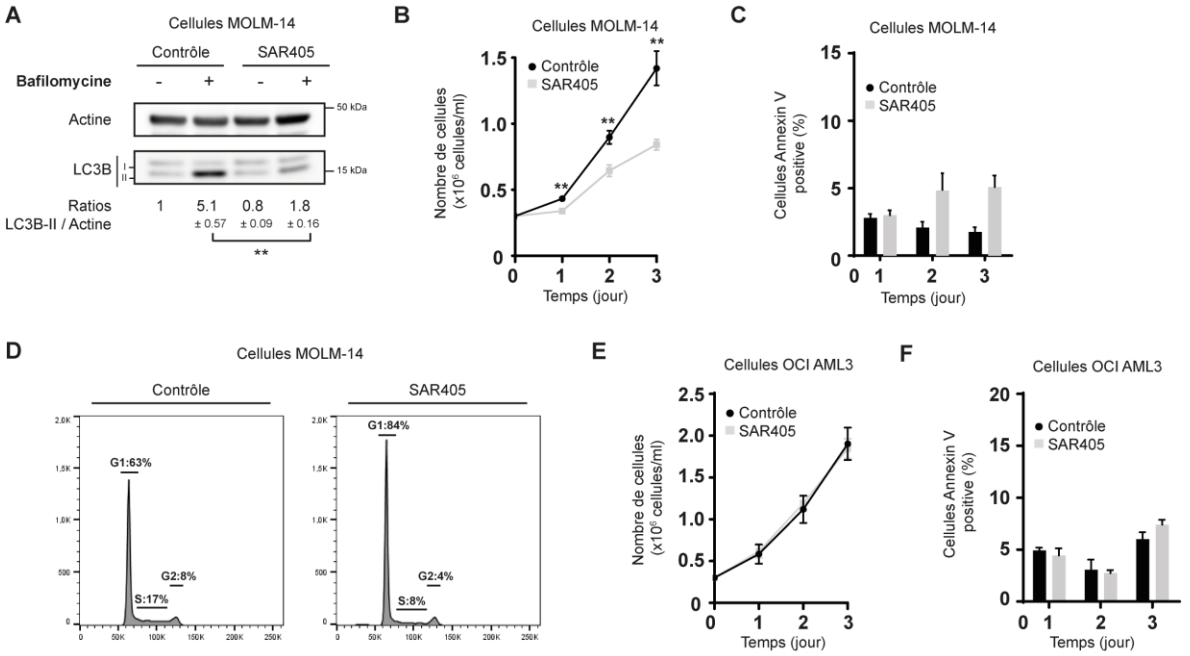



**Figure 32 : L'inhibition pharmacologique de l'autophagie diminue la prolifération des cellules exprimant le récepteur FLT3-ITD.**

**A.** Les cellules MOLM-14 ont été traitées pendant 3 jours avec l'inhibiteur de l'autophagie, le SAR405 à 3 µM, en présence ou non de bafilomycine à 20 nM. Les cellules ont ensuite été lysées et le niveau de LC3B a été analysé par Western Blot. **B-D.** Les cellules MOLM-14 ont été traitées pendant 3 jours avec le SAR405 à 3 µM et ont été comptées chaque jour par exclusion au bleu trypan (B), leur survie a été observée par marquage Annexin V par cytométrie en flux (C) et leur cycle cellulaire a été observé par marquage en iodure de propidium par cytométrie en flux (D). **E-F.** Les cellules OCI AML3 ont été traitées pendant 3 jours avec le SAR405 à 3 µM et ont été comptées chaque jour par exclusion au bleu trypan (E) et leur survie a été observée par marquage Annexin V par cytométrie en flux (F).

Afin de regarder plus spécifiquement et par une autre approche l'implication de l'autophagie dans nos cellules, nous avons généré des modèles cellulaires dans lesquels nous avons invalidé des gènes clés de l'autophagie. Pour cela, nous avons utilisé des constructions lentivirales de shARN inductibles à la

doxycycline contenant des séquences ciblant ATG12 ou ATG5 que nous avons introduites dans les cellules MOLM-14 et MV4-11. Comme montré, l'addition de doxycycline invalide l'expression d'ATG12 ou d'ATG5 et diminue le flux autophagique dans les lignées cellulaires générées (Figure 33 A, D, F et H). Comme observé après traitement avec le SAR405, l'inhibition pharmacologique de l'autophagie après l'induction des shARN conduit à une inhibition importante de la prolifération cellulaire sans ou presque de mortalité cellulaire par rapport au shARN contrôle (Figure 33 B, C E G et I). Ces résultats confirment donc ceux obtenus avec le SAR405.

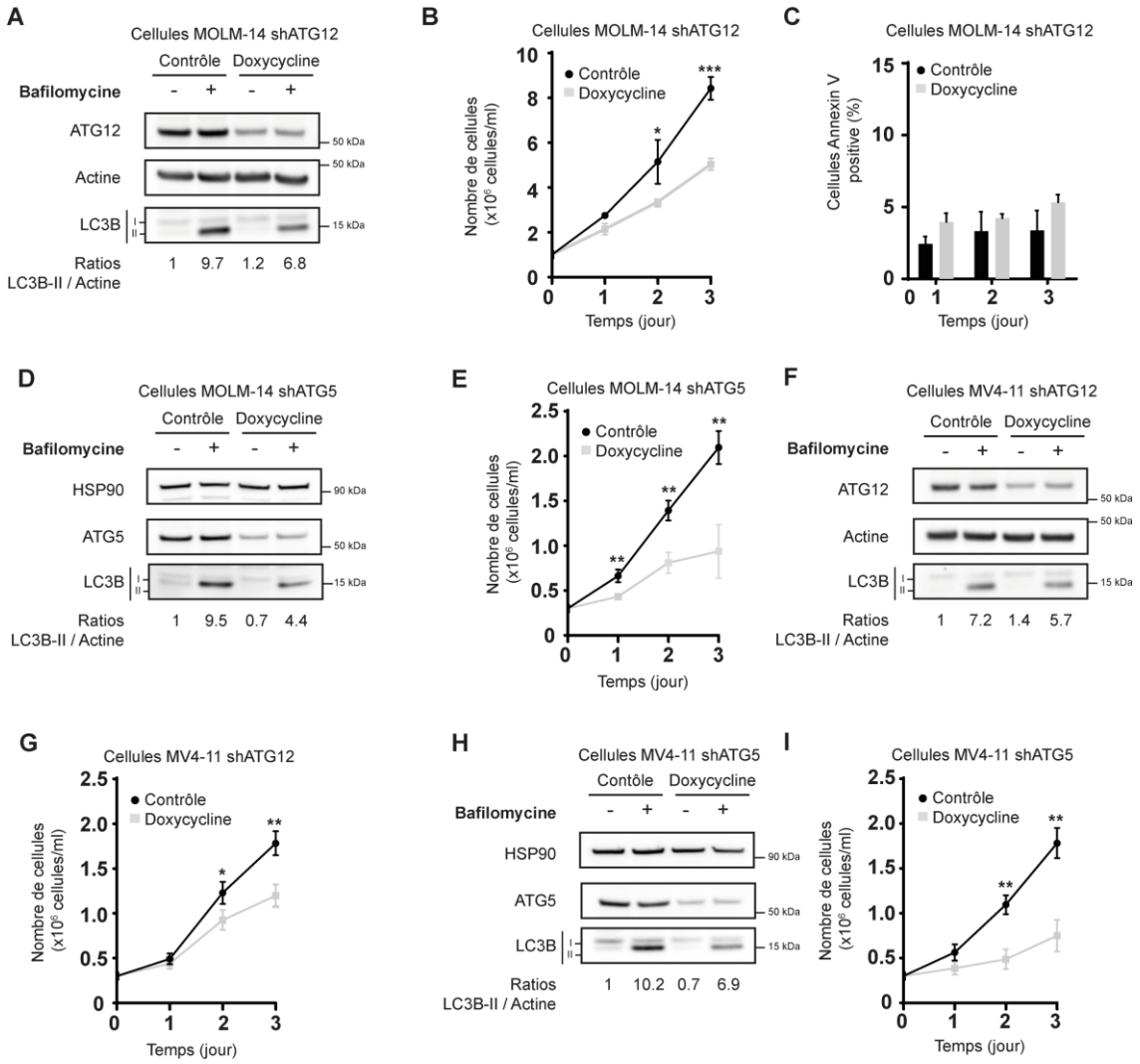



**Figure 33 : L'invalidation génétique de gène de l'autophagie diminue la prolifération des cellules exprimant le récepteur FLT3-ITD.**

Les lignées MOLM-14 ou MV4-11 ont été transduites avec des lentivirus contenant des séquences de shARN dirigées contre ATG12 ou ATG5. Les cellules exprimant de manière stable les vecteurs ont été sélectionnées par puromycine. **A.** Les cellules MOLM-14 shATG12 ont été traitées pendant 3 jours avec de la doxycycline à 2µg/mL, en présence ou non de bafilomycine à 20 nM. Les cellules ont ensuite été lysées et le niveau de LC3B a été analysé par Western Blot. **B-C.** Les cellules MOLM-14 shATG12 ont été traitées pendant 3 jours avec de la doxycycline à 2µg/mL et ont été comptées chaque jour par exclusion au bleu trypan (**B**) et leur survie a été observée par marquage Annexin V par cytométrie en flux (**C**). **D.** Les cellules MOLM-14 shATG5 ont été traitées pendant 3 jours avec de la doxycycline à 2µg/mL, en présence ou non de bafilomycine à 2 nM. Les cellules ont ensuite été lysées et le niveau

de LC3B a été analysé par Western Blot. **E.** Les cellules MOLM-14 shATG5 ont été traitées pendant 3 jours avec de la doxycycline et ont été comptées chaque jour par exclusion au bleu trypan. **F.** Les cellules MV4-11 shATG12 ont été traitées pendant 3 jours avec de la doxycycline à 2µg/mL, en présence ou non de bafilomycine à 2 nM. Les cellules ont ensuite été lysées et le niveau de LC3B a été analysé par Western Blot. **G.** Les cellules MV4-11 shATG12 ont été traitées pendant 3 jours avec de la doxycycline à 2µg/mL et ont été comptées chaque jour par exclusion au bleu trypan. **H.** Les cellules MV4-11 shATG5 ont été traitées pendant 3 jours avec de la doxycycline à 2µg/mL, en présence ou non de bafilomycine à 2 nM. Les cellules ont ensuite été lysées et le niveau de LC3B a été analysé par Western Blot. **I.** Les cellules MV4-11 shATG5 ont été traitées pendant 3 jours avec de la doxycycline et ont été comptées chaque jour par exclusion au bleu trypan.

Au vu de ces résultats, nous avons évalué l'impact de l'inhibition de l'autophagie sur la prolifération cellulaire et l'apoptose dans des cellules exprimant de manière ectopique le récepteur muté FLT3-ITD. Les cellules TF-1 et TF-1 FLT3-ITD ont été infectées avec un vecteur lentiviral contenant un shARN dirigé contre la protéine ATG12. Concernant les cellules TF-1 parentales, n'exprimant pas le récepteur FLT3-ITD, l'inhibition de l'autophagie impacte faiblement la prolifération des cellules (Figure 34 A, B). Cependant, l'expression du shARN ATG12 dans les cellules TF-1 FLT3-ITD inhibe significativement la prolifération des cellules (Figure 34 B, C). L'ensemble de ces observations montrent que les cellules exprimant le récepteur FLT3-ITD sont dépendantes de l'autophagie pour proliférer.

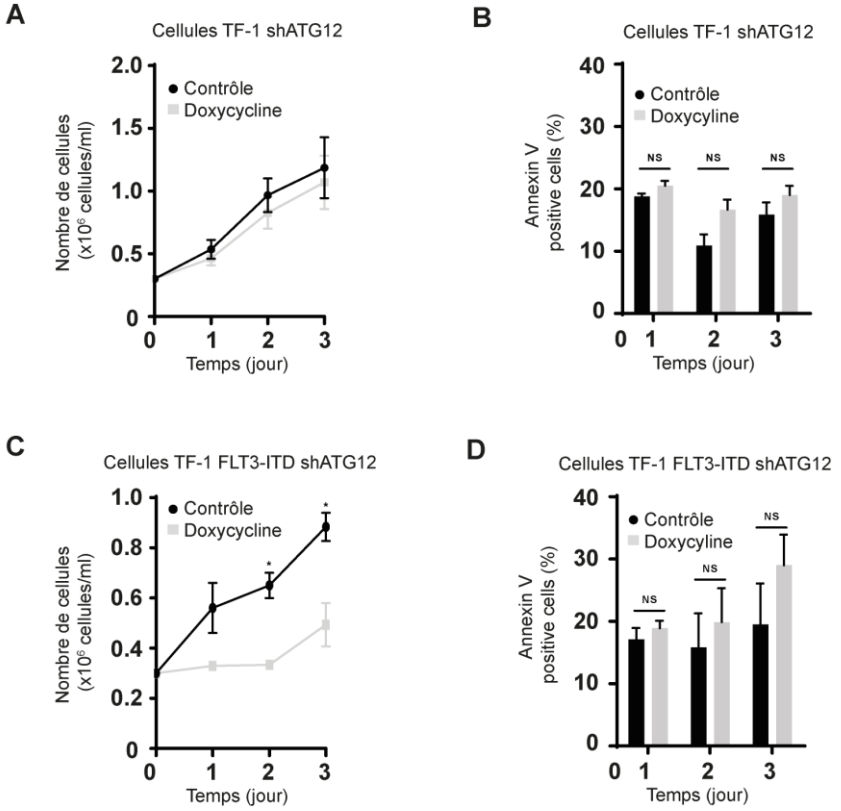



**Figure 34 : Les cellules exprimant le récepteur FLT3-ITD de manière ectopique deviennent dépendantes de l'autophagie pour proliférer.**

Les lignées TF-1 ou TF-1 FLT3-ITD ont été transduites avec des lentivirus contenant des séquences de shARN dirigées contre ATG12 ou ATG5. Les cellules exprimant de manière stable les vecteurs ont été sélectionnées par puromycine. **A-B.** Les cellules TF-1 ont été traitées pendant 3 jours avec de la doxycycline à 2 µg/mL et ont été comptées chaque jour par exclusion au bleu trypan (A) et leur survie a été observée par marquage à l'annexine V par

cytométrie en flux (B). **C-D.** Les cellules TF-1 FLT3-ITD ont été traitées pendant 3 jours avec de la doxycycline à 2 µg/mL et ont été comptées chaque jour par exclusion au bleu trypan (C) et leur survie a été observée par marquage à l'annexine V par cytométrie en flux (D).

### 3. L'inhibition de l'autophagie réduit la charge tumorale chez la souris

Nous avons ensuite poursuivi notre travail sur des modèles murins *in vivo*. Pour cela, nous avons injecté deux millions de cellules MOLM-14 exprimant soit un shARN dirigé contre ATG5 ou un shARN contrôle dans la circulation sanguine au niveau de la veine de la queue de souris NSG (NOD scid gamma). Ces souris ne possèdent pas de lymphocytes T, de lymphocytes B et de cellules NK, les rendant ainsi très immunodéprimées et nous permettent donc de créer un modèle leucémique *in vivo* (Saland, 2015). Directement après injection des cellules, les souris sont traitées avec la doxycycline à 0,2 mg/mL introduite *per os* dans l'eau des biberons pour induire l'expression des shARN et ainsi inhiber l'autophagie. Après 25 jours de traitement, une partie des souris ont été sacrifiées et disséquées. Les cellules humaines de la moelle osseuse et de la rate des souris ont été triées par cytométrie en flux avec un marquage $hCD45^+/hCD33^+$ (Figure 35 A). Le pourcentage de cellules leucémiques humaines $hCD45^+/hCD33^+$ est très nettement diminué dans la moelle osseuse et la rate des souris injectées avec les cellules MOLM-14 shARN ATG5 (Figure 35 B, C). De plus, l'infiltration de la moelle osseuse par des cellules leucémiques humaines a également été observée par microscopie avec une coloration au May-Grünwald-Griemsa de coupes de sternum. Comme le montre la figure 35 D, les cellules MOLM-14 shCtrl ont complètement envahi la moelle osseuse des souris alors que dans les souris shARN ATG5, on note une réduction de cette infiltration. En plus de la réduction de l'envahissement par les cellules humaines leucémiques, l'expression des shARN ATG5 a permis d'améliorer significativement la survie des souris comparé aux souris injectées avec un shARN Ctrl (Figure 34 E). Afin de conforter l'importance du mécanisme d'autophagie, nous avons réalisé la même expérience avec un shARN ciblant un autre gène clé de l'autophagie, ATG12. Comme le montre la Figure 34 F, la déplétion d'ATG12 et donc l'inhibition de l'autophagie améliore de façon importante comme précédemment la survie des souris. L'ensemble de ces résultats démontrent donc que le processus autophagique est essentiel à la prolifération des cellules exprimant le récepteur FLT3-ITD.

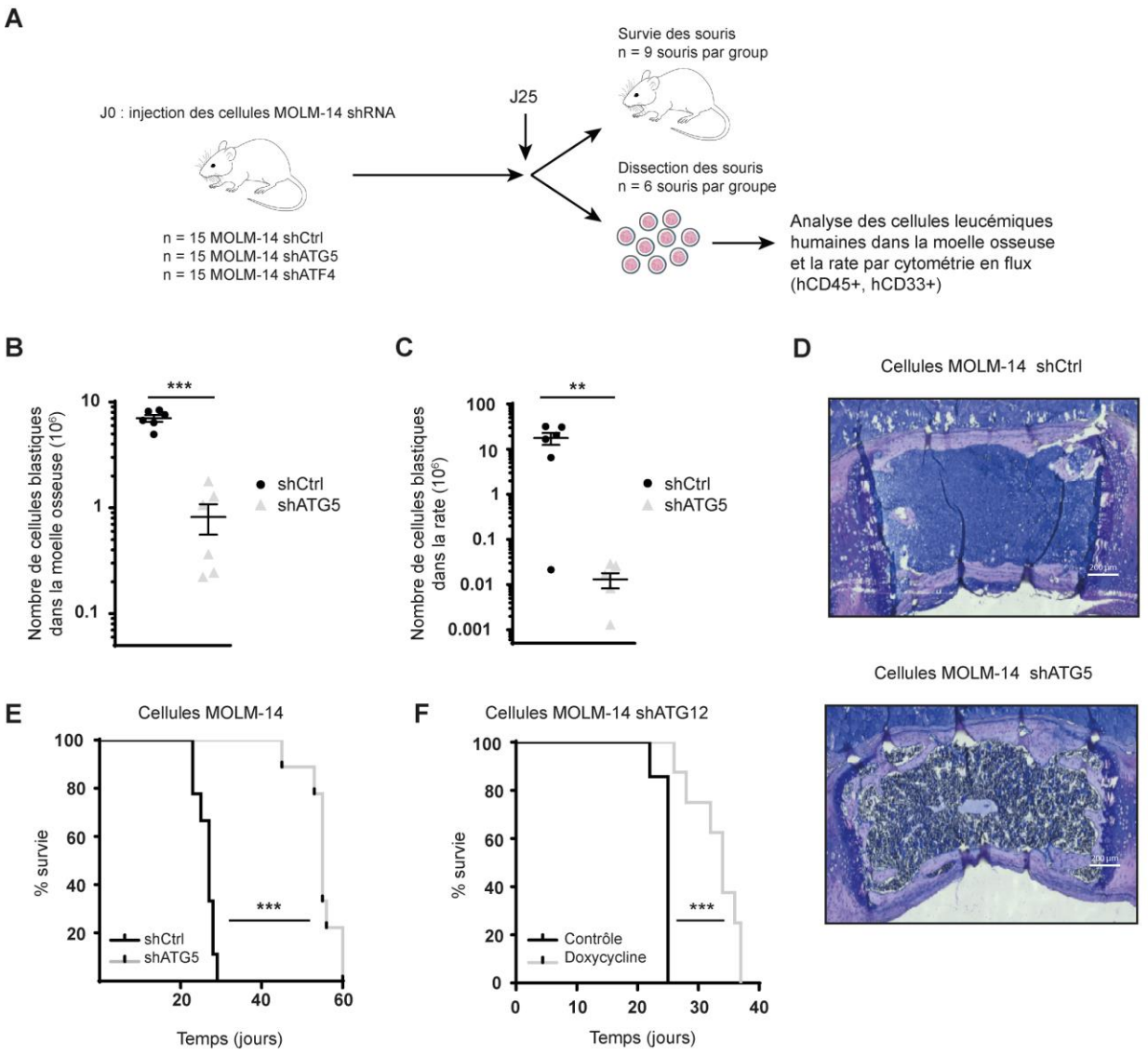



**Figure 35 : Inhiber l'autophagie réduit l'envahissement des cellules leucémiques humaines et augmente la survie des souris.**

**A.** Les souris NSG ont été xénogreffées avec deux millions de cellules MOLM-14, exprimant un shARN (ATG5 ou ATG12), par injection intra-veineuse. Après injection, les souris sont traitées avec du sucrose (10 µg/mL) et de la doxycycline (200µg/mL) dans leur eau. Après 25 jours de traitement, 6 souris par groupe sont sacrifiées et disséquées et le nombre de cellules humaines leucémiques présent dans la moelle osseuse ou la rate est analysé par cytométrie en flux. Les 9 autres souris par groupe sont gardées afin de suivre leur survie au cours du temps. **B-C.** Graphique représentant le nombre de cellules humaines hCD45+/hCD33+ dans la moelle osseuse ou la rate. **D.** Coupe de sternum colorée au MGG (May-Grünwald-Griemsa) de souris injectées avec les cellules MOLM-14 exprimant un shARN contrôle ou shATG5. **E-F.** Graphique représentant la survie des souris au cours du temps (courbe Kaplan-Meier).

## 4. Les cellules résistantes aux inhibiteurs de FLT3 sont sensibles à l'inhibition de l'autophagie

Etant donné l'importance de l'autophagie dans la survie des cellules exprimant le récepteur FLT3-ITD, nous nous sommes demandé si c'était également le cas dans des cellules FLT3-ITD qui ont développé une résistance aux inhibiteurs de FTT3. Comme décrit en introduction, un des principaux mécanismes de résistance dans les LAM FLT3-ITD correspond à l'apparition d'une deuxième mutation correspondant à gain de fonction au niveau du domaine tyrosine kinase. Nous avons donc utilisé des cellules MOLM-14 dans lesquelles un allèle mutant FLT3-D834Y a été introduit pour simuler une résistance des cellules MOLM-14 aux inhibiteurs de tyrosines kinases comme l'AC220. Ces cellules résistantes sont appelées MOLM-14 TKD (Tyrosine Kinase Domain).

Dans un premier temps, nous avons regardé dans ces cellules l'effet de l'inhibition pharmacologique de l'autophagie en incubant les cellules MOLM-14 TKD avec du SAR405 en présence ou non de bafilomycine pendant trois jours. Comme le montre la Figure 36 A, le SAR405 inhibe l'autophagie dans ce modèle cellulaire. De plus, l'inhibition de l'autophagie induit des réponses cellulaires similaires aux résultats obtenus dans le modèle FLT3-ITD. En effet, l'inhibition de l'autophagie induit une diminution de la prolifération cellulaire (Figure 36 B) qui n'est pas accompagnée par une mortalité cellulaire (Figure 35 C) mais qui est plutôt associée à un faible blocage des cellules en phase G1 du cycle cellulaire (Figure 35 D). Afin de valider ces résultats, nous avons inhibé l'autophagie dans ces cellules par une autre méthode. Comme précédemment nous avons généré une lignée MOLM14-TKD exprimant un shARN inductible dirigé contre ATG12. L'addition de doxycycline dans cette nouvelle lignée invalide l'expression d'ATG12 ainsi que le flux autophagique (Figure 36 E). De façon intéressante, l'inhibition de l'autophagie dans cette lignée résistante aux inhibiteurs est, comme dans les lignées sensibles, accompagnée d'une inhibition de la prolifération cellulaire (Figure 36 F). Enfin, nous avons regardé si l'inhibition de l'autophagie dans ce modèle permettait également de réduire le développement de la leucémie chez la souris. Nous avons donc injecté les cellules MOLM-14 TKD shATG12 en suivant le même protocole que pour les cellules MOLM-14 shATG5 ou shATG12. La survie des souris traitées avec la doxycycline est nettement améliorée comparé aux souris contrôles (Figure 36 G). Ces résultats très importants montrent que cibler l'autophagie pourrait représenter une option thérapeutique prometteuse chez des patients réfractaires aux inhibiteurs de FLT3.

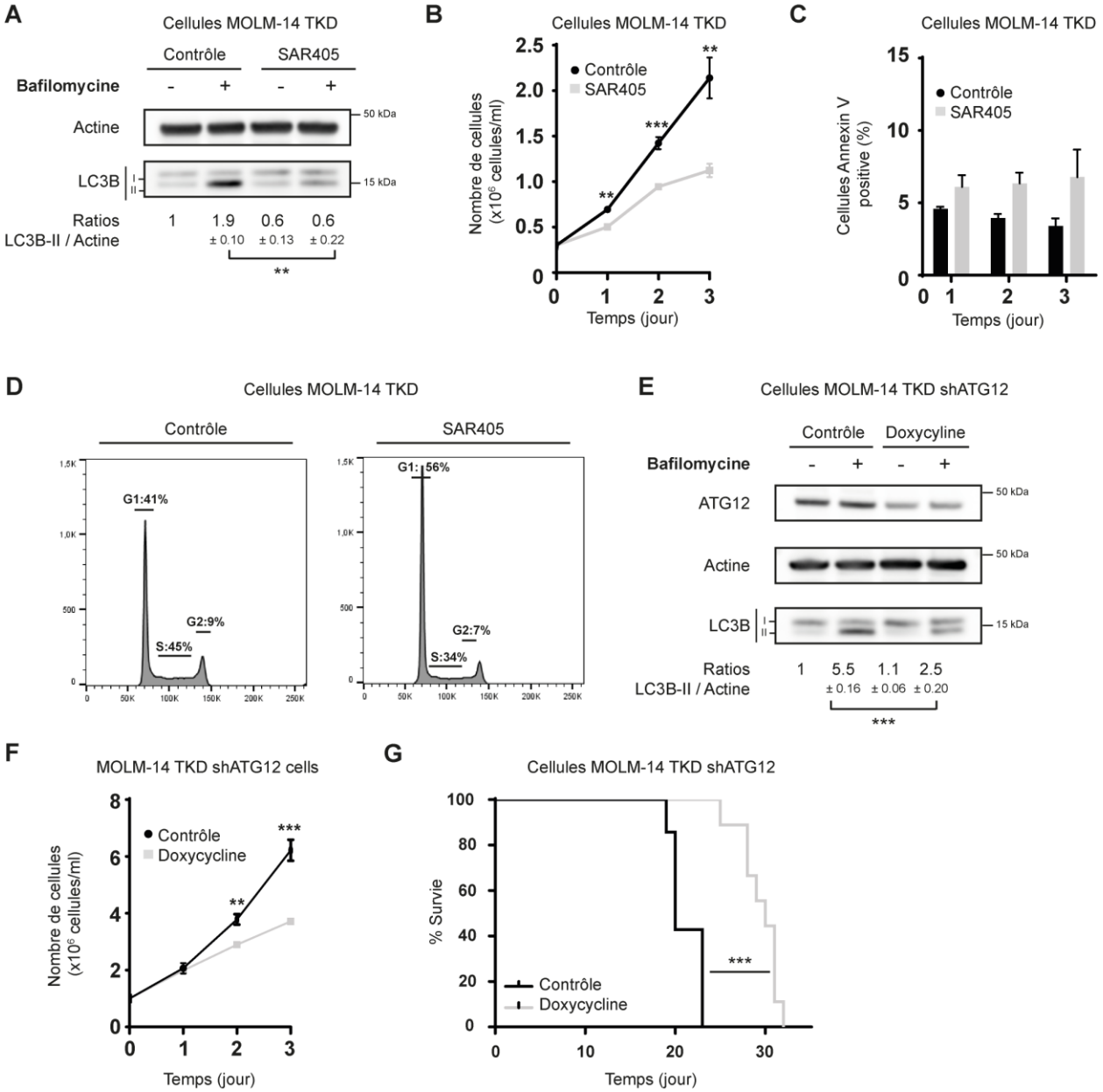



**Figure 36 : L'inhibition de l'autophagie réduit la capacité des cellules résistantes aux inhibiteurs de FLT3 à se développer *in vitro* et *in vivo*.**

**A.** Les cellules MOLM-14 TKD ont été traitées pendant 3 jours avec le SAR405 à 3 µM en présence ou non de bafilomycine à 50 nM. Les cellules ont ensuite été lysées et le niveau de LC3B a été analysé par Western Blot. **B-D.** Les cellules MOLM-14 TKD ont été traitées pendant 3 jours avec le SAR405 à 3 µM et ont été comptées chaque jour par exclusion au bleu trypan (B), leur survie a été observée par marquage Annexin V par cytométrie en flux (C) et leur cycle cellulaire a été observé par marquage en iodure de propidium par cytométrie en flux (D). **E.** Les cellules MOLM-14 TKD shATG12 ont été traitées pendant 3 jours avec de la doxycycline à 2µg/mL, en présence ou non de bafilomycine à 2 nM. Les cellules ont ensuite été lysées et le niveau de LC3B a été analysé par Western Blot. **F.** Les cellules MOLM-14 TKD shATG12 ont été traitées pendant 3 jours avec de la doxycycline à 2 µg/mL et ont été comptées chaque jour par exclusion au bleu trypan. **G.** Les souris NSG ont été xénogreffées avec des cellules MOLM-14 TKD exprimant un shARN ATG12, par injection intraveineuse. Après injection, les souris sont traités avec du sucrose (10 µg/mL) et de la doxycycline (200µg/mL) dans leur eau. Le graphique représente la survie des souris au cours du temps (courbe Kaplan-Meier).

## 5. Résumé et discussion

Dans ce travail, nous avons étudié la relation entre l'activation oncogénique de FLT3 et le processus d'autophagie dans les LAM. Nous avons mis en évidence que le récepteur FLT3-ITD augmente l'autophagie cellulaire basale et que cette autophagie est essentielle à la prolifération mais a peu d'impact sur la survie des cellules leucémiques exprimant le récepteur FLT3-ITD (ou FLT3-TKD) *in vitro*. *In vivo*, l'autophagie induite par FLT3-ITD est indispensable au développement de la leucémie.

Dans la première partie de ce travail, nous avons étudié le niveau basal d'autophagie dans les cellules de LAM exprimant le récepteur FLT3-ITD. Nous avons pu démontrer que le récepteur oncogénique augmente significativement le niveau basal d'autophagie des cellules leucémiques par expression ectopique du récepteur mais également par inhibition pharmacologique ou génétique de FLT3. Nous avons également observé que l'induction de l'autophagie en aval de FLT3 est dépendante de l'activité oncogénique de FLT3-ITD dans des échantillons primaires de patient. Cependant, certains points doivent être approfondis. En effet, il serait intéressant de comparer l'autophagie basale des cellules de même fond génétique qui expriment le récepteur FLT3-ITD ou le récepteur sauvage. En effet, malgré les différentes méthodes utilisées pour analyser l'induction de l'autophagie en aval de FLT3-ITD, il nous manque un contrôle pour définir l'activation spécifique de l'autophagie en aval de ce récepteur muté. Pour cela, nous sommes en train de mettre en place une technique de CRISPR-CAS9. Cette technique nous permettra d'établir deux lignées cellulaires qui possèdent le même fond génétique mais qui expriment soit le récepteur FLT3 sauvage soit le récepteur muté FLT3-ITD. Nous utiliserons les cellules OCI AML3 qui sont homozygotes pour le gène sauvage de FLT3. Dans ces cellules, nous allons rajouter la mutation ITD dans le gène de FLT3 afin de permettre aux cellules d'exprimer le récepteur muté FLT3-ITD. En plus de ces manipulations, nous devons multiplier nos données sur les échantillons primaires de patient. Multiplier le nombre d'échantillon de patient nous permettra également de savoir si les cellules de patient exprimant le récepteur FLT3-ITD possèdent une autophagie basale plus élevée que dans les cellules de patient exprimant le récepteur sauvage. La difficulté que nous avons à ce niveau réside dans la décongélation des échantillons primaires de patient. En effet, la décongélation des cellules engendre un grand stress traduit par une forte autophagie cellulaire qui ne dépend pas de l'activité de FLT3-ITD. Nous utilisons donc des échantillons primaires de patient fraichement prélevés afin de pouvoir effectuer nos expériences.

Nos résultats corrèlent avec les données de la littérature qui montrent que des oncogènes peuvent augmenter le niveau basal d'autophagie dans les cancers. En effet, de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses présentent un haut niveau basal d'autophagie dans des conditions physiologiques et en absence de stress cellulaire. Ceci est le cas pour les mutations activatrices de Ras. En effet, la présence de cet oncogène dans les cellules est suffisante pour augmenter l'autophagie basale (Guo, 2011). D'autres études montrent que dans les mélanomes l'oncogène B-Raf$^{V600E}$ induit un stress du réticulum

endoplasmique qui engendre une activation de l'autophagie responsable de la chimiorésistance des tumeurs (Corazzari, 2015). Ces résultats suggèrent que l'activation d'oncogènes au sein de la cellule peut induire un stress qui active l'autophagie pour maintenir l'homéostasie intracellulaire. La relation entre l'autophagie basale des cellules et les oncogènes a été très peu étudiée dans les leucémies. A ce jour, une seule donnée de la littérature montre que dans les leucémies myéloïdes chroniques, l'oncogène BCR-ABL augmente l'autophagie basale des cellules leucémiques (Colecchia, 2015). De ce fait, nos résultats sont les premiers montrant qu'un récepteur à activité tyrosine kinase muté est associé à une augmentation du niveau d'autophagie dans les leucémies aiguës myéloïdes.

Nous avons ensuite étudié l'importance de l'autophagie en aval de FLT3-ITD sur la prolifération des cellules. Par des approches d'inhibition pharmacologique avec le SAR405, un inhibiteur de la PI3K de classe III VPS34, ou d'invalidation génétique des protéines ATG12 et ATG5, nous avons montré que l'autophagie est nécessaire à la prolifération des cellules exprimant l'oncogène FLT3-ITD. Dans cette étude, nous avons également étudié l'importance de l'autophagie dans des cellules qui expriment une autre mutation activatrice de FLT3, la mutation TKD. Cette mutation confère une résistance aux différents inhibiteurs de tyrosines kinases. Nous avons montré que les cellules leucémiques exprimant cette mutation sont également dépendantes de l'autophagie pour se développer *in vitro* et *in vivo*. Ceci suggère fortement que les mutations activatrices de FLT3 induisent une dépendance des cellules vis-à-vis de l'autophagie mais que ce n'est pas le cas pour les cellules de LAM exprimant le récepteur FLT3 sauvage. Il est intéressant de noter que contrairement à ce qui est observé pour d'autres cellules cancéreuses exprimant un oncogène, l'inhibition de l'autophagie dans le modèle FLT3 muté n'induit quasiment pas de mort cellulaire. Ceci montre que l'autophagie supporte la prolifération des cellules exprimant le récepteur FLT3-ITD

La question est de savoir comment l'autophagie supporte la prolifération des cellules et comment elles réagissent à une inhibition de l'autophagie. Plusieurs hypothèses peuvent être émises. Premièrement, les cellules peuvent modifier leur métabolisme pour contourner les problèmes fonctionnels mitochondriaux causés par l'inhibition de l'autophagie. En effet, les défauts d'autophagie dans les cellules normales ou cancéreuses peuvent induire une augmentation du processus glycolytique ou de la glutaminolyse pour faire face aux mitochondries défectueuses (Wu, 2009, Willems, 2013). La dépendance des cellules à la glutamine après inhibition de l'autophagie peut prédire ce mécanisme. Un autre mécanisme peut compenser le défaut autophagique, il s'agit de la sur-activation de la dégradation par le protéasome. En effet, l'inhibition de ce mécanisme potentialise la prolifération cellulaire et la mort cellulaire obtenue avec l'inhibition de l'autophagie (Ding, 2009). Un dernier mécanisme peut faire intervenir un arrêt du cycle cellulaire lors de l'inhibition de l'autophagie. Des études ont montré que la déplétion de constituants essentiels de l'autophagie cause un arrêt du cycle cellulaire et une entrée des cellules en sénescence due à l'accumulation de constituants toxiques (Kang, 2011). Il serait donc intéressant de déterminer les

mécanismes par lesquels les cellules cancéreuses peuvent s'adapter à l'inhibition de l'autophagie dans le modèle FLT3-ITD.

Des expériences préliminaires réalisées avec des approches d'inhibition pharmacologiques et génétiques de l'autophagie suggèrent que l'arrêt de prolifération observé implique un blocage du cycle cellulaire en phase G1. Cependant, le marquage par iodure de propidium utilisé pour monitorer le cycle cellulaire ne permet pas de discriminer les cellules bloquées en phase G1 ou les cellules en phase G0 et donc en sénescence. Il serait donc intéressant d'évaluer les niveaux des différents marqueurs de la sénescence comme les protéines p15 et p16 lors d'une inhibition de l'autophagie par des techniques de qPCR et/ou de Western Blot.

Nous prévoyons également d'étudier l'impact de l'inhibition de l'autophagie une fois que la maladie est établie chez la souris. Lors de notre travail, nous avons étudié, *in vivo*, l'impact de l'invalidation de l'autophagie sur l'initiation du développement de la maladie et la survie post-greffe, c'est-à-dire directement après injection des cellules chez la souris. Nous allons refaire cette expérience, en attendant que la maladie se développe au sein de la souris avant d'invalider l'autophagie. Ceci nous permettra donc d'évaluer l'impact de l'inhibition de l'autophagie sur la maladie établit, ce qui est plus représentatif d'une situation clinique. Enfin, il serait également intéressant d'inhiber l'autophagie en combinaison avec un inhibiteur de FLT3 comme l'AC220 dans le modèle FLT3-ITD. Ceci nous permettra d'évaluer s'il existe une synergie entre l'inhibition de l'autophagie et de FLT3 afin d'améliorer les traitements conventionnels pour les LAM exprimant le récepteur FLT3-ITD mais ceci est peu probable vu que FLT3-ITD promeut l'autophagie.

# VII. Voies de signalisation impliquées dans l'autophagie dans le modèle FLT3-ITD

## 1. Les voies de signalisation majoritaires en aval de FLT3-ITD ne sont pas impliquées dans l'induction de l'autophagie

Etant donné l'induction de l'autophagie par l'expression et l'activité du récepteur FLT3-ITD, nous nous sommes demandé quelle pouvait être la voie de signalisation impliquée dans l'augmentation de l'autophagie dans le modèle FLT3-ITD. Nous avons tout d'abord étudié l'implication des différentes voies de signalisation connues en aval de FLT3, les voies STAT5, MAPK/ERK et PI3K/AKT. Pour cela, nous avons utilisé des inhibiteurs pharmacologiques de chacune de ces voies pour voir leur effet sur l'autophagie basale des cellules. Comme le montre la Figure 37 A, B et C, l'inhibition des voies majeures induites en aval de FLT3 ne réduit pas l'autophagie basale médiée par FLT3.

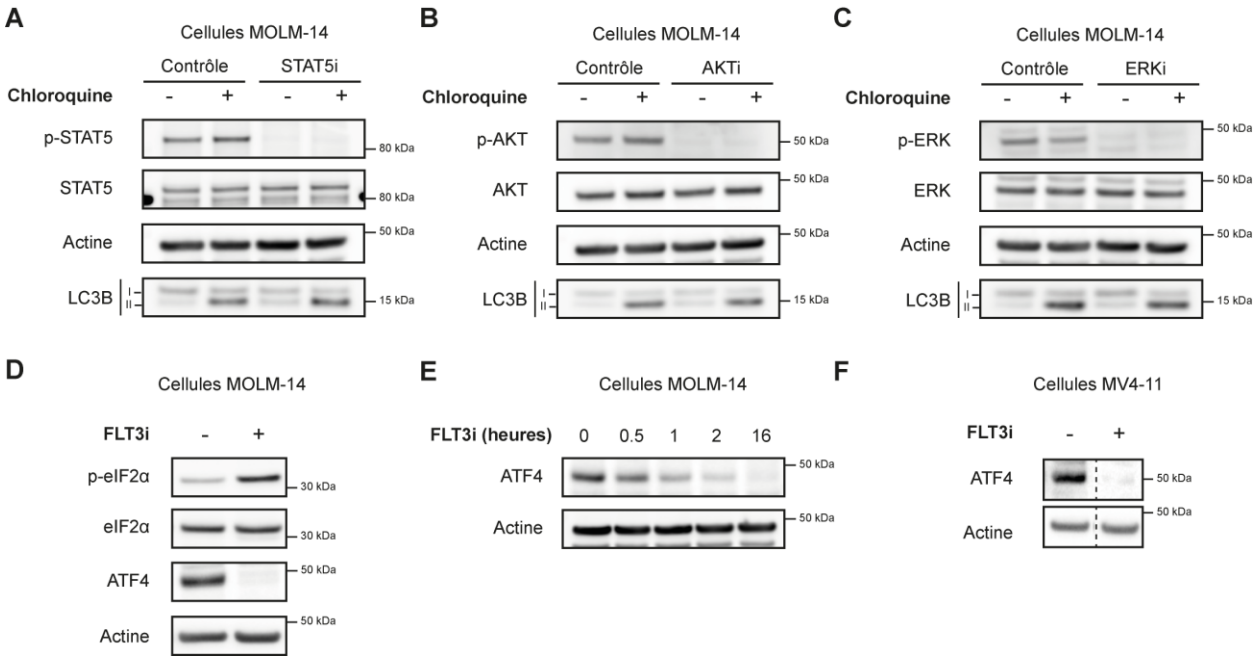



**Figure 37 : Les voies de signalisation majeures en aval de FLT3 ne sont pas responsables de l'induction de l'autophagie.**

**A-C.** Les cellules MOLM-14 ont été traitées 16h avec l'inhibiteur de STAT5 (**A**), l'inhibiteur d'AKT (**B**) ou l'inhibiteur d'ERK (**C**) en présence ou non de chloroquine à 15µM. Les cellules ont ensuite été lysées et l'efficacité de l'inhibiteur ainsi que le niveau de LC3B a été analysé par Western Blot. **D.** Les cellules MOLM-14 ont été traitées 2h avec l'inhibiteur de FLT3 à 100 nM (FLT3i). Les cellules ont ensuite été lysées et le profil de phospho-eIF2α et d'ATF4 ont été analysés par Western Blot. **E.** Les cellules MOLM-14 ont été traitées entre 30 min et 16h avec l'inhibiteur de FLT3 à 100 nM (FLT3i). Les cellules ont ensuite été lysées et le profil d'ATF4 a été analysé par Western Blot. **F.** Les cellules MV4-11 ont été traitées entre 2h avec l'inhibiteur de FLT3 à 100 nM (FLT3i). Les cellules ont ensuite été lysées et le profil d'ATF4 a été analysé par Western Blot.

FLT3-ITD est décrit pour être en partie localisé dans le RE d'où il est capable de signaler. Cette localisation pouvant générer un stress du RE capable et donc à la voie eIF2α-ATF4 récemment décrite pour moduler le processus autophagique. Nous avons alors analysé le statut de phosphorylation de la

sérine 51 du facteur eIF2α et le niveau d'expression d'ATF4 dans les cellules MOLM-14 en présence de l'inhibiteur de FLT3. Comme montré sur la figure 37 D, lors d'un traitement de 2 heures par l'inhibiteur de FLT3, on observe une augmentation de la phosphorylation du facteur eIF2α. Alors qu'on s'attendait à une augmentation de la protéine ATF4 en réponse à l'augmentation de phosphorylation du facteur eIF2α, l'inhibition de FLT3 conduit à une diminution importante voir une disparition totale de la protéine ATF4. Cette diminution d'ATF4 a également été observée avec une inhibition de FLT3 par un shARN ou un siARN et dans la lignée MV4-11 (résultats non montrés). De plus, cette diminution d'ATF4 en réponse à l'inhibiteur de FLT3 est très rapide, il faut moins de 2 heures pour éteindre le niveau de la protéine (Figure 37 E, F). Ces observations ne corrèlent pas avec l'augmentation de la phosphorylation d'eIF2α sur sa sérine 51. La régulation d'ATF4 par FLT3 n'implique donc pas la voie phospho-eIF2α qui est le mécanisme majeur de régulation de la synthèse d'ATF4. Il existe alors un autre lien entre le récepteur FLT3-ITD et la protéine ATF4 dans notre modèle. Nous avons donc identifié un nouvel acteur de la signalisation dépendante de FLT3 qui pourrait constituer une cible thérapeutique intéressante.

### 2. Le facteur de transcription ATF4, un acteur essentiel dans la régulation l'autophagie en aval de FLT3-ITD

Les résultats précédents suggèrent qu'ATF4 est un acteur très régulé en aval de FLT3 et qui pourrait être impliqué dans l'autophagie induite par FLT3-ITD. Pour confirmer ces résultats, nous avons dans un premier temps utilisé un siARN ou un shARN dirigé contre la protéine ATF4 dans les cellules MOLM-14 ou MV4-11. L'invalidation génétique de la protéine ATF4 induit une diminution du flux autophagique dans les lignées MOLM-14 et MV4-11 observée par Western Blot ou par Immunofluorescence (Figure 38 A, B, C, D). Afin de valider ces résultats, nous avons réalisé une expérience de complémentation en réexprimant la protéine ATF4 en présence ou non de l'inhibiteur de FLT3. Pour cela, nous avons utilisé un vecteur d'expression de la protéine ATF4. Les cellules MOLM-14 ont été préalablement mises en présence ou non avec l'inhibiteur afin d'éliminer complètement la protéine ATF4 dans les cellules. Ces dernières ont ensuite été infectées avec un vecteur lentiviral d'expression ectopique d'ATF4 ou un vecteur lentiviral contrôle. Après 16 heures d'infection, les cellules ont été traitées avec la bafilomycine pendant 2 heures afin de comparer le flux autophagique entre la condition contrôle ou la condition où nous avons réexprimé ATF4. La réexpression modérée d'ATF4 après 16 heures d'infection est suffisante pour réinduire une autophagie basale dans les cellules en présence de l'inhibiteur de FLT3 (Figure 38 E). Ces résultats confirment l'implication d'ATF4 dans la modulation de l'autophagie dans le modèle FLT3-ITD.

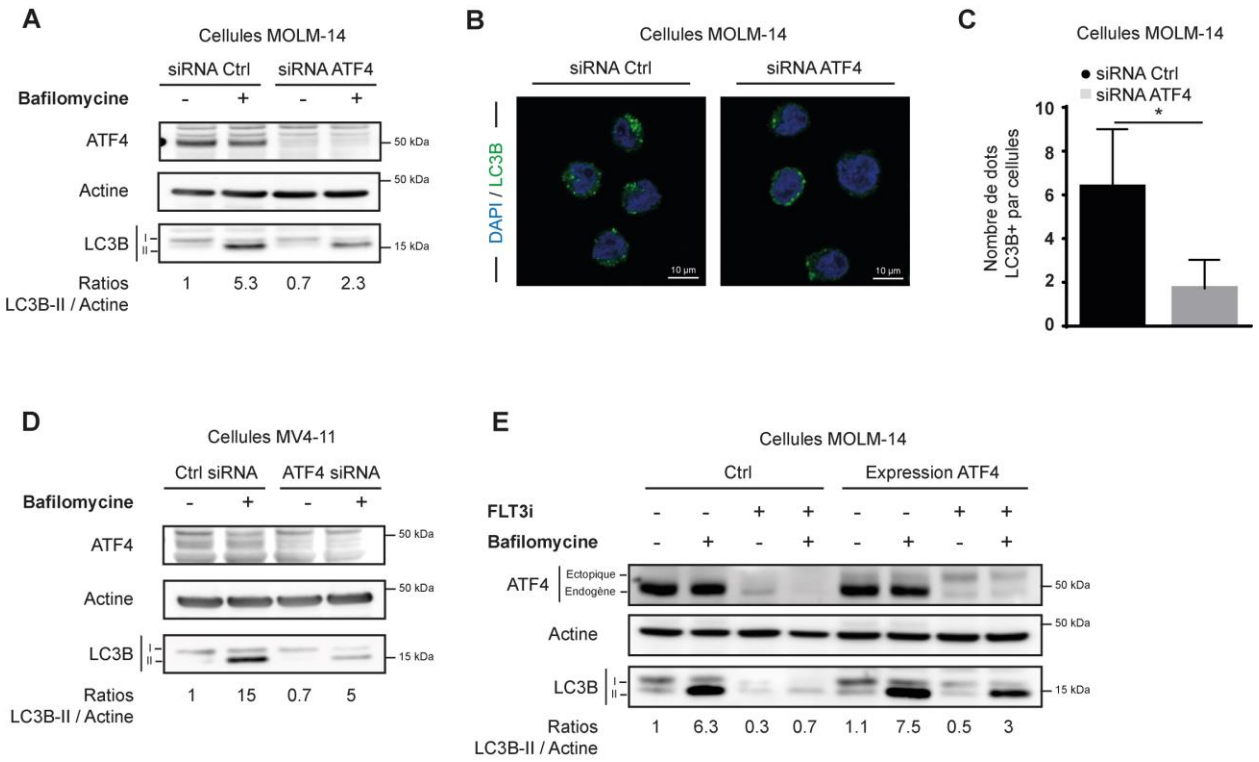



**Figure 38 : La protéine ATF4 est responsable de l'induction de l'autophagie en aval de FLT3-ITD.**

**A.** Les cellules MOLM-14 ont été traitées 16h avec un siARN dirigé contre ATF4 puis traitées 2h avec de la Bafilomycine à 20nM. Les cellules ont ensuite été lysées et le niveau de LC3B et d'ATF4 ont été analysés par Western Blot. **B-C.** Immunofluoresence de cellules MOLM-14. Les cellules ont été traitées 16h avec un siARN dirigé contre ATF4 et 2h avec de la bafilomycine à 20nM puis marquées avec un anticorps anti-LC3B et le DAPI. Les photos ont été prises par microscopie confocale (**B**) et analysées avec le logiciel Image J (**C**). **D.** Les cellules MV4-11 ont été traitées 16h avec un siARN dirigé contre ATF4 puis traitées 2h avec de la Bafilomycine à 20nM. Les cellules ont ensuite été lysées et le niveau de LC3B et d'ATF4 ont été analysés par Western Blot. **E.** Les cellules MOLM-14 ont été traitées 2h avec l'inhibiteur de FLT3 puis ont été infectées avec un vecteur lentiviral d'expression d'ATF4 ou un vecteur lentiviral contrôle en présence ou non de l'inhibiteur de FLT3. Après 16h d'infection, les cellules ont été traitées 2h avec de la Bafilomycine à 20nM puis lysées et le niveau LC3B et d'ATF4 ont été analysés par Western Blot.

Afin de mieux comprendre le mécanisme par lequel ATF4 module le processus autophagique dans le modèle FLT3-ITD, nous avons étudié les ARN messager des différents gènes de l'autophagie par PCR quantitative dans les cellules MOLM-14 et MV4-11 en présence de l'inhibiteur de FLT3. Nous avons pris comme contrôle le gène de l'asparagine synthase (ASNS) qui est le gène connu pour être régulé par ATF4. L'inhibition de FLT3 pendant 6 heures dans nos lignées diminue drastiquement le niveau d'ARNm de l'ASNS. De plus, différents gènes de l'autophagie sont dérégulés par l'inhibition de FLT3. On y retrouve les gènes de l'autophagie impliqués dans l'élongation des autophagosomes comme ATG3, ATG7 et ATG16L1 (Figure 39 A). En parallèle, la spectrométrie de masse que nous avons réalisé sur des MOLM-14 traitées avec un siARN de FLT3 nous a permis d'identifier la protéine ULK3. Cette dernière est une sérine/thréonine kinase récemment décrite dans l'autophagie pour interagir avec le complexe ULK et activer le processus (Braden, 2016). Nous avons donc testé le niveau d'ARNm d'ULK3 après traitement avec l'inhibiteur de FLT3 et nous avons observé une importante diminution de l'ARNm en

réponse à l'inhibiteur (Figure 39 A). Nous obtenons également des résultats similaires dans les cellules MV4-11 (résultats non montrés). Pour confirmer l'implication d'ATF4 dans la régulation de ces différents gènes, nous avons invalidé la protéine ATF4 avec un siARN et regardé le niveau des ARN messager des différents gènes de l'autophagie dans les cellules MOLM-14. Comme précédemment, nous avons pris comme contrôle, l'asparagine synthase (ASNS) mais également ATF4 pour contrôler l'efficacité du siARN. L'invalidation génétique d'ATF4 donne des résultats similaires à l'inhibition pharmacologique de FLT3. En effet, les gènes d'ATG7, ATG16L1 et ULK3 sont également dérégulés après l'invalidation d'ATF4 (Figure 39 B), suggérant l'implication d'ATF4 dans la régulation des gènes essentiels de l'initiation et de l'élongation du processus autophagique.

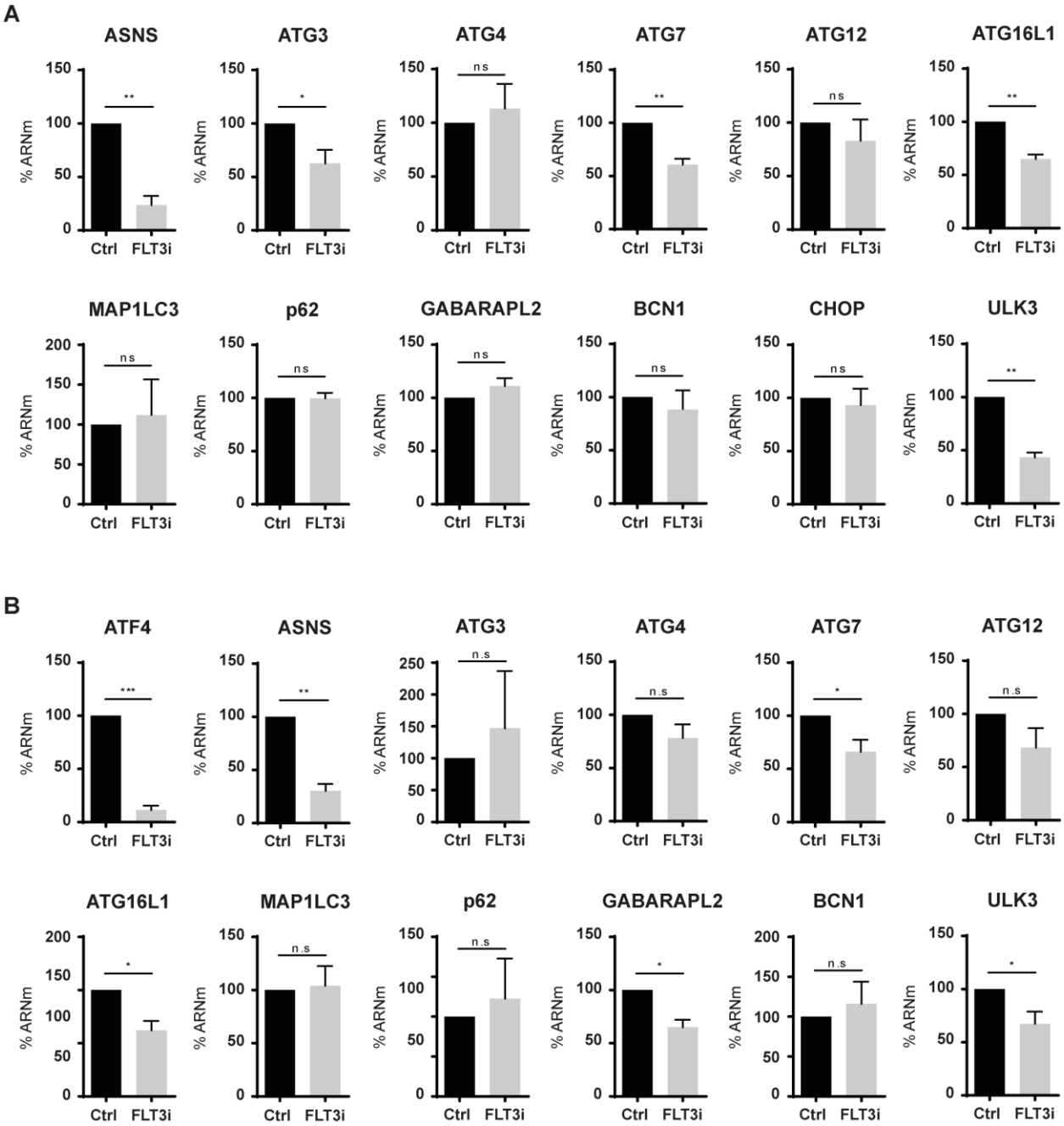


**Figure 39 : Le récepteur FLT3-ITD et ATF4 modulent l'expression de certains gènes de l'autophagie impliqués dans les étapes d'initiation et d'élongation.**

**A.** Les cellules MOLM-14 ont été traitées 6 heures avec l'inhibiteur de FLT3 et le niveau d'ARNm de différents gènes de l'autophagie a été analysé par PCR quantitative. **B.** Les cellules MOLM-14 ont été traitées 16 heures avec un siARN dirigé contre ATF4 et le niveau d'ARNm de différents gènes de l'autophagie a été analysé par PCR quantitative.

Nous avons ensuite regardé l'importance d'ATF4 dans notre modèle en générant un modèle cellulaire dans lequel le gène d'ATF4 a été invalidé. Pour cela nous avons utilisé des constructions lentivirales de shARN inductibles à la doxycycline contenant des séquences ciblant ATF4 que nous avons transduit dans les cellules MOLM-14. L'addition de doxycycline invalide l'expression d'ATF4 ainsi que le flux autophagique dans la lignée cellulaire générée (Figure 40 A). L'inhibition d'ATF4 par invalidation génétique est également accompagnée d'une inhibition de la prolifération cellulaire mais pas d'une mortalité cellulaire, suggérant que l'autophagie induite par FLT3-ITD nécessite la présence d'ATF4 et qu'elle est nécessaire pour la prolifération des cellules (Figure 40 B, C).

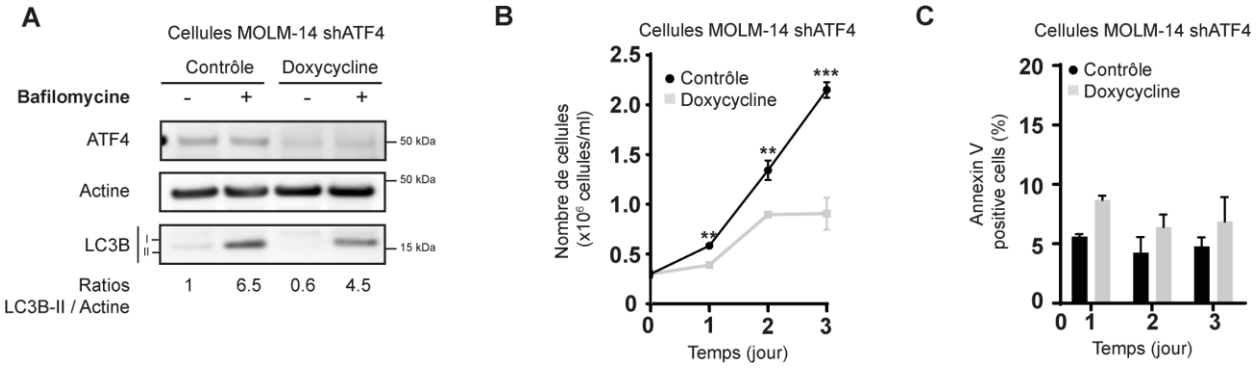



**Figure 40 : L'invalidation génétique d'ATF4 diminue la prolifération exprimant le récepteur FLT3-ITD.**

La lignée MOLM-14 a été transduite avec des lentivirus contenant des séquences de shARN dirigées contre ATF4. Les cellules exprimant de manière stable les vecteurs ont été sélectionnées par puromycine. **A.** Les cellules MOLM-14 shATF4 ont été traitées pendant 3 jours avec de la doxycycline à 2µg/mL, en présence ou non de bafilomycine à 2 nM. Les cellules ont ensuite été lysées et les niveaux de LC3B et d'ATF4 ont été analysés par Western Blot. **B-C.** Les cellules MOLM-14 shATF4 ont été traitées pendant 3 jours avec de la doxycycline à 2µg/mL et ont été comptées chaque jour par exclusion au bleu trypan (**B**) et leur survie a été observée par marquage Annexin V par cytométrie en flux (**C**).

## 3. L'inhibition d'ATF4 réduit la charge tumorale chez la souris

Nous avons finalement étudié l'envahissement des cellules leucémiques FLT3-ITD en invalidant la protéine ATF4 *in vivo*. Pour cela, nous avons injecté des cellules MOLM-14 exprimant un shARN dirigé contre ATF4 ou un shARN contrôle dans la circulation sanguine de souris NSG selon le même protocole précédemment décrit (Partie VI.3). L'invalidation génétique d'ATF4 dans les cellules MOLM-14 réduit nettement la capacité des cellules à se multiplier dans la moelle osseuse ou la rate des souris (Figure 41 A, B) ainsi que l'invasion des cellules dans le sternum (Figure 41 C). En plus de la réduction de l'envahissement par les cellules humaines leucémiques, l'expression du shARN ATF4 a permis

d'améliorer significativement la survie des souris comparé au souris injectées avec un shARN Ctrl (Figure 41 D). Tous ces résultats démontrent donc que le facteur de transcription ATF4 est un acteur essentiel dans l'induction du processus autophagique et dans le développement des cellules de LAM exprimant le récepteur FLT3-ITD.

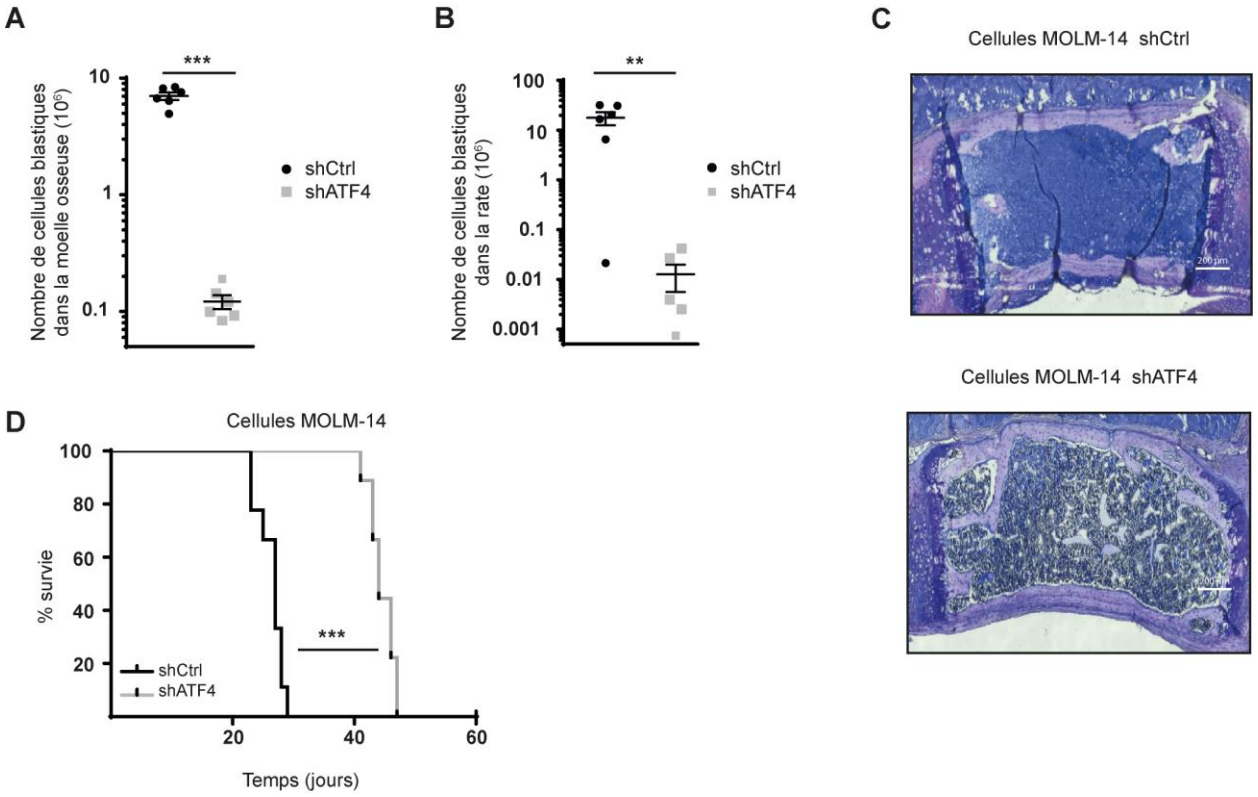



**Figure 41 : Inhiber ATF4 réduit l'envahissement des cellules leucémiques humaines et augmente la survie des souris.**

**A-B.** Graphique représentant le nombre de cellules humaine hCD45+/hCD33+ dans la moelle osseuse ou la rate. **C.** Coupe de sternum colorée au MGG (May-Grünwald-Griemsa) de souris injectées avec les cellules MOLM-14 exprimant un shARN. **D.** Graphique représentant la survie des souris au cours du temps (courbe Kaplan-Meier).

## 4. La voie FLT3-PKC-eIF6 est responsable de l'induction d'ATF4 et de l'autophagie

D'après les résultats précédents, il semblerait que l'expression de la protéine ATF4 soit modulée autrement que par la voie eIF2α. Les différents modes de régulation de la protéine ATF4 peuvent intervenir au niveau de sa stabilité, de sa transcription ou de sa traduction. Afin de disséquer les mécanismes de régulation d'ATF4 en aval de FLT3, nous avons tout d'abord étudié la stabilité de la protéine ATF4 en aval de FLT3. Pour cela, nous avons réalisé un traitement avec de la cycloheximide (inhibiteur de la synthèse protéique) en présence ou non de l'inhibiteur de FLT3 afin de suivre la dégradation d'ATF4 au cours du temps. Comme le montre la figure 42 A et B, l'inhibition de FLT3 n'impacte pas la demi vie de la protéine qui est d'environ 20-30 min. Ces résultats suggèrent que FLT3 ne

régule pas la dégradation d'ATF4 mais est probablement régulée au niveau de sa transcription ou de sa traduction. Afin d'analyser la transcription d'ATF4, nous avons traité les cellules MOLM-14 et MV4-11 avec l'inhibiteur de FLT3 pendant 6 heures et nous avons regardé le niveau d'ARNm d'ATF4 par PCR quantitative. L'analyse de l'expression de l'ARN messager d'ATF4 par qPCR en réponse à une inhibition courte de FLT3 ne montre pas de différences entre les cellules traitées avec l'inhibiteur de FLT3 et les cellules contrôles. Ces résultats suggèrent que la transcription d'ATF4 n'est pas à l'origine de sa régulation par FLT3 (Figure 42 C). Nous nous sommes ensuite intéressés à la synthèse de la protéine ATF4. Nous avons préalablement traité les cellules avec de la cycloheximide pour bloquer la synthèse protéique et abaisser complètement le niveau d'ATF4 dans les cellules puis nous avons traité les cellules avec un inhibiteur du protéasome, le MG132, pour empêcher la dégradation des protéines. Ceci nous a permis de regarder la réexpression et l'accumulation d'ATF4 au cours du temps en présence ou non de l'inhibiteur de FLT3. En présence de l'inhibiteur, nous avons observé une réexpression et donc une accumulation d'ATF4 significativement plus lente que dans la condition contrôle, suggérant une régulation traductionnelle d'ATF4 par la voie FLT3-ITD (Figure 42 D, E).

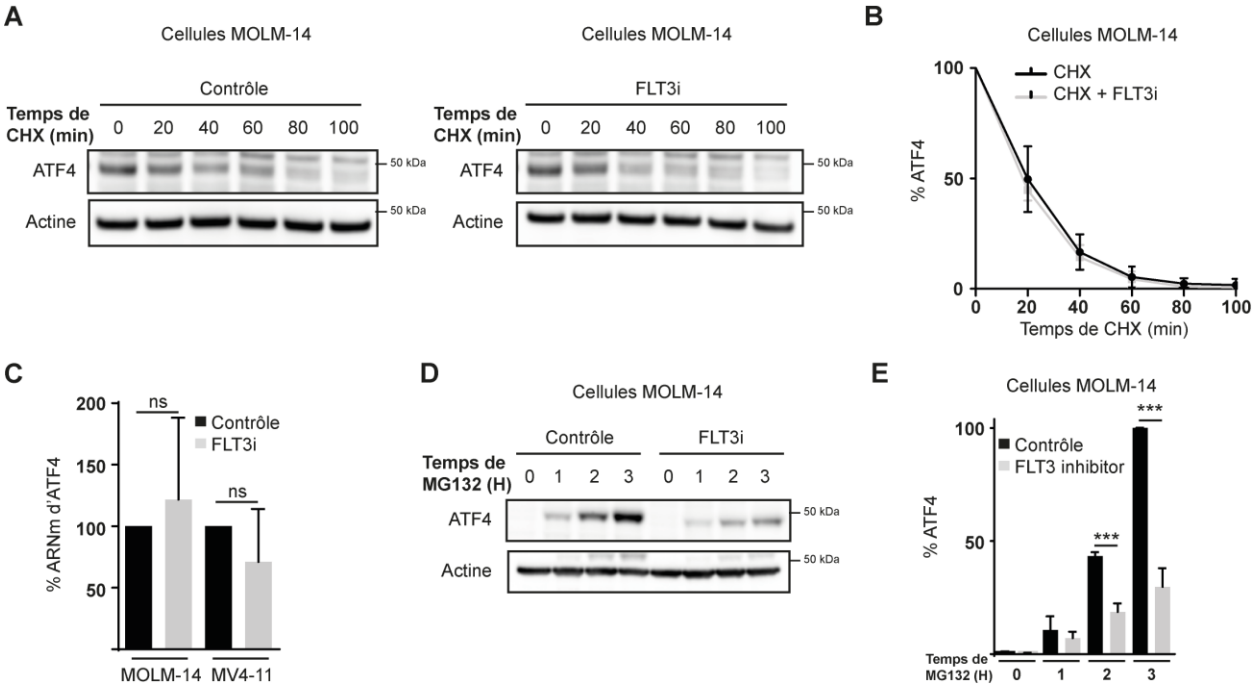



**Figure 42 : La protéine ATF4 est régulée par le récepteur FLT3-ITD au niveau de sa synthèse.**

**A.** Les cellules MOLM-14 ont été traitées avec du cycloheximide (CHX) à 50 µg/mL en présence ou non de l'inhibiteur de FLT3 à 100 nM. Les cellules ont ensuite été récupérées toutes les 20 min pendant 1h40 et le niveau d'ATF4 a été analysé par Western Blot. **B.** Le graphique représente la quantification et la comparaison des Western blot en présence ou non de l'inhibiteur de FLT3. **C.** Les cellules MOLM-14 et MV4-11 ont été traitées 6 heures avec l'inhibiteur de FLT3 et le niveau d'ARNm d'ATF4 a été analysé par PCR quantitative. **D.** Les cellules MOLM-14 ont été traitées avec du cycloheximide (CHX) à 50 µg/mL pendant 2 heures, lavées, et traitées avec du MG132 à 10 µg/mL en présence ou non de l'inhibiteur de FLT3. Les cellules ont ensuite été récupérées toutes les heures pendant 3h et le niveau d'ATF4 a été analysé par Western Blot. **E.** Le graphique représente la quantification et la comparaison des Western blot en présence ou non de l'inhibiteur de FLT3.

Nous avons donc recherché un lien traductionnel en aval de FLT3 qui pourrait réguler la synthèse de la protéine ATF4. Pour cela, nous avons réalisé une étude protéomique par spectrométrie de masse à partir de cellules MOLM-14 transfectées avec un siARN dirigé contre FLT3, ATF4 ou un siARN controle. L'analyse par spectrométrie de masse a été réalisée par la plateforme de protéomique de l'institut Cochin (Paris), dirigée par le Dr. Patrick Mayeux. Cette analyse nous a permis d'établir une liste de protéines régulées en aval de FLT3-ITD. De plus, sur la base de l'article de Brina et al (Brina, 2015) dans lequel ils utilisent un shARN dirigé contre eIF6, j'ai pu établir une autre liste de protéines régulées traductionnellement et spécifiquement par le facteur eIF6. Ce facteur a été décrit comme un régulateur positif de la traduction d'ARNm possédant des séquences uORFs comme ATF4. En comparant ces deux analyses, j'ai donc pu identifier les protéines régulées en aval de FLT3-ITD et qui sont également régulées par le facteur eIF6. De façon intéressante, sur les 68 protéines identifiées dans le papier en aval d'eIF6, plus de 70% d'entre elles sont diminuées dans la condition traitée avec le siARN de FLT3 par rapport au contrôle (voir annexes). En recoupant ces deux analyses, j'ai pu ainsi identifier une signature eIF6 dans notre modèle.

Afin de confirmer ces résultats de protéomique, nous nous sommes ensuite focalisé sur la possible implication du facteur de traduction eIF6 dans la régulation de la protéine ATF4. Pour cela, nous avons étudié l'effet de l'invalidation génétique d'eIF6 dans les cellules MOLM-14 et MV4-11 à l'aide d'un shARN inductible à la doxycycline. La perte d'expression de eIF6 diminue fortement le niveau d'ATF4, le flux autophagique et la prolifération des cellules MOLM-14 et MV4-11 (Figure 43 A, D). Contrairement à l'inhibition de FLT3 ou d'ATF4, l'invalidation d'EIF6 induit la mort cellulaire des cellules exprimant FLT3-ITD (Figure 43 B, C, E). De plus, l'invalidation d'EIF6 n'impacte ni la prolifération ni la suivie des cellules ne présentant pas la mutation FLT3-ITD suggérant que le facteur eIF6 est spécifiquement régulée par le récepteur mutant FLT3-ITD.

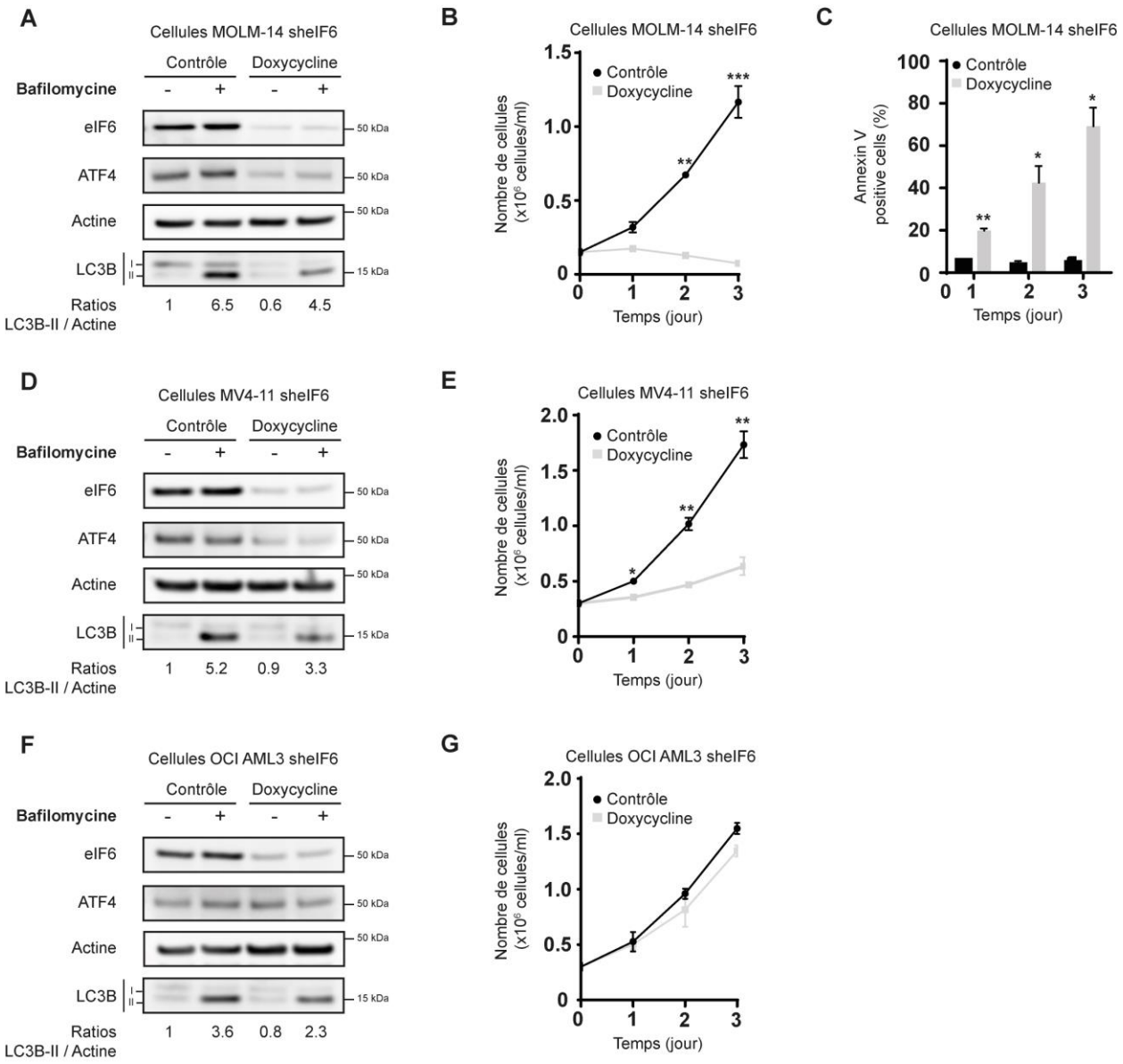



**Figure 43 : Le facteur eIF6 est essentiel à la régulation d'ATF4 et à la survie des cellules exprimant le récepteur FLT3-ITD.**

Les lignées MOLM-14, MV4-11 et OCIAML3 ont été transduite avec des lentivirus contenant des séquences de shARN dirigées contre eIF6. Les cellules exprimant de manière stable les vecteurs ont été sélectionnées par puromycine. **A-C.** Les cellules MOLM-14 sheIF6 ont été traitées pendant 3 jours avec de la doxycycline à 2µg/mL, en présence ou non de bafilomycine à 2 nM. Les cellules ont ensuite été lysées et les niveaux de LC3B et d'ATF4 ont été analysés par Western Blot (**A**). Les cellules MOLM-14 sheIF6 ont été traitées pendant 3 jours avec de la doxycycline et ont été comptées chaque jour par exclusion au bleu trypan (**B**) et leur survie a été observée par marquage Annexin V par cytométrie en flux (**C**). **D-E.** Les cellules MV4-11 sheIF6 ont été traitées pendant 3 jours avec de la doxycycline à 2µg/mL, en présence ou non de bafilomycine à 2 nM. Les cellules ont ensuite été lysées et les niveaux de LC3B et d'ATF4 ont été analysés par Western Blot (**D**) et ont été comptées chaque jour par exclusion au bleu trypan (**E**). **F-G.** Les cellules OCI AML3 sheIF6 ont été traitées pendant 3 jours avec de la doxycycline à 2µg/mL, en présence ou non de bafilomycine à 2 nM. Les cellules ont ensuite été lysées et les niveaux de LC3B et d'ATF4 ont été analysés par Western Blot (**F**) et ont été comptées chaque jour par exclusion au bleu trypan (**G**).

Le facteur de traduction eIF6 est connu pour être régulée par les protéines PKC. Nous nous sommes donc dirigés vers la voie PKC-eIF6 pour déterminer le lien entre FLT3-ITD et le facteur eIF6. Afin de vérifier l'implication de la voie PKC-eIF6 dans la régulation d'ATF4 en aval de FLT3-ITD, nous avons utilisé des inhibiteurs pharmacologiques dirigés contre les protéines PKC. Nous avons employé deux inhibiteurs : un inhibiteur qui cible toutes les isoformes des PKC (le Bisindolylmaleimide, BIS) et un inhibiteur qui cible spécifiquement l'isoforme PKC-βII (l'enzastaurine, ENZA) décrite pour interagir avec eIF6 et l'activer. L'inhibition des PKC avec le BIS ou l'ENZA induit une forte diminution de l'expression d'ATF4 dans les cellules MOLM-14 et MV4-11 (Figure 44 A, B). De plus, l'inhibition pharmacologique des PKC avec le BIS et l'ENZA inhibe l'autophagie basale des cellules MOLM-14 et MV4-11, suggérant l'implication des PKC dans la régulation d'ATF4 et de l'autophagie dans notre modèle (Figure 44 C, D). Pour confirmer le lien entre les PKC et le récepteur FLT3-ITD, nous avons inhibé le récepteur FLT3-ITD et regardé la phosphorylation de PKC-βII. Comme le montre la figure 39 E, l'inhibition pharmacologique de FLT3-ITD induit une diminution de la phosphorylation de PKC-βII, validant ainsi notre hypothèse de l'implication de la voie des PKC dans la régulation d'ATF4 et de l'autophagie en aval de FLT3-ITD.

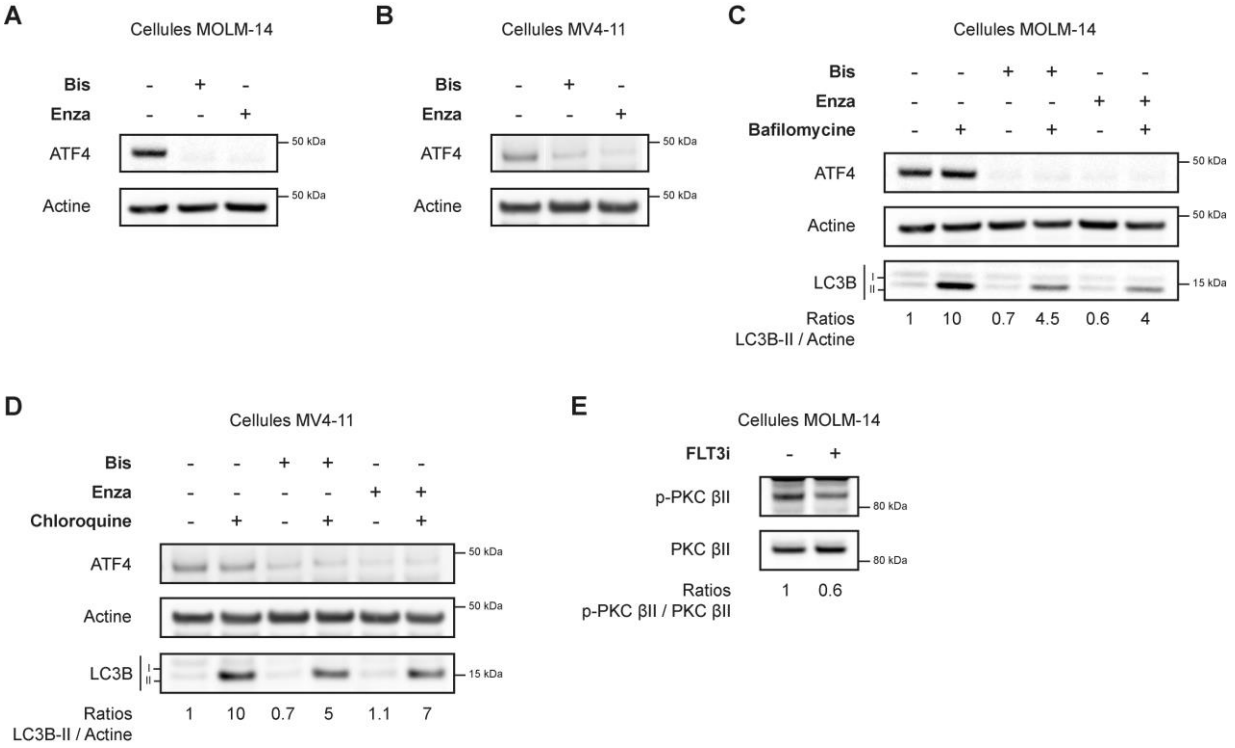



**Figure 44 : La voie des PKC est impliquée dans la régulaion d'ATF4 et de l'autophagie.**

**A-B.** Les cellules MOLM-14 (**A**) ou MV4-11 (**B**) ont été traitées avec du Bisindolylmaleimide (Bis) ou de l'enzastaurin (Enza). Les cellules ont ensuite été récupérées et le niveau d'ATF4 a été analysé par Western Blot. **C-D.** Les cellules MOLM-14 (**C**) ou MV4-11 (**D**) ont été traitées 16h avec du Bisindolylmaleimide (Bis) ou de l'enzastaurin (Enza) en présence ou non de chloroquine. Les cellules ont ensuite été lysées et le niveau d'ATF4 et de LC3B a été analysé par Western Blot. **E.** Les cellules MOLM-14 ont été traitées avec l'inhibiteur de FLT3 pendant 2 heures. Les cellules ont ensuite été récupérées et le niveau de la phosphorylation et de la protéine totale de PKC-βII a été analysé par Western Blot.

## 5. Résumé et discussion

Dans notre travail, nous avons recherché les voies de signalisation en aval du récepteur FLT3-ITD responsables de l'activation de l'autophagie dans les cellules de LAM. Le récepteur oncogénique FLT3-ITD active les grandes voies canoniques de signalisation cellulaire que sont les voies MAPK/ERK, PI3K/AKT, et la voie STAT5 en raison de sa localisation intracellulaire incontrôlée. En utilisant différents inhibiteurs pharmacologiques, nous avons montré qu'aucune de ces voies de signalisation n'est impliquée dans l'induction de l'autophagie. En effet leur inhibition ne diminue pas le flux autophagique dans les cellules de LAM. En revanche, nous avons mis en évidence d'une part que FLT3-ITD augmente l'expression du facteur de transcription ATF4, et d'autre part que son expression est essentiel à l'induction de l'autophagie dans le modèle FLT3-ITD et donc essentiel à la prolifération des cellules leucémiques *in vitro*. *In vivo*, comme pour l'autophagie, ATF4 est indispensable au développement de la leucémie.

Nos résultats sont les premiers identifiant le facteur de traduction ATF4 comme appartenant à la signalisation en aval de FLT3-ITD dans les LAM. Nous avons confirmé le rôle d'ATF4 comme acteur de l'autophagie dans le modèle FLT3-ITD en utilisant des approches d'interférences à l'ARN comme des shRNA ou siRNA. Notre étude, suggère qu'ATF4 a un rôle particulier dans les cellules exprimant le récepteur FLT3-ITD, en promouvant le flux autophagique et la prolifération des cellules *in vitro* et *in vivo*. En réponse à un inhibiteur de FLT3 ou un siRNA dirigé contre ATF4, nous avons également pu identifier par PCR quantitative les gènes clés de l'autophagie régulés par ATF4 dans notre modèle. L'induction de l'autophagie par ATF4 semble impliquer les protéines ATG7 et ATG16L1 qui sont des protéines essentielles à l'élongation des autophagosomes (Kabeya, 2000, Mizushima, 2001). De plus, nous avons observé que le transcrit de la protéine ULK3 est fortement diminué par un traitement avec l'inhibiteur de FLT3 ou un siARN ATF4 dans notre modèle. Cette protéine a été décrite dans l'initiation du processus d'autophagie, il serait intéressant de valider son implication et son importance en aval de FLT3 en comparant des cellules FLT3-ITD ou FLT3 sauvage. Finalement, nous évaluerons l'impact de la surexpression d'ATF4 dans nos modèles cellulaires sur l'autophagie, la prolifération des cellules et la réponse aux inhibiteurs de FLT3. Ceci permettrait de savoir si l'augmentation de l'autophagie par ATF4 permet une résistance des cellules à l'inhibition de FLT3. Comme nous l'avons montré, la réexpression d'ATF4 lors d'une inhibition de FLT3 permet une réinduction de l'autophagie inhibée par l'inhibiteur. En conséquence, la surexpression génétique d'ATF4 dans nos modèles devrait rendre les cellules moins sensibles à l'inhibiteur de FLT3.

Dans notre modèle, nous avons observé que la protéine ATF4 est une cible précoce de la signalisation oncogénique de FLT3-ITD. En effet, l'inhibition de FLT3-ITD induit une extinction de l'expression de la protéine très rapide au bout d'une heure de traitement dans nos lignées cellulaires. Nous nous sommes ensuite intéressés à la régulation d'ATF4 en aval de FLT3-ITD. La protéine ATF4 est principalement

régulée par le facteur de traduction eIF2α. En effet, lorsqu'il est phosphorylé en sérine 51, le facteur eIF2α induit l'expression d'ATF4 (Hinnebusch, 2002, Hinnebusch, 2005). Dans notre modèle l'inhibition de FLT3 engendre une augmentation de la phosphorylation d'eIF2α mais en parallèle une diminution drastique de l'expression de la protéine ATF4. Les résultats montrent que dans notre modèle l'expression d'ATF4 n'est pas régulée par eIF2α. Différentes données bibliographiques montrent que la protéine ATF4 peut être régulée au niveau de sa transcription, de sa traduction ou au niveau de sa stabilité (Pakos-Zebrucka, 2016). D'après nos résultats, la protéine ATF4 ne semble pas être régulée au niveau de sa transcription ou de sa stabilité mais plutôt au niveau de sa synthèse. A ce stade du projet, il serait intéressant de réaliser une purification des polysomes afin de valider nos résultats sur la régulation traductionnelle de la protéine ATF4. C'est une méthode de fractionnement des polyribosomes (polysome) par centrifugation avec un gradient de densité de saccharose (Rivera, 2015). Elle permet donc d'isoler les ARN messagers en cours de traduction donc présents au niveau des ribososmes pour une condition donnée. L'analyse par qPCR de ces ARN messagers nous permettra donc de voir si l'inhibition de FLT3 induit bien une inhibition de la traduction de la protéine ATF4.

Très récemment, le facteur de la traduction eIF6 a également été décrit dans la régulation de l'expression protéique d'ATF4 (Brina, 2015). A la suite d'une analyse protéomique sur la lignée cellulaire MOLM-14 dans laquelle on a déplété le récepteur FLT3-ITD avec un siRNA, nous avons obtenu une signature eIF6 dont plus de 70% des protéines connues en aval d'eIF6 ont été retrouvées diminuées dans la condition traitée avec le siRNA. Dans notre modèle, ce facteur serait essentiel à la prolifération et à la survie des cellules exprimant le récepteur FLT3-ITD comme nous avons pu le voir avec l'utilisation d'un shRNA eIF6. Afin de poursuivre l'étude sur l'importance de ce facteur il serait intéressant de réaliser une expérience de survie *in vivo* avec les cellules shRNA eIF6 exprimant ou non le récepteur FLT3-ITD. De plus, ce facteur à était décrit comme étant essentiel au maintien du métabolisme et plus précisément le métabolisme lipidique (Brina, 2015). Dans le modèle FLT3-ITD, il serait donc intéressant d'analyser l'impact d'EIF6 sur le métabolisme lipidique grâce aux cellules exprimant un shARN ciblant eIF6. Pour cela, il est possible d'utiliser une sonde fluorescente, la sonde Bodipy 493-503, qui présente une forte affinité pour les lipides neutres et donc les lipides présents dans les gouttelettes lipidiques, vésicules intracellulaire de stockage des lipides. De plus, nous pouvons également regarder le statut des différents métabolites en réponse à une invalidation du facteur eIF6 (consommation de glucose, d'oxygène, de production de lactate, d'ATP, la respiration mitochondriale ou de production d'espèces actives de l'oxygène).

D'après nos résultats, le facteur eIF6 serait sous l'influence de la voie des PKC et plus précisément sous le contrôle de PKC-β2 pour moduler l'expression d'ATF4 ainsi que l'induction du processus autophagique. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques dirigés contre les protéines PKC dans nos modèles cellulaires nous a permis de visualiser une diminution de l'expression de la protéine ATF4 et un

blocage du processus d'autophagie. Néanmoins, il est nécessaire de valider et décortiquer cette voie par d'autres moyens d'inhibition des PKC comme des approches génétiques. De plus, il serait intéressant de regarder l'effet de l'inhibition des PKC ou de FLT3 sur la phosphorylation d'eIF6 sur la sérine 235 qui est connue pour faciliter la traduction d'ARNm possédant des séquences uORFs en 5'UTR comme ATF4 (Brina, 2015). Des manipulations ont déjà étaient entreprit pour répondre à cette question en utilisant un anticorps dirigé contre cette phosphorylation. Le problème que nous avons eu est que cet anticorps n'était pas spécifique. Nous sommes donc en train de réaliser un gel 2D afin de regarder le statut de phosphorylation d'eIF6. Ce gel nous permettra de séparer le facteur eIF6 en fonction de ses phosphorylations et donc nous permettre d'étudier l'effet sur la phosphorylation de la sérine 235 en réponse à un inhibiteur de FLT3 ou de PKC (Miluzio, 2015). En plus de cela, il serait intéressant d'identifier le lien entre le récepteur FLT3-ITD et la voie des PKC d'autant plus que cette voie n'a jamais été décrite en aval de FLT3. D'après les données bibliographiques, la protéine PLC ɣ est un médiateur direct de la signalisation en aval de FLT3 et elle a été décrite comme étant impliquée dans l'activation des protéines PKC (Dosil, 1993, Shibayama, 1998, Griner, 2007). La protéine PLC permet l'activation des PKC avec la formation de DAG (diacylglycérol) à partir du PIP2 (phosphatidyl-inositol 4,5-bisphosphate) qui se fixe sur PKC et induit une conformation active des PKC (Griner, 2007). Afin de vérifier l'implication de PLCɣ dans notre modèle, il donc possible de regarder le niveau de diacylglycerol en présence ou non de l'inhibiteur de FLT3 ou de regarder le statut de phosphorylation des PKC en réponse à un siRNA de PLC.

# VIII. Publication de thèse

**Oncogenic FLT3-ITD supports autophagy via ATF4 in acute myeloid leukemia**

Quentin Heydt[1,3], Clément Larrue[1], Estelle Saland[1], Jean-Emmanuel Sarry[1], Arnaud Besson[1], Stéphane Manenti[1,3], Carine Joffre[1,3,*] and Véronique Mansat-De Mas[1,2,3,*].

[1]Cancer Research Center of Toulouse (CRCT), INSERM U1037, CNRS ERL5294, University of Toulouse, France

[2]Laboratory of Hematology, University Cancer Institute of Toulouse-Oncopole (IUCT-O)

[3] Equipe labellisée, La Ligue contre le Cancer, Toulouse, France

* Co-corresponding authors; contributed equally to this work.

Correspondence to:

- Véronique Mansat-De Mas

Laboratoire d'Hématologie, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse Oncopôle, 1 avenue Irène Joliot-Curie, 31059 Toulouse CEDEX 9, France

E mail: demas.veronique@iuct-oncopole.fr

- Carine Joffre

Cancer Research Center of Toulouse (CRCT), 2 avenue Hubert Curien, 31037, Toulouse Cedex 1, France

E Mail: carine.joffre@inserm.fr

**Running title:** autophagy drives leukemia proliferation

The authors declare no potential conflicts of interest.

**ABSTRACT**

In acute myeloid leukemia (AML), internal tandem duplication mutations in the FLT3 tyrosine kinase receptor (FLT3-ITD) account for up to 25% of cases and are associated with a poor outcome. In order to better target this AML subtype, a comprehensive view of how FLT3-ITD impacts AML cell biology is required. Here, we found that FLT3-ITD expression increased basal autophagy in AML cells, and that both pharmacological and genetic inhibition of the receptor reduced autophagy in primary AML samples and cell lines. Conditional expression of shRNAs against key autophagy proteins demonstrated that autophagy is required for AML cell proliferation *in vitro* and for leukemic cells survival in a mouse model of xenograft. Importantly, autophagy inhibition also overcame FLT3 inhibitor resistance both *in vitro* and *in vivo*. The transcription factor ATF4 was identified as an essential actor of FLT3-ITD-induced autophagy. Cellular levels of ATF4 were highly dependent on FLT3-ITD activity, and down-regulation of ATF4 inhibited autophagy-dependent AML cell proliferation and improved overall mouse survival similarly to autophagy inhibition.

These results suggest that targeting autophagy or ATF4 in patients expressing FLT3 mutations may represent a novel promising and innovative therapeutic strategy for AML.

**Key words:** acute myeloid leukemia; autophagy; proliferation; resistance; receptor tyrosine kinase

## INTRODUCTION

Acute myeloid leukemia (AML) arise from the malignant clonal expansion of undifferentiated myeloid precursors, resulting in bone marrow failure. Although many AML patients initially respond to conventional induction therapy, relapses are common and carry a very poor prognosis (1). The standard treatments for AML have remained almost unchanged over the past 40 years, demonstrating that despite improvements in our understanding of AML pathogenesis, a more in-depth knowledge of the biology of AML is still required in order to rationally design more efficient therapies. Over the past few decades, extensive molecular characterization studies have highlighted the complex heterogeneity of AML (2). The most common genetic abnormalities, which occur in about 30% of AML patients, lie within the Fms-Like Tyrosine kinase 3 (*FLT3*) gene which encodes a receptor tyrosine kinase (RTK). The most frequent mutations in this gene occur via internal tandem duplication (*FLT3-ITD*) in the juxta-membrane domain, or through point mutations, usually of the Asp835 residue within the activation loop (*FLT3-TKD*). Both types of mutations result in constitutive activation of FLT3 and promote leukemic cell proliferation and survival. The poor outcome associated with FLT3-ITD mutations (3) has generated great interest in the development of specific tyrosine kinase inhibitors for more than 10 years. Of the new generation of FLT3 inhibitors developed, quizartinib (AC220) is considered the most potent and selective, but resistance still commonly arises due in particular to secondary mutations (*e.g.* FLT3-TKD). Recently, midostaurin (PKC412) has shown efficiency against both FLT3-ITD and FLT3-TKD, and early clinical trials are currently underway (for review, see 4). Although important efforts are aimed at developing more efficient tyrosine kinase inhibitors, novel approaches to eradicate FLT3-mutated leukemic cells must also be developed.

Autophagy is a highly-conserved catabolic process used by the cell to degrade and recycle damaged cellular components in response to adverse environmental stimuli. It relies on the formation of the autophagosome, a double-membraned vesicle that sequesters cytoplasmic bulk, proteins and organelles before fusing with lysosomes to degrade the engulfed material. The role of autophagy in cancer is complex since it plays a tumor suppressor role during the early phases of tumor initiation through the prevention of genomic instability yet promotes tumor development in established tumors by promoting cancer cell survival (5). Interestingly, oncogenes such as K-RASG12D, BRAFV600E and the fusion protein BCR-ABL1 were reported to support a high level of basal autophagy in different types of cancers which is required for cell survival and proliferation (6-8). Moreover, autophagy has also been described to be a mechanism of resistance to different types of drugs or treatments (9,10), and inhibiting autophagy in

this context was shown to enhance treatment efficiency. The publication of these studies has instigated several clinical trials combining the only available *in vivo* autophagy inhibitor, hydroxychloroquine (HCQ), with conventional treatments in different cancers (11).

A few studies have sought to understand the role of autophagy in AML, and suggest that inhibiting autophagy sensitizes particular subgroups of AML cells to chemotherapies (12,13) or to small molecules inhibitors (*e.g.* histone deacetylase inhibitor) (14,15). However, the potential role of autophagy in AML cell biology as a mechanism of progression in FLT3-mutated AML remains to be clarified. Here, we found that FLT3-ITD mutations are able to induce an increase in basal autophagy in leukemic cells, through a previously uncharacterised signalling cascade involving the transcription factor ATF4. Moreover, inhibiting autophagy or ATF4 significantly impaired FLT3-ITD leukemic cell proliferation as well as tumor burden in murine xenograft models. Importantly, autophagy inhibition also overcame FLT3 inhibitor resistance due to FLT3-TKD mutation both *in vitro* and *in vivo*. These results suggest that targeting ATF4 or autophagy in AML patients carrying FLT3 mutations may represent a promising alternative therapeutic strategy.

## RESULTS

### FLT3-ITD increases basal autophagy in AML cells

Little is known of the role of autophagy in AML cell biology, especially in the context of the expression of FLT3-ITD, a mutation frequently found in these pathologies. To evaluate the impact of FLT3-ITD on autophagy levels in AML cells, the effect of FLT3-ITD inhibition was investigated in the two human FLT3-ITD-positive cell lines, MOLM-14 and MV4-11. Pharmacological inhibition of FLT3 activity in these cells by incubation with a specific FLT3 inhibitor for 16 h was followed by a significant decrease in autophagic flux. Indeed, FLT3 inhibition decreased lipidated LC3B (LC3B-II), an autophagosomal membrane marker, in presence of the autophagy inhibitor chloroquine (Fig 1A, S1A). Accordingly, the average number of autophagosomes per cell was significantly reduced upon FLT3 inhibition, as evaluated by both immunofluorescence (Fig 1B, C) and cytometry (Fig S1B) studies. Similar results were obtained with AC-220 (quizartinib), a FLT3 inhibitor currently being evaluated in phase III clinical trials (Fig S1C).

To confirm these results, we genetically down-regulated FLT3 in MV4-11 and MOLM-14 cells using either siRNAs or inducible shRNAs against FLT3. Down-regulation of the receptor by both of these RNA interference approaches also induced a significant decrease in autophagy in these cells (Fig 1D-F and S1D). These data suggest that FLT3-ITD activity increases basal autophagy levels in these leukemic cells.

In accordance, as shown by western blot analysis in Figure S1E, TF-1 erythroleukemic cells expressing FLT3-ITD displayed increased lipidated LC3B-II in presence of bafilomycin compared to TF-1 cells that did not express the receptor. Moreover, immunofluorescence analysis of LC3B revealed a significantly higher number of autophagosomes in these FLT3-ITD-positive cells (Fig S1F, G).

Based on these results, we next asked whether the expression of the oncogenic receptor FLT3-ITD also supports autophagy in AML primary samples. We therefore assessed the level of autophagy upon treatment with FLT3 inhibitors in primary AML samples from patients expressing FLT3-ITD. As shown in Figure 1G, treatment of FLT3-ITD-positive primary cells with FLT3 inhibitor for 16 h decreased the autophagy levels in these cells, whereas it had no effect on primary AML cells expressing wild type FLT3 (Fig 1H). The efficiency of the FLT3 inhibitor at abrogating FLT3-ITD activity was confirmed in these experiments by monitoring STAT5 phosphorylation status, a marker of FLT3-ITD activity (Fig 1G).

Altogether these complementary biochemical and cellular data collectively demonstrate that FLT3-ITD expression and activity cause an increased level of basal autophagy in AML cells.

**The transcription factor ATF4 mediates autophagy downstream of FLT3-ITD**

We then investigated which signalling pathways were involved in FLT3-ITD-induced autophagy. Pharmacological inhibition of the STAT5, PI3K/AKT or MEK/ERK pathways did not modify the level of autophagy in MOLM-14 cells, showing that none of the major signalling cascades activated by this mutant RTK are involved (Fig S2A-C).

Since FLT3-ITD was previously reported to localise at the endoplasmic reticulum (ER) and to signal from this compartment (16), we wondered whether the eIF2α/ATF4 pathway could be involved. This pathway is induced by different environmental stresses, particularly ER stress, and was recently demonstrated to be able to fine tune autophagy (17). As shown in Supplementary Figure 2D, treatment of MOLM-14 cells with a FLT3 inhibitor induced the phosphorylation of eIF2α on Ser51, a marker of activation of the pathway that represses global translation. Surprisingly, eIF2α phosphorylation was accompanied by a dramatic decrease in ATF4 protein levels (Fig S2D). This was unexpected since eIF2α phosphorylation generally increases cap-independent translation of ATF4 (18). However, these results suggest that ATF4 protein levels are positively controlled by FLT3-ITD activity, independent of their regulation by eIF2α. These results were confirmed by time course experiments in which pharmacological inhibition of FLT3-ITD led to a rapid and complete drop in ATF4 protein levels (Fig 2A). Pharmacological or genetic (RNA interference) inhibition of FLT3 also decreased ATF4 protein levels in MOLM-14 and MV4-11 leukemic cells (Figs 2B and S2E,F). In order to precise the mechanisms of ATF4 regulation by FLT3-ITD, we first analysed ATF4 mRNA levels in response to FLT3 inhibition (Fig 2C) and found that it was not modified in these conditions, .suggesting that FLT3-ITD regulates neither transcription nor mRNA stability of

ATF4. We then performed time course experiments of cycloheximide indicating that FLT3 inhibition does not induce ATF4 degradation (Figs 2 D, E) but rather impacts on its synthesis, since accumulation of ATF4 upon MG132 treatment was significantly decreased upon FLT3 inhibitor treatment (Figs 2 F, G).

Taken together, these data highlight a new eIF2α-independent ATF4 regulation pathway and demonstrate for the first time that FLT3-ITD positively controls the ATF4 protein levels.

Given that ATF4 has been described as a regulator of autophagy in other models, these data also suggested that ATF4 could be a key determinant of the autophagy process downstream of FLT3-ITD. To evaluate this hypothesis, RNA interference (siRNA or inducible shRNA) was used to down-regulate ATF4 in MOLM-14 or MV4-11 cells. Strikingly, ATF4 depletion induced a significant inhibition of autophagic flux in all cases, as judged by western blot and immunofluorescence analyses (Fig 2 H-K and S2G).

Together these novel findings demonstrate that the transcription factor ATF4 is an early target of FLT3-ITD signalling and is involved in FLT3-ITD-mediated autophagy in AML cells.

**Autophagy sustains the FLT3-ITD-dependent proliferation of leukemic cells**

We next asked whether autophagy could support FLT3-ITD-dependent proliferation since FLT3-ITD-expressing leukemic cells have increased rates of proliferation and autophagy has been shown to support proliferation of various types of cancer cells (19,20). For this, we first investigated the ability of the VPS34 inhibitor SAR405, a recently described potent inhibitor of autophagy (21), to influence MOLM-14 and MV4-11 cell proliferation. Treatment with SAR405 for 24 to 72 h inhibited autophagy (Fig 3A, S3A) and severely impaired proliferation in both cell lines, as judged by trypan blue exclusion and cell counting (Figs 3B, S3B). Interestingly, SAR405 did not significantly induce apoptotic cell death in MOLM-14 cells even after 3 days of treatment (Fig 3C), suggesting that the inhibition of proliferation observed in response to this molecule may be due to cytostatic mechanisms.

To investigate more specifically the involvement of autophagy in leukemic cell proliferation, we developed MOLM-14 and MV4-11 cell lines conditionally expressing shRNAs against either ATG12 or ATG5, two key proteins in the autophagy process. The addition of doxycycline efficiently silenced the expression of both ATG12 (Fig 3D, S3G) and ATG5 (Fig S3C and S3E) and, as expected, reduced autophagic flux. Consistent with our SAR405 data, down-regulation of ATG12 or ATG5 also inhibited MOLM-14 and MV4-11 cell proliferation (Fig 3E, S3D, S3F and S3H) without inducing significant cell death (Fig 3F). As a control, we verified that doxycycline had no effect on the proliferation of MOLM-14 and MV4-11 cell lines (not shown).

We then asked whether autophagy is as equally important for the proliferation of leukemic cells that do

not express FLT3-ITD, using OCI-AML3 cells, which express wild type FLT3. SAR405 treatment did not affect proliferation or death of OCI-AML3 cells (Fig S4A, B). In line with this, ATG12 shRNA-mediated inhibition of autophagy in TF-1 cells did not significantly modify their proliferation rate nor induce apoptosis (Fig S4C, D), while similar experiments in TF-1-FLT3-ITD cells resulted in a robust inhibition of proliferation (Fig S4E) without inducing cell death (Fig S4F). Thus, these data demonstrate that FLT3-ITD expressing cells rely on autophagy for growing.

Since ATF4 was found to be involved in autophagy in FLT3-ITD-positive leukemic cells (Fig 2), we then asked whether this factor was necessary for the proliferation of these cells. ATF4 depletion in MOLM-14 cells using an inducible shRNA against ATF4 induced a dramatic reduction in cell proliferation (Fig 3G), indicating that the FLT3-ITD-dependent autophagy that supports cell proliferation requires the presence of the ATF4 transcription factor. Finally, as previously observed for autophagy inhibition in these cells, ATF4 depletion did not induce significant cell death (Fig 3H).

**Targeting autophagy or ATF4 reduces AML tumor burden in mice**

We next investigated whether autophagy and ATF4 are required for AML proliferation *in vivo*. MOLM-14 cells stably expressing conditional shRNA against ATG5 or ATF4, or control shRNA, were injected into the tail vein of NSG mice to generate a leukemic model (22) (Fig 4A). Mice were then treated *per os* with doxycycline to induce shRNA expression. Strikingly, ATG5 or ATF4 silencing strongly decreased total cell tumor burden, as indicated by a reduced percentage of human leukemic cells (hCD45+/hCD33+) present in the murine bone marrow (Fig 4B) and spleen (Fig 4C). In addition, sternums from mice engrafted with shRNA control cells appeared to have a greater invasion of human cells compared to mice engrafted with cells expressing ATG5 or ATF4 shRNA (Fig 4D). Consistently, mouse survival was significantly prolonged upon ATF4 depletion and even more so with ATG5 depletion (Fig 4E). To further validate these results, mice were also engrafted with MOLM-14 cells silenced for another autophagy gene, ATG12, which also greatly improved mice overall survival (Fig 4F).

Taken together these results have identified autophagy and ATF4 as key actors in FLT3-ITD-positive AML in this murine xenograft model.

**Inhibiting autophagy overcomes acquired resistance to FLT3 inhibitors**

Given that we have established autophagy as a necessary process for AML cell proliferation and tumor burden *in vivo*, we then wondered whether inhibiting autophagy could represent an alternative method of targeting FLT3-ITD-positive cells that are resistant to FLT3 inhibitors. To test this hypothesis, we used a MOLM-14 cell line expressing an FLT3-D835Y mutant (MOLM-14-TKD), a mutation located within the

catalytic domain of FLT3, which is well-known for conferring resistance to AC-220. When MOLM-14-TKD cells were treated with the VPS34 inhibitor SAR-405, autophagy and cell proliferation were robustly inhibited (Fig 5A, B), as previously observed in MOLM-14 cells (Fig 3A, B). To further confirm these results, we transduced MOLM-14-TKD cells with conditional shRNA directed against ATG12. In accordance with the data obtained with SAR405, this also significantly reduced the proliferation of these AC-220 resistant cells (Fig 5C, D). Doxycycline had no effect on the proliferation of MOLM-14-TKD cell line (not shown).

We next sought to validate these results *in vivo*. Therefore, NSG mice were engrafted with MOLM14-TKD cells expressing conditional shRNA against ATG12, as performed with MOLM-14 cells (Fig 4). The overall survival of doxycycline-treated mice was greatly improved (Fig 5E) when compared to untreated mice, indicating that targeting autophagy overcomes acquired resistance to FLT3 inhibitors *in vivo*.

Collectively, these findings demonstrate that an ATF4/autophagy axis constitutes an important determinant of FLT3-ITD AML proliferation *in vivo*, and could be considered as a new potential therapeutic target for treating this AML subtype.

## DISCUSSION

In this work, we demonstrate that the oncogenic receptor tyrosine kinase FLT3-ITD induces autophagy in AML cells. To date, the role of autophagy in AML development has not been assessed in detail, and the autophagic status of AML cells has also been poorly investigated. Low levels of autophagy have been reported in AML samples in comparison to normal hematopoietic cells (23) and, very recently, loss of function mutations of autophagic proteins have been described in AML primary samples (24). Taken together, these two studies suggest that mutation-induced defects in autophagy may participate in AML initiation and progression, in association with other mutational events. In contrast, the key autophagy protein ATG7 has been identified as a resistance factor in AML, with specific importance in response to micro-environmental signals (13). Although highly important, all these studies did not explicitly take into account the heterogeneity of AML subtypes, which may lead to substantial diversity in terms of autophagy status in AML cells. Our work has more specifically addressed this question by focussing on the FLT3-ITD AML subtype, which accounts for up to 25 % of AML cases and has been associated with a poor prognosis. This does not imply that high basal autophagy is restricted to FLT3-ITD AML, and it is possible that other AML subtypes may also present high autophagy levels, for example due to the expression of oncogenes other than FLT3-ITD. Interestingly, our results are reminiscent of studies performed in other cancers, which have described the induction of autophagy by oncogenic forms of K-Ras (6) or B-Raf (7), or by BCR-ABL (8). In these cases, autophagy was found to support the increased

metabolic activity and excessive proliferation rates triggered by these different oncogenes. Our present data are in agreement with this notion, but they also suggest that whilst sustaining the proliferation of FLT3-ITD leukemic cells, autophagy does not significantly impact on their survival. Indeed, inhibiting autophagy genetically or with pharmacological molecules did not significantly induce cell death in FLT3-ITD AML cells. This is somewhat divergent from the roles of autophagy described downstream of B-Raf or K-Ras, which have been implicated in cell survival and resistance mechanisms to cytotoxic or genotoxic drugs mediated by these oncogenes. Interestingly, in the case of other tyrosine kinase-driven hematological malignancies, such as NPM-ALK-positive anaplastic large cell lymphoma or BCR-ABL-positive chronic myeloid leukemia, inhibiting the oncogenic tyrosine kinase is often found to lead to the induction of a protective autophagy (9,10), contrasting with our present observations in the FLT3-ITD model. It is also important to note that different studies have described the induction of autophagy-dependent cell death in AML cells in response to different drugs, such as the proteasome inhibitor bortezomib (22) or trans-retinoic acid (ATRA) in the case of promyelocytic leukemia (25).

These previous studies alongside our present data collectively suggest that the autophagic response to expression or inhibition of oncogenic tyrosine kinases may vary from one pathology to the other, and from one oncogene to the other, further stressing the necessity for specific mechanistic studies for each model.

In this study, we have also identified the ATF4 transcription factor as an important modulator of autophagy downstream of FLT3-ITD. To our knowledge this is one of the first reports identifying a function for ATF4 in AML cell biology, and the first evidence of its importance downstream of FLT3-ITD. The induction of the ATF4 protein through the activation of the eIF2α-dependent or -independent integrated stress response has been reported recently in AML in response to different drugs (26,27), and a recent study implicated ATF4 as a mediator of the unfolded protein response downstream of JUN in AML (28). We found that ATF4 is an early target of FLT3-ITD signalling since its down-regulation occurs within 1 hour of receptor inhibition in model cell lines. Interestingly, this regulation does not involve eIF2α, the main signalling pathway known to induce ATF4 accumulation, or the canonical signalling networks activated downstream of FLT3-ITD, which include the AKT, ERK or STAT5 pathways. ATF4 regulation has been described at the transcriptional, translational and post-translational level, depending on the model (29). Our results suggest that FLT3-ITD facilitates ATF4 synthesis without affecting stability, so further experiments will be needed to identify the mechanism operating downstream of FLT3-ITD. Interestingly, the signalling pathways leading to the induction of autophagy are different depending on the various oncogenes. An ER stress- and eIF2α-dependent process has been implicated downstream of B-Raf (7), MAPK15 involvement was described for BCR-ABL1 (8). Different studies have described key autophagic proteins, such as LC3B, Beclin1, or ULK1, as transcriptional targets of

ATF4 downstream of eIF2α phosphorylation (30), thus the important question of the mechanism involved in ATF4-dependent regulation of autophagy in FLT3-ITD-positive cells remains opened. Our data also demonstrate that inhibiting autophagy or ATF4 induces a cytostatic decrease in FLT3-ITD leukemic cell proliferation. How autophagy and ATF4 sustain the proliferation of these leukemic cells remains to be clarified. Autophagy has been involved in the regulation of different proliferation and cell cycle events (31-33), and it was also recently reported to regulate key proliferative signalling molecules such as MEK, ERK (34), and MAPK15 (8). Additionally, both autophagy and ATF4 are important actors and regulators of energetic metabolism in normal and cancer cells, so it could also impact on the proliferation of leukemic cells through these metabolic functions. Further studies will be needed to identify the molecular and functional links that drive autophagy-dependent proliferation in these leukemic cells.

Much effort has been focussed on developing efficient inhibitors against the FLT3-ITD receptor since its expression is associated with a poor outcome and since FLT3-ITD leukemic cells are strongly dependent on its activity for their proliferation and resistance to therapeutic drugs. Clinical trials with quizartinib have yielded encouraging results, but acquired resistance to the inhibitor involving different mechanisms have been described (35). In this context, identifying new Achilles heels of leukemic cells expressing FLT3-ITD appears to be the most important challenge in defining new potential therapeutic strategies. Our data suggest that autophagy or ATF4 could represent such alternatives because certain subsets of AML cells appear to be highly dependent on their activity. Furthermore, we have established that inhibiting autophagy may overcome the resistance to quizartinib induced by point mutations in the catalytic domain of FLT3, a resistance mechanism described in AML patients (36). The only autophagy inhibitor that is approved for *in vivo* use in humans at the moment is chloroquine, which was tested in association with therapeutic drugs for different types of cancers (11). New efficient autophagy inhibitors have recently been described, including inhibitors of the class III PI3K VPS34 (37) that can be used *in vivo*. The results herein suggest that these molecules or their derivatives may constitute efficient tools to inhibit autophagy *in vivo* in the near future.

As a conclusion, we identified for the first time autophagy as an important effector of FLT3-ITD receptor dependence in AML, and we established the ATF4 transcription factor as a master regulator of this process, underlying the existence of a new targetable signalling pathway in this poor prognosis AML subtype. Our data open the interesting possibility that a similar pathway is operating downstream of mutant tyrosine kinase receptors in other types of cancers.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell lines and AML samples

The human myeloid leukemia cell lines MV4-11, MOLM-14 were purchased from the Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Leibniz, Germany). The MOLM-14 TKD, TF1-FLT3-ITD and OCI-AML3 cell lines were kindly provided by Jérôme Tamburini (Institut Cochin, Paris, France), Paulo de Sepulveda (CRCM, Marseille, France) and Pierre Brousset (CRCT, Toulouse, France), respectively. Cells were grown in RPMI 1640 medium with Glutamax (Gibco, Life Technologies) supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma) and 100 units/ml of penicillin and streptomycin (Invitrogen). Fresh and thawed samples from AML patients have been obtained after informed consent and stored at the HIMIP collection (BB-0033-00060**)**. According to the French law, HIMIP collections has been declared to the Ministry of Higher Education and Research (DC 2008-307 collection 1) and obtained a transfer agreement (AC 2008-129) after approbation by the "Comité de Protection des Personnes Sud-Ouest et Outremer II" (ethical committee). Clinical and biological annotations of the samples have been declared to the CNIL (Comité National Informatique et Libertés ie Data processing and Liberties National Committee) and is supported by CAPTOR (Cancer Pharmacology of Toulouse-Oncopole and Region). AML primary samples were cultured in Iscove's modified Dulbecco medium (IMDM) containing 20% fetal calf serum.

### Antibodies and reagents

The following antibodies from Cell Signaling Technology were used: rabbit antibodies against LC3B (#2775), phospho-FLT3 (Tyr591, #3461), phospho-Stat-5 (Tyr694, #9351), Stat-5 (#9363), phospho-AKT (Ser473, #9277), AKT (#9272), ERK (#9102), phospho-eIF2α (Ser51, #9721), eIF2α (#9722), VPS34 (#4263), ATG5 (#8540), ATG12 (#4180); and mouse antibodies against phospho-ERK (#9106). Rabbit antibodies from Santa Cruz Biotechnology against Flt-3/Flk-2 (C-20, sc479) and ATF4 (C-20, sc200) were also used. Secondary antibodies labeled with horseradish peroxidase were purchased from Promega. Mouse monoclonal anti-LC3B from nanoTOOLS was used for immunofluorescence analysis. For flow cytometry studies, the antibodies anti-hCD45 (YB5.B8), anti-CD33 (HI30), anti-annexin V and BD Via-Probe™ (BD Pharmingen) were used. The FLT3 inhibitor III was purchased from Calbiochem and the FLT3 inhibitor quizartinib AC220 was purchased from Selleck Chemicals. The VPS34 inhibitor SAR405 was purchased from APExBIO. Bafilomycin was purchased from InvivoGen and chloroquine was obtained from Sigma Aldrich.

**Western blot analysis**

Proteins were separated using 4%-12% gradient polyacrylamide SDS-PAGE gels (Life Technologies) and electrotransferred to 0.2 µM nitrocellulose membranes (GE Healthcare). After blocking in Tris-buffered saline (TBS) with 0.1% Tween and 5% bovine serum albumin, membranes were blotted overnight at 4°C with the appropriate primary antibodies. Primary antibodies were detected using the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies. Immunoreactive bands were visualized by enhanced chemiluminescence (PI32209; Thermo Fisher Scientific) with a Syngene camera. Densitometric analyses of immunoblots were performed using the GeneTools software.

**Immunofluorescence analysis**

Briefly, cells were seeded onto coverslips coated with 0.01% poly-L-lysine (Sigma), then fixed in 4% formaldehyde for 8 min and subjected to ice-cold methanol treatment for 5 min. After PBS washes, cells were incubated in 0.1% Triton X-100 in PBS / 5% BSA for 15 min and then incubated with anti-LC3B antibodies (2 µg/mL) for 45 min. Cells were then washed again before incubation with an anti-mouse Alexa-488 secondary antibody (Invitrogen) for 30 min, followed by washing and mounting in medium containing DAPI (4′6-diamidino-2-phenylindole, Invitrogen). Images were acquired using a confocal Zeiss LSM 780. For quantification, fields were chosen arbitrarily based on DAPI staining, and the number of LC3B dots per cell of at least 50 cells was determined with Image J software.

**Flow cytometry**

To determine the number of apoptotic and dead cells, cells were washed then resuspended in annexin V binding buffer (PharMingen). Annexin V-APC (5 µl per 100,000 cells) was added and cells were incubated for 10 min in the dark. Data were acquired on a Macsquant (Miltenyi) flow cytometer. To analyse autophagosome-associated LC3B, we used the Millipore's FlowCellect™ Autophagy LC3 Antibody-based Assay Kit, following the manufacturer's instructions.

**SiRNA transfection**

The transfection of small interfering RNA (siRNA) into MOLM-14 and MV4-11 cells was carried out using the Neon transfection system (Life technologies), according to the manufacturer's recommendations. Briefly, 70 nM of siRNA was used per condition. RNA interference-mediated gene knockdown was achieved using pre-validated Santa Cruz Biotechnology siRNAs for ATF4 (sc-35112),

Qiagen small interfering RNAs (siRNAs) for FLT3 (SI0005987) and Dharmacon siGENOME Control Pool Non-Targeting #2 (D-001206-14-20).

**Lentiviral infection of MOLM-14 and MOLM-14 TKD cells**

Lentiviral particles were generated by calcium phosphate transient transfection into 293T cells. Briefly, 293T cells seeded into a 10 cm dish were transfected with 62.5 µl $CaCl_2$ (2 M), 500 µl HBS 2X, 418 µl H2O, 3.5 µg pVSV-G (env), 6.5 µg p8.1 (tat, pol, rev, gag) and 10 µg of inducible shRNA against ATG5, ATG12 or VPS34. Then, 72 h after cell transfection, 2 ml of the supernatants containing the virus particles were collected and added to $2.10^6$ MOLM-14 or MOLM-14 TKD cells in a 6-well plate. Polybrene (8 µg/ml) was added and spinoculation was performed by centrifuging cells for 60 min at 800 g. Seventy-two h after transduction, the medium containing the viruses was removed. Then, after an additional 24 h, transduced cells were selected with 1 µg/ml puromycin. All shRNA experiments were performed on the cell bulk, treated or not for 72 h with 1 µg/ml doxycycline for shRNA induction. The following sequences were used 5'>3':

- shRNA ATG12: purchased from Dharmacon (Ref RHS4696-20075354) (CCGGGGACTCATTGACTTCATCACTCGAGTGATGAAGTCAATGAGTCC).
- shRNA CTL: purchased from Sigma (Ref HC016 MISSION pLKO.1-puro Non-Target shRNA Control) (CGGGCGCGATAGCGCTAATAATTTCTCGAGAAATTATTAGCGCTATCGCGCTTTTTG).
- shRNA ATG5: purchased from Sigma (custom shRNA) (CCGGCCTGAACAGAATCATCCTTAACTCGAGTTAAGGATGATTCTGTTCAGGTTTTTTG).
- shRNA ATF4: purchased from Sigma (custom shRNA) (CCGGGCCTAGGTCTCTTAGATGATTCTCGAGAATCATCTAAGAGACCTAGGCTTTTT).

**Tumor xenografts into NSG mice**

NSG mice were bred at the UMS006 in Toulouse (France) using breeders obtained from Charles River. All animal experimental protocols were approved by the institutional Animal Care and Use Ethical Committee of the UMS006 and the Région Midi-Pyrénées (approval #13-U1037-JES08). NSG mice were treated by an i.p. injection of busulfan (20 mg/kg) on the day before the experiment. Mice were engrafted

by injection of $2.10^6$ MOLM-14 shCTL, MOLM-14 shATG5, or MOLM-14 shATF4 cells into the tail vein. After injection, all mice were treated by adding doxycycline (200 µg/ml) and sucrose (10 µg/ml) to the drinking water. After 25 days, mice were sacrificed for human cell engraftment analysis, and the other ones were kept for overall survival evaluation. For establishing human cell engraftment, either mixed bone marrow from tibias and femurs or spleens were crushed into HBSS with 1% FBS, and then washed with PBS. The number of human cells ($hCD33^+/hCD45^+$ cells) in the bone marrow and spleen was then evaluated by flow cytometry (LSRII Fortessa). For MOLM-14 shATG12 and MOLM-14/TKD shATG12 *in vivo* experiments, $2.10^6$ cells were injected into the tail vein of the NSG mice. After injection, mice were randomly split into 2 groups: one group was treated with 200 µg/ml doxycycline and 10 µg/ml sucrose in the drinking water (n=8) and the other only with sucrose 10 µg/ml (n=7). Overall mouse survival was established under these conditions.

**Statistical analysis**

Data from 3 independent experiments are reported as means ± standard error of the mean. Statistical analyses were performed using unpaired two-tailed Student *t* tests with Prism 5 software (GraphPad Software Inc). Differences were considered as significant for p-values <0.05. *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001. The Kaplan-Meier method was used to estimate leukemia-free survival in xenografted mice. Log-rank p-values were used for comparisons of leukemia-free survival among the three subgroups.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

We are very grateful to Jérôme Tamburini (Institut Cochin, Paris, France), Paulo De Sepulveda (CRCM, Marseille, France) and Pierre Brousset (CRCT, Toulouse, France) for providing us with specific leukemic cell lines (MOLM-14-TKD and MV4-11 shFLT3, TF-1-FLT3-ITD, and OCI-AML3 respectively). We acknowledge excellent technical assistance of Mathilde Gotanegre. We are grateful to Manon Farcé and Laetitia Ligat for assistance with flow cytometry and microscopy, respectively. We thank HIMIP collection for patients' samples and Dr Sarah Bertoli for their clinical characterization. This work was supported by the ANR LABEX TOUCAN, the Cancéropole GSO, la Ligue régionale contre le Cancer and la Ligue nationale contre le Cancer. Quentin Heydt is a recipient of the Ligue Nationale contre le Cancer.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

VMDM, CJ, SM, and JES conceived and designed the experiments, QH, CL, ES, and CJ performed the experiments, VMDM, CJ and SM wrote the manuscript.

## CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest

## REFERENCES


1. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute myeloid leukemia. N Engl J Med 2015; 373: 1136-1152.

2. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. N Engl J Med 2016;374:2209-2221

3. Kayser S1, Schlenk RF, Londono MC, Breitenbuecher F, Wittke K, Du J, Groner S, et al. Insertion of FLT3 internal tandem duplication in the tyrosine kinase domain-1 is associated with resistance to chemotherapy and inferior outcome. Blood 2009;114:2386–2392

4. Gallogly MM, Lazarus HM. Midostaurin: an emerging treatment for acute myeloid leukemia patients. J Blood Med 2016;7:73-83

5. White E. The role for autophagy in cancer. J Clin Invest 2015;125:42-46.

6. Guo JY, Chen HY, Mathew R, Fan J, Strohecker AM, Karsli-Uzunbas G, et al. Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. Genes Dev 2011;25:460-470.

7. Corazzari M, Rapino F, Ciccosanti F, Giglio P, Antonioli M, Conti B, et al. Oncogenic BRAF induces chronic ER stress condition resulting in increased basal autophagy and apoptotic resistance of cutaneous melanoma. Cell Death Differ 2015;22:946-958.

8. Colecchia D, Rossi M, Sasdelli F, Sanzone S, Strambi A, Chiariello M. MAPK15 mediates BCR-ABL1-induced autophagy and regulates oncogene-dependent cell proliferation and tumor formation. Autophagy 2015;11:1790-802.

9. Bellodi C, Lidonnici MR, Hamilton A, Helgason GV, Soliera AR, Ronchetti M, et al. Targeting autophagy potentiates tyrosine kinase inhibitor-induced cell death in Philadelphia chromosome-positive cells, including primary CML stem cells. J Clin Invest 2009;119:1109-1123.

10. Mitou G, Frentzel J, Desquesnes A, Le Gonidec S, AlSaati T, Beau I, et al. Targeting autophagy enhances the anti-tumoral action of crizotinib in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. Oncotarget 2015;6:30149-30164.

11. Rebecca VW and Amaravadi RK. Emerging strategies to effectively target autophagy in cancer. Oncogene 2016;35:1-11.

12. Bosnjak M, Ristic B, Arsikin K, Mircic A, Suzin-Zivkovic V, Perovic V, et al. Inhibition of mTOR-dependent autophagy sensitizes leukemic cells to cytarabine-induced apoptotic death. PLoS One 2014;9:e94374.

13. Piya S, Kornblau SM, Ruvolo VR, Mu H1, Ruvolo PP, McQueen T, et al. Atg7 suppression enhances chemotherapeutic agent sensitivity and overcomes stroma-mediated chemoresistance in acute myeloid leukemia. Blood 2016 ;128:1260-1269.

14. Gammoh N, Lam D, Puente C, Ganley I, Marks PA, Jiang X. Role of autophagy in histone deacetylase inhibitor-induced apoptotic and nonapoptotic cell death. Proc Natl Acad Sci U S A 2012;109:6561-6565.

15. Torgersen ML, Engedal N, Bøe SO, Hokland P, Simonsen A. Targeting autophagy potentiates the apoptotic effect of histone deacetylase inhibitors in t(8;21) AML cells. Blood 2013;122:2467-2476.

16. Choudhary C, Olsen JV, Brandts C, Cox J, Reddy PN, Böhmer FD, et al. Mislocalized activation of oncogenic RTKs switches downstream signaling outcomes. Mol Cell 2009; 36:326-39

17. B'chir W, Maurin AC, Carraro V, Averous J, Jousse C, Muranishi Y, et al. The eIF2α/ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. Nucleic Acids Res 2013;41:7683-7699.

18. Ameri K and Harris AL. Activating transcription factor 4. Int J Biochem Cell Biol 2008;40: 14-21.

19. Lefort S, Joffre C, Kieffer Y, Givel AM, Bourachot B, Zago G, et al. Inhibition of autophagy as a new means of improving chemotherapy efficiency in high-LC3B triple-negative breast cancers._Autophagy 2014;10:2122-2142.

20. Yang S, Wang X, Contino G, Liesa M, Sahin E, Ying H, et al. Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. Genes Dev 2011;25:717-729.

21. Ronan B, Flamand O, Vescovi L, Dureuil C, Durand L, Fassy F, et al. A highly potent and selective Vps34 inhibitor alters vesicle trafficking and autophagy. Nat Chem Biol 2014; 10:1013-1019.

22. Larrue C, Saland E, Boutzen H, Vergez F, David M, Joffre C, et al. Proteasome inhibitors induce FLT3-ITD degradation through autophagy in AML cells. Blood 2016;127:882-892.

23. Watson AS, Riffelmacher T, Stranks A, Williams O, De Boer J, Cain K, et al (2015). Autophagy limits proliferation and glycolytic metabolism in acute myeloid leukemia. Cell Death Discov 2015;1. pii: 15008.

24. Visconte V, Przychodzen B, Han Y, Nawrocki ST, Thota S, Kelly KR, et al. Complete mutational spectrum of the autophagy interactome: A novel class of tumor suppressor genes in myeloid neoplasms. Leukemia 2016;31:505-510.

25. Isakson P, Bjørås M, Bøe SO, Simonsen A. Autophagy contributes to therapy-induced degradation of the PML/RARA oncoprotein. Blood 2010;116:2324-2331.

26. Sujobert P, Poulain L, Paubelle E, Zylbersztejn F, Grenier A, Lambert M, et al. Co-activation of AMPK and mTORC1 Induces Cytotoxicity in Acute Myeloid Leukemia. Cell Rep 2015;11:1446-1457.

27. Ishizawa J, Kojima K, Chachad D, Ruvolo P, Ruvolo V, Jacamo RO, et al. ATF4 induction through an atypical integrated stress response to ONC201 triggers p53-independent apoptosis in hematological malignancies. Sci Signal 2016;9:ra17.

28. Zhou C, Martinez E, Di Marcantonio D, Patel-Solanki N, Aghayev T, Peri S, et al. JUN is a key transcriptional regulator of the unfolded protein response in acute myeloid leukemia. Leukemia 2016 Dec 16. [Epub ahead of print]

29. Singleton DC and Harris AL. Targeting the ATF4 pathway in cancer therapy. Expert Opin Ther Targets 2012;16:1189-1202

30. Pakos-Zebrucka K, Koryga I, Mnich K, Ljujic M, Samali A, Gorman AM. The integrated stress response. EMBO Rep 2016;17:1374-1395.

31. Doménech E, Maestre C, Esteban-Martínez L, Partida D, Pascual R, Fernández-Miranda G, et al. AMPK and PFKFB3 mediate glycolysis and survival in response to mitophagy during mitotic arrest. Nat Cell Biol 2015;17:1304-1316.

32. Lee IH, Kawai Y, Fergusson MM, Rovira II, Bishop AJ, Motoyama N, et al. Atg7 modulates p53 activity to regulate cell cycle and survival during metabolic stress. Science 2012;336:225-228.

33. Jia W, He MX, McLeod IX, Guo J, Ji D, He YW. Autophagy regulates T lymphocyte proliferation through selective degradation of the cell-cycle inhibitor CDKN1B/p27Kip1. Autophagy 2015; 11:2335-2345.

34. Martinez-Lopez N, Athonvarangkul D, Mishall P, Sahu S, Singh R. Autophagy proteins regulate ERK phosphorylation. Nat Commun 2013;4:2799.

35. Kiyoi H. Flt3 inhibitors: recent advances and problems for clinical application. Nagoya J Med Sci 2015;77:7-17.

36. Alvarado Y, Kantarjian HM, Luthra R, Ravandi F, Borthakur G, Garcia-Manero G, et al. Treatment with FLT3 inhibitor in patients with FLT3-mutated acute myeloid leukemia is associated with development of secondary FLT3-tyrosine kinase domain mutations. Cancer 2014;120: 2142-2149.

37. Pasquier B, El-Ahmad Y, Filoche-Rommé B, Dureuil C, Fassy F, Abecassis PY, et al. Discovery of (2S)-8-[(3R)-3-methylmorpholin-4-yl]-1-(3-methyl-2-oxobutyl)-2-(trifluoromethyl)-3,4-dihydro-2H-pyrimido[1,2-a]pyrimidin-6-one: a novel potent and selective inhibitor of Vps34 for the treatment of solid tumors. J Med Chem 2015;58:376-400.

**Figure 1**

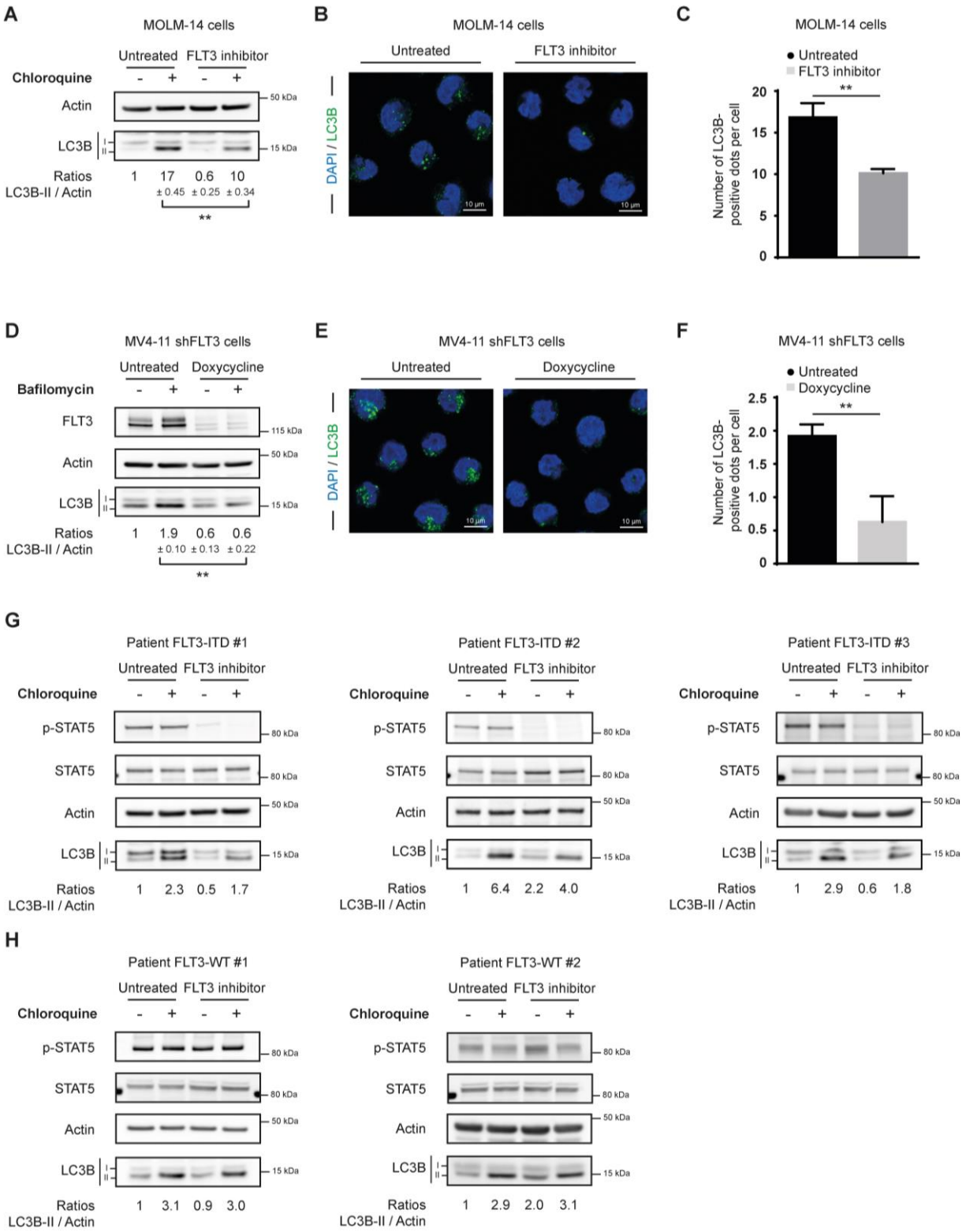

A
MOLM-14 cells
Untreated FLT3 inhibitor
Chloroquine - + - +
Actin
LC3B
50 kDa
15 kDa
Ratios LC3B-II / Actin 1 17 0.6 10
± 0.45 ± 0.25 ± 0.34
**
B
MOLM-14 cells
Untreated
FLT3 inhibitor
DAPI / LC3B
10 µm
C
MOLM-14 cells
Untreated
FLT3 inhibitor
Number of LC3B-positive dots per cell
**
D
MV4-11 shFLT3 cells
Untreated Doxycycline
Bafilomycin - + - +
FLT3
115 kDa
Actin
LC3B
Ratios LC3B-II / Actin 1 1.9 0.6 0.6
± 0.10 ± 0.13 ± 0.22
**
E
MV4-11 shFLT3 cells
Untreated
Doxycycline
DAPI / LC3B
F
MV4-11 shFLT3 cells
Untreated
Doxycycline
Number of LC3B-positive dots per cell
**
G
Patient FLT3-ITD #1
Untreated FLT3 inhibitor
Chloroquine - + - +
p-STAT5
STAT5
80 kDa
Actin
LC3B
Ratios LC3B-II / Actin 1 2.3 0.5 1.7
Patient FLT3-ITD #2
Ratios LC3B-II / Actin 1 6.4 2.2 4.0
Patient FLT3-ITD #3
Ratios LC3B-II / Actin 1 2.9 0.6 1.8
H
Patient FLT3-WT #1
Ratios LC3B-II / Actin 1 3.1 0.9 3.0
Patient FLT3-WT #2
Ratios LC3B-II / Actin 1 2.9 2.0 3.1

**Figure S1**

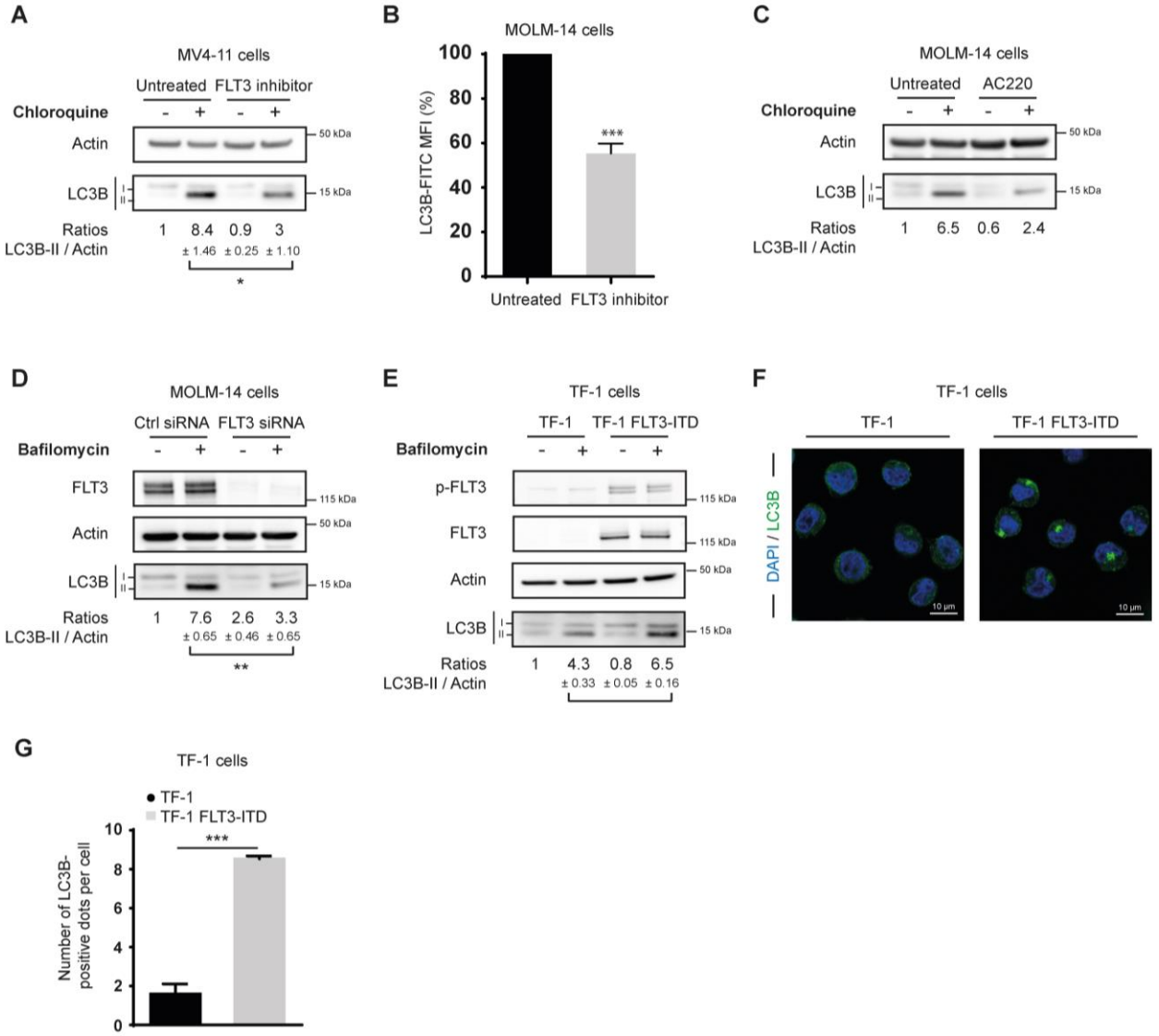

A
MV4-11 cells
Untreated FLT3 inhibitor
Chloroquine - + - +
Actin
LC3B
50 kDa
15 kDa
Ratios LC3B-II / Actin 1 8.4 ± 1.46 0.9 ± 0.25 3 ± 1.10
*
B
MOLM-14 cells
LC3B-FITC MFI (%)
100
80
60
40
20
0
***
Untreated FLT3 inhibitor
C
MOLM-14 cells
Untreated AC220
Chloroquine - + - +
Actin
LC3B
50 kDa
15 kDa
Ratios LC3B-II / Actin 1 6.5 0.6 2.4
D
MOLM-14 cells
Ctrl siRNA FLT3 siRNA
Bafilomycin - + - +
FLT3
Actin
LC3B
115 kDa
50 kDa
15 kDa
Ratios LC3B-II / Actin 1 7.6 ± 0.65 2.6 ± 0.46 3.3 ± 0.65
**
E
TF-1 cells
TF-1 TF-1 FLT3-ITD
Bafilomycin - + - +
p-FLT3
FLT3
Actin
LC3B
115 kDa
50 kDa
15 kDa
Ratios LC3B-II / Actin 1 4.3 ± 0.33 0.8 ± 0.05 6.5 ± 0.16
F
TF-1 cells
TF-1 TF-1 FLT3-ITD
DAPI / LC3B
10 µm
G
TF-1 cells
TF-1
TF-1 FLT3-ITD
Number of LC3B-positive dots per cell
10
8
6
4
2
0
***

**Figure 2**

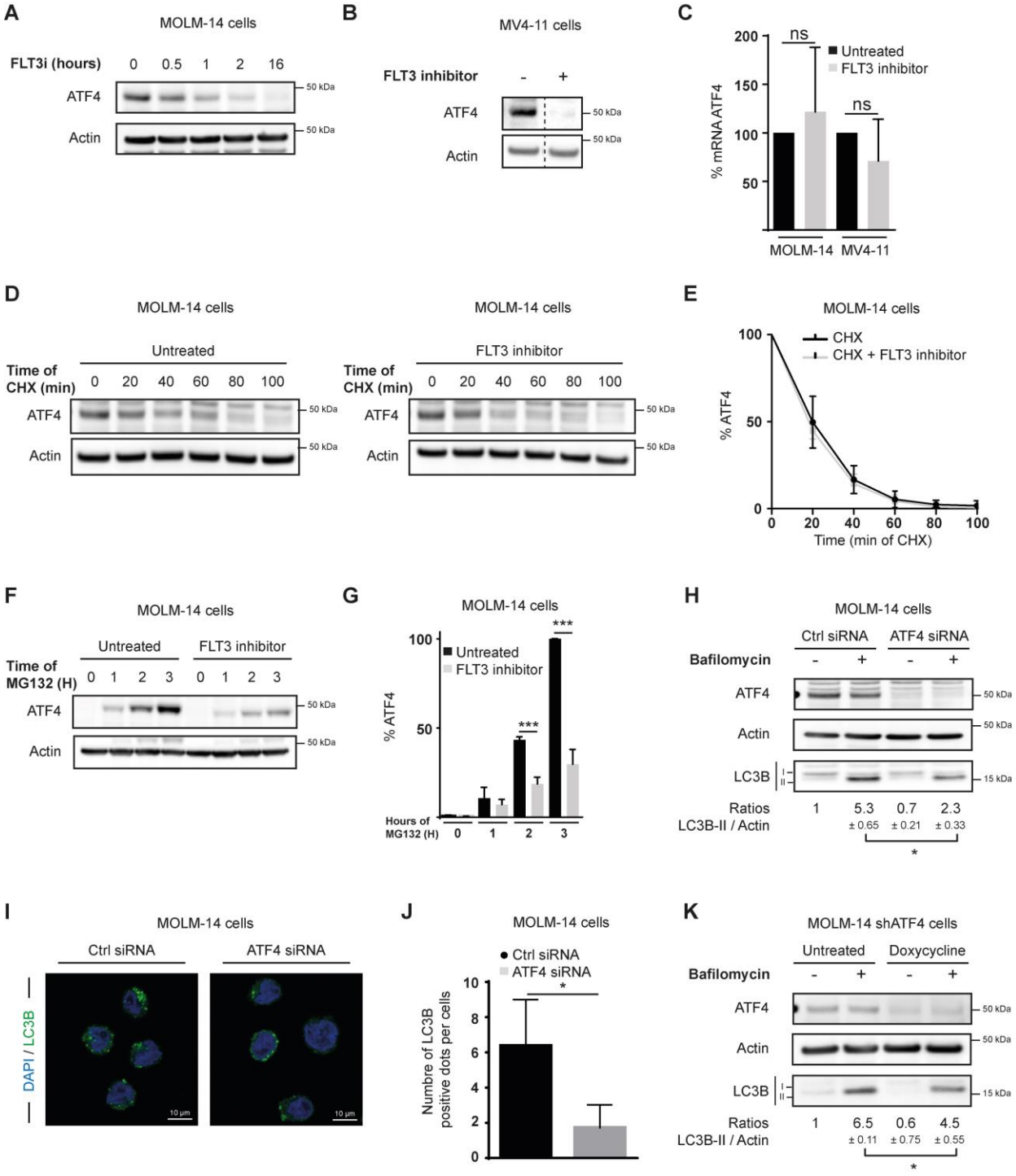

A
MOLM-14 cells
FLT3i (hours) 0 0.5 1 2 16
ATF4
Actin
50 kDa
B
MV4-11 cells
FLT3 inhibitor - +
ATF4
Actin
C
% mRNA ATF4
ns
Untreated
FLT3 inhibitor
MOLM-14 MV4-11
D
MOLM-14 cells
Untreated
FLT3 inhibitor
Time of CHX (min) 0 20 40 60 80 100
E
MOLM-14 cells
CHX
CHX + FLT3 inhibitor
% ATF4
Time (min of CHX)
F
MOLM-14 cells
Untreated FLT3 inhibitor
Time of MG132 (H) 0 1 2 3 0 1 2 3
G
MOLM-14 cells
Untreated
FLT3 inhibitor
% ATF4
Hours of MG132 (H) 0 1 2 3
H
MOLM-14 cells
Ctrl siRNA ATF4 siRNA
Bafilomycin - + - +
LC3B
Ratios LC3B-II / Actin 1 5.3 ± 0.65 0.7 ± 0.21 2.3 ± 0.33
I
MOLM-14 cells
Ctrl siRNA ATF4 siRNA
DAPI / LC3B
10 µm
J
MOLM-14 cells
Ctrl siRNA
ATF4 siRNA
Numbre of LC3B positive dots per cells
K
MOLM-14 shATF4 cells
Untreated Doxycycline
Bafilomycin - + - +
LC3B
Ratios LC3B-II / Actin 1 6.5 ± 0.11 0.6 ± 0.75 4.5 ± 0.55

**Figure S2**

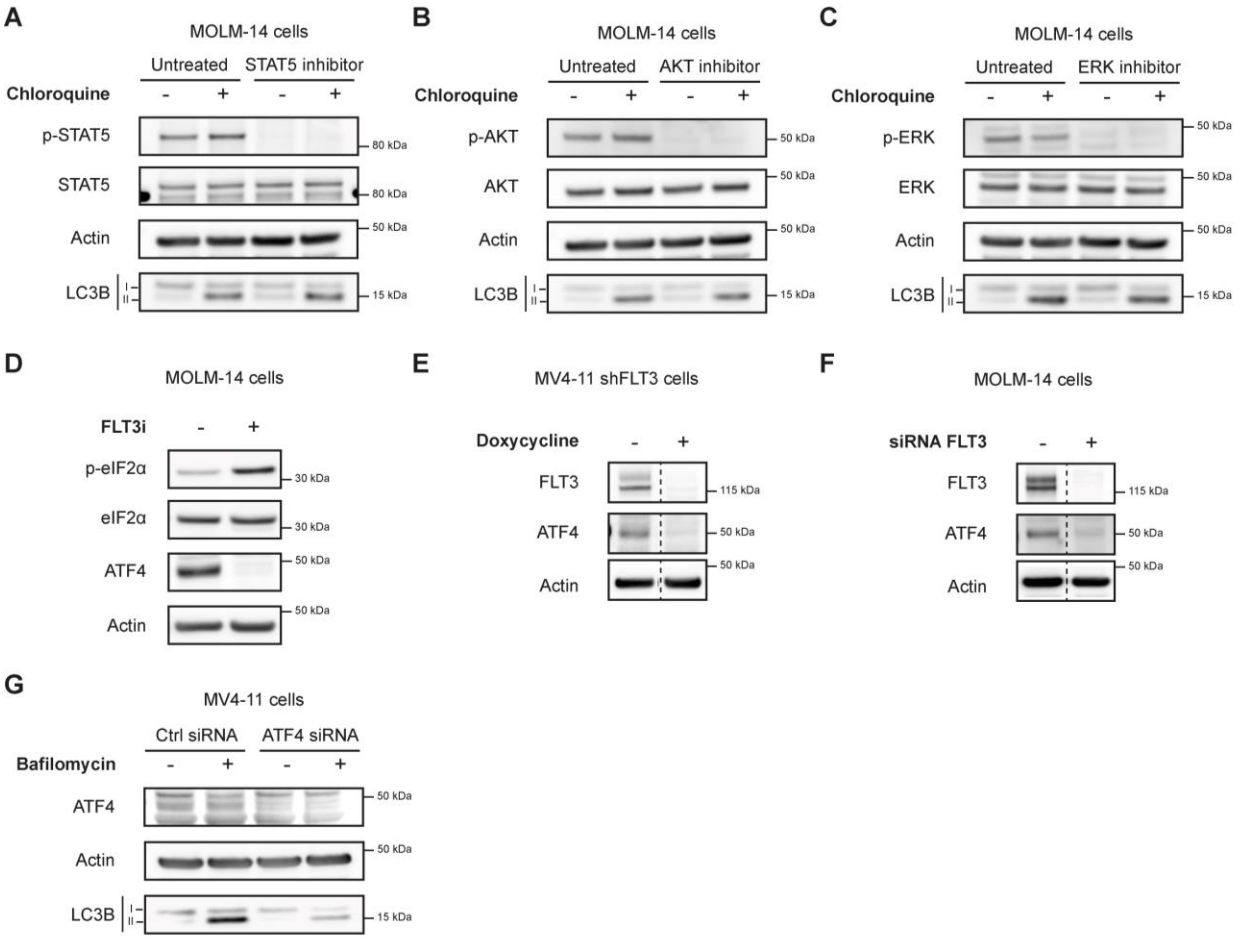

A
MOLM-14 cells
Untreated
STAT5 inhibitor
Chloroquine
- + - +
p-STAT5
STAT5
Actin
LC3B
I
II
80 kDa
80 kDa
50 kDa
15 kDa
B
MOLM-14 cells
Untreated
AKT inhibitor
Chloroquine
- + - +
p-AKT
AKT
Actin
LC3B
I
II
50 kDa
50 kDa
50 kDa
15 kDa
C
MOLM-14 cells
Untreated
ERK inhibitor
Chloroquine
- + - +
p-ERK
ERK
Actin
LC3B
I
II
50 kDa
50 kDa
50 kDa
15 kDa
D
MOLM-14 cells
FLT3i
- +
p-eIF2α
eIF2α
ATF4
Actin
30 kDa
30 kDa
50 kDa
50 kDa
E
MV4-11 shFLT3 cells
Doxycycline
- +
FLT3
ATF4
Actin
115 kDa
50 kDa
50 kDa
F
MOLM-14 cells
siRNA FLT3
- +
FLT3
ATF4
Actin
115 kDa
50 kDa
50 kDa
G
MV4-11 cells
Ctrl siRNA
ATF4 siRNA
Bafilomycin
- + - +
ATF4
Actin
LC3B
I
II
50 kDa
50 kDa
15 kDa

**Figure 3**

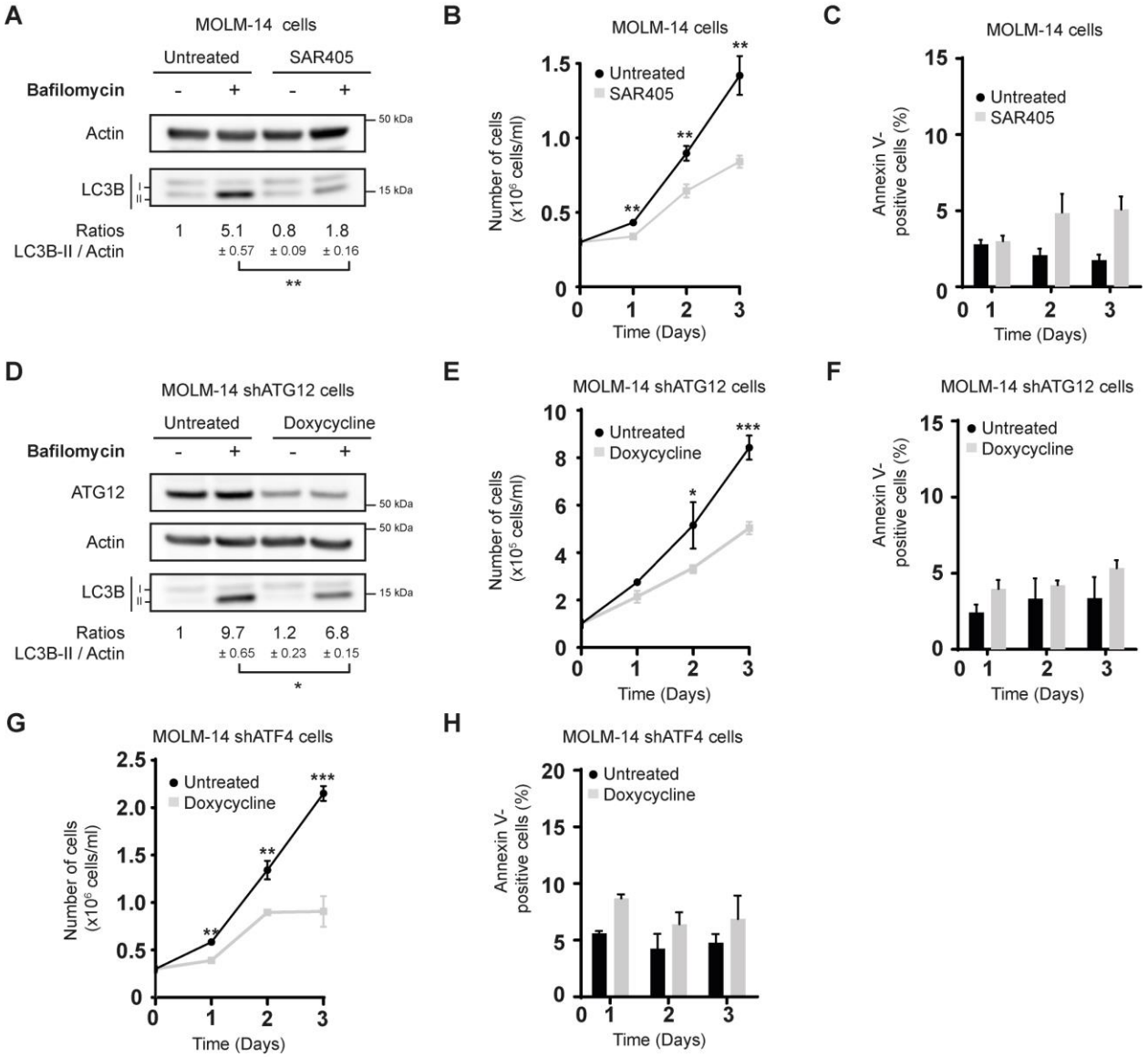

A
MOLM-14 cells
Untreated
SAR405
Bafilomycin
- + - +
Actin
LC3B
I
II
50 kDa
15 kDa
Ratios
LC3B-II / Actin
1 5.1 ± 0.57 0.8 ± 0.09 1.8 ± 0.16
**
B
MOLM-14 cells
Untreated
SAR405
Number of cells (x10^6 cells/ml)
Time (Days)
C
MOLM-14 cells
Untreated
SAR405
Annexin V-positive cells (%)
Time (Days)
D
MOLM-14 shATG12 cells
Untreated
Doxycycline
Bafilomycin
- + - +
ATG12
Actin
LC3B
50 kDa
50 kDa
15 kDa
Ratios
LC3B-II / Actin
1 9.7 ± 0.65 1.2 ± 0.23 6.8 ± 0.15
*
E
MOLM-14 shATG12 cells
Untreated
Doxycycline
Number of cells (x10^5 cells/ml)
Time (Days)
F
MOLM-14 shATG12 cells
Untreated
Doxycycline
Annexin V-positive cells (%)
Time (Days)
G
MOLM-14 shATF4 cells
Untreated
Doxycycline
Number of cells (x10^6 cells/ml)
Time (Days)
H
MOLM-14 shATF4 cells
Untreated
Doxycycline
Annexin V-positive cells (%)
Time (Days)

**Figure S3**

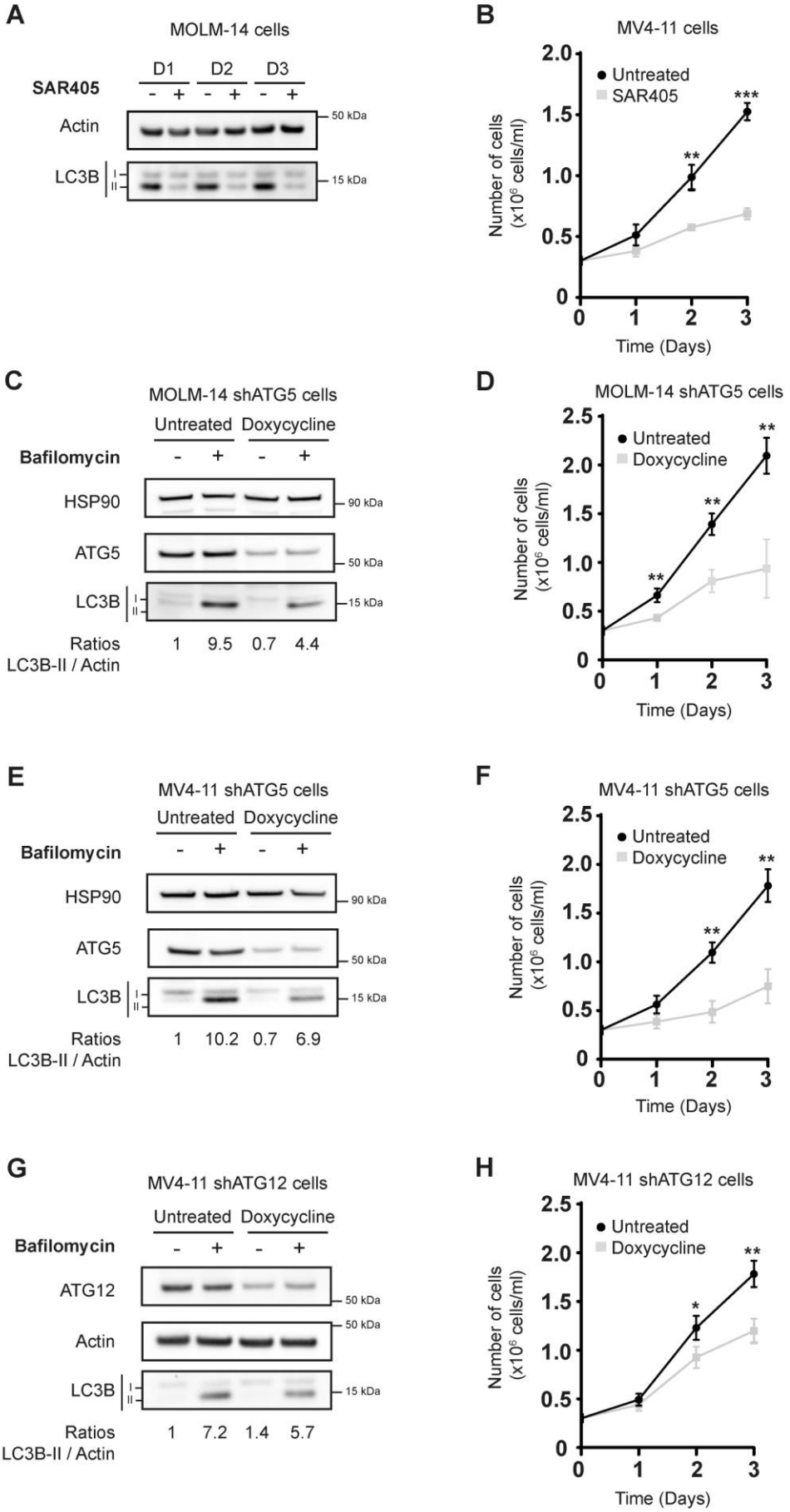
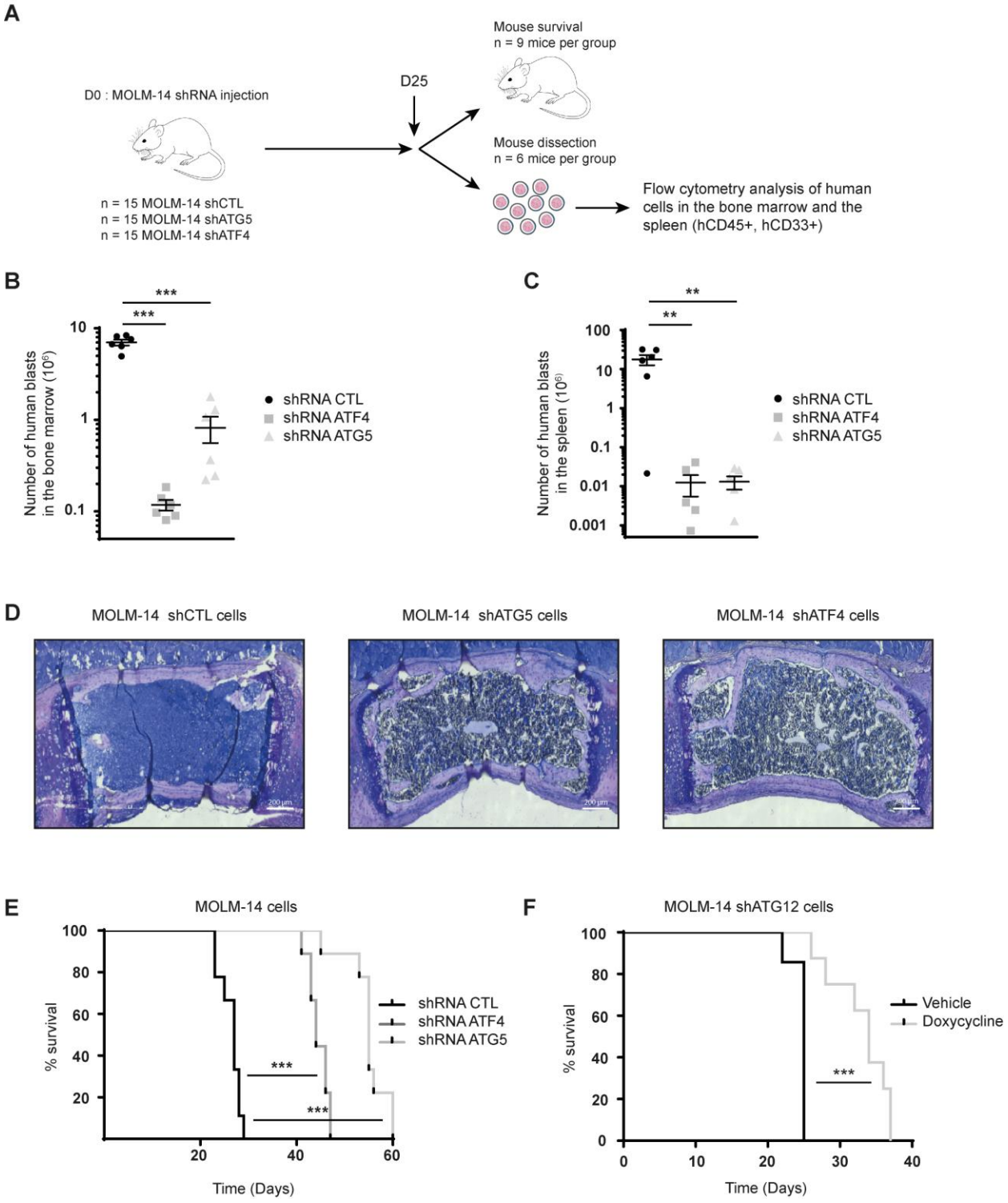
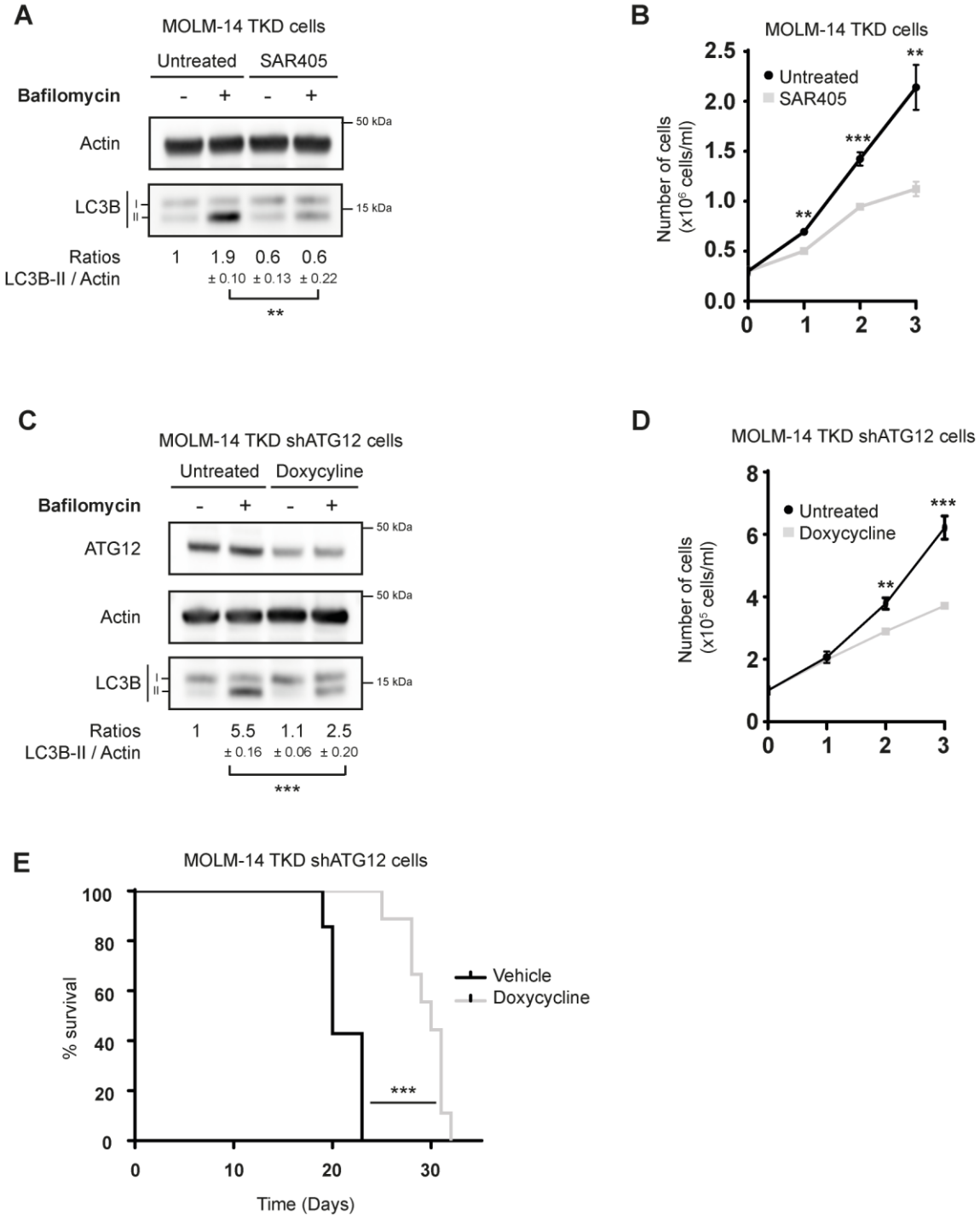

A
MOLM-14 cells
D1 D2 D3
SAR405
- + - + - +
Actin
LC3B
I
II
50 kDa
15 kDa
B
MV4-11 cells
Untreated
SAR405
Number of cells (x10^6 cells/ml)
Time (Days)
C
MOLM-14 shATG5 cells
Untreated Doxycycline
Bafilomycin
- + - +
HSP90
ATG5
LC3B
90 kDa
50 kDa
15 kDa
Ratios LC3B-II / Actin
1 9.5 0.7 4.4
D
MOLM-14 shATG5 cells
Untreated
Doxycycline
Number of cells (x10^6 cells/ml)
Time (Days)
E
MV4-11 shATG5 cells
Untreated Doxycycline
Bafilomycin
- + - +
HSP90
ATG5
LC3B
90 kDa
50 kDa
15 kDa
Ratios LC3B-II / Actin
1 10.2 0.7 6.9
F
MV4-11 shATG5 cells
Untreated
Doxycycline
Number of cells (x10^6 cells/ml)
Time (Days)
G
MV4-11 shATG12 cells
Untreated Doxycycline
Bafilomycin
- + - +
ATG12
Actin
LC3B
50 kDa
50 kDa
15 kDa
Ratios LC3B-II / Actin
1 7.2 1.4 5.7
H
MV4-11 shATG12 cells
Untreated
Doxycycline
Number of cells (x10^6 cells/ml)
Time (Days)

**Figure 4**


A
D0 : MOLM-14 shRNA injection
n = 15 MOLM-14 shCTL
n = 15 MOLM-14 shATG5
n = 15 MOLM-14 shATF4
D25
Mouse survival
n = 9 mice per group
Mouse dissection
n = 6 mice per group
Flow cytometry analysis of human cells in the bone marrow and the spleen (hCD45+, hCD33+)
B
Number of human blasts in the bone marrow (10^6)
shRNA CTL
shRNA ATF4
shRNA ATG5
C
Number of human blasts in the spleen (10^6)
D
MOLM-14 shCTL cells
MOLM-14 shATG5 cells
MOLM-14 shATF4 cells
E
MOLM-14 cells
% survival
Time (Days)
F
MOLM-14 shATG12 cells
Vehicle
Doxycycline

## Figure 5


A
MOLM-14 TKD cells
Untreated
SAR405
Bafilomycin
- + - +
Actin
50 kDa
LC3B
I
II
15 kDa
Ratios
LC3B-II / Actin
1 1.9 0.6 0.6
± 0.10 ± 0.13 ± 0.22
**
B
MOLM-14 TKD cells
Untreated
SAR405
Number of cells
(x10⁶ cells/ml)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0 1 2 3
**
***
**
C
MOLM-14 TKD shATG12 cells
Untreated
Doxycyline
Bafilomycin
- + - +
ATG12
50 kDa
Actin
50 kDa
LC3B
I
II
15 kDa
Ratios
LC3B-II / Actin
1 5.5 1.1 2.5
± 0.16 ± 0.06 ± 0.20
***
D
MOLM-14 TKD shATG12 cells
Untreated
Doxycycline
Number of cells
(x10⁵ cells/ml)
8
6
4
2
0
0 1 2 3
***
**
E
MOLM-14 TKD shATG12 cells
% survival
100
80
60
40
20
0
0 10 20 30
Time (Days)
Vehicle
Doxycycline
***

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1: FLT3-ITD supports basal autophagy in leukemic cells.**

**A**. MOLM-14 cells were treated with PBS (control) or FLT3 inhibitor (100 nM) for 16 h in the presence or absence of chloroquine (15 µM), before being processed for western blot analysis of phospho-STAT5 (p-STAT5), STAT5 and LC3B. Actin was used as a loading control. Numbers represent the LC3B-II/actin ratios obtained by densitometric analysis (n=3 ± SEM).

**B-C.** MOLM-14 cells were treated with PBS (control) or FLT3 inhibitor (100 nM) for 16 h in the presence or absence of chloroquine (15 µM), then stained for LC3B. Representative confocal pictures are shown in B, and the graph in C represents the number of LC3B dots per cell. Scale bar: 10 µm.

**D.** MV4-11 cells stably expressing FLT3-specific-inducible shRNA were treated with PBS (control) or doxycycline (2 µg/ml) for 2 days, then bafilomycin (20 nM) was added or not for 2 h before the cells were processed for western blot analysis of FLT3 and LC3B. Actin was used as a loading control. Numbers represent the LC3B-II/actin ratios obtained by densitometric analysis (n=3 ± SEM).

**E-F.** MV4-11 cells stably expressing FLT3-specific-inducible shRNA were treated with PBS (control) or doxycycline (2 µg/ml) for 2 days, then chloroquine (15 µM) was added for 16 h before staining for LC3B. Representative confocal pictures are shown in E, and the graph in F represents the number of LC3B dots per cell. Scale bar: 10 µm.

**G.** Patient samples harboring the FLT3-ITD mutation were treated with PBS (control) or FLT3 inhibitor (100 nM) for 16 h in the presence or absence of chloroquine (10 µM), before being processed for western blot analysis of phospho-STAT5 (p-STAT5) and LC3B. Actin was used as a loading control. Numbers represent the LC3B-II/actin ratios obtained by densitometric analysis (n=1).

**H**. Same experiment as in G, performed with primary cells from two patients expressing wild type FLT3.

**Figure 2: ATF4 is involved in the FLT3-ITD-dependent signaling required for autophagy.**

**A.** MOLM-14 cells were treated with PBS (control) or FLT3 inhibitor (100 nM) for 30 min, 1 h, 2 h or 16 h and were then processed for western blot analysis of ATF4. Actin was used as a loading control (n=3).

**B.** MV4-11 cells were treated with FLT3 inhibitor (100 nM) for 2 hours, and then processed for western blot analysis of ATF4. Actin was used as a loading control (n=3).

**C.** MOLM-14 and MV4-11 cells were treated with PBS (control) or FLT3 inhibitor (100 nM) for 6 h then processed for Taqman qPCR analysis of ATF4. GUSB and B2M were used as a control genes. Histograms represent the percentage of ATF4 mRNA in cells treated with PBS or FLT3 inhibitor (n=6).

**D-E.** MOLM-14 cells were treated with cycloheximide (CHX: 50 µg/mL) for 20 min, 40 min, 60 min, 80 min or 100 min in the presence (wright panel) or absence (left panel) of FLT3 inhibitor (100 nM), before being processed for western blot analysis of ATF4. Actin was used as a loading control. The graph in **E** represents the percentage of ATF4 protein remaining in cells treated with PBS or FLT3 inhibitor in presence of cycloheximide over time (n=3).

**F-G.** After a pretreatment with cycloheximide (50 µg/mL) of 2 hours, MOLM-14 cells were treated with MG132 (10 µg/mL), for 1h, 2h or 3h in the presence or absence of FLT3 inhibitor (100 nM), before being processed for western blot analysis of ATF4. Actin was used as a loading control. Histogram (**G**) represents the percentage of ATF4 protein in cells treated with PBS or FLT3 inhibitor in presence of MG132 over time (n=3).

**H.** MOLM-14 cells were transfected with ATF4-specific siRNA, then 16 h later cells were treated or not with bafilomycin (20 nM) for 2 h, before being processed for western blot analysis of ATF4 and LC3B. Actin was used as a loading control. Numbers represent the LC3B-II/actin ratios obtained by densitometric analysis (n=3 ± SEM).

**I-J.** MOLM-14 cells were transfected with ATF4-specific siRNA, then 16 h later cells were treated or not with bafilomycin (20 nM) for 2 h before staining for LC3B. Representative confocal pictures are shown in **I**, and the graph in **J** represents the number of LC3B dots per cell. Scale bar: 10 µm.

**K.** MOLM-14 cells stably expressing ATF4-specific-inducible shRNA were treated with PBS (control) or doxycycline (2 µg/ml) for 2 days. For the final 2 h cells were treated with bafilomycin (20 nM) or not and then processed for western blot analysis of ATF4 and LC3B. Actin was used as a loading control. Numbers represent the LC3B-II/actin ratios obtained by densitometric analysis (n=3 ± SEM).

**<u>Figure 3:</u> Targeting autophagy inhibits FLT3-ITD AML cells proliferation.**

**A.** MOLM-14 cells were treated with DMSO (control) or the VPS34 inhibitor SAR-405 (3 µM) for 3 days. For the final 2 h cells were treated or not with bafilomycin (20 nM) and were then processed for western blot analysis of LC3B. Actin was used as a loading control. Numbers represent the LC3B-II/actin ratios obtained by densitometric analysis (n=3 ± SEM).

**B.** MOLM-14 cells were treated with DMSO (control) or SAR-405 (3 µM) for 3 days, before the number of cells was assessed by trypan blue exclusion counting. The graph represents the number of cells per day (n=3 ± SEM).

**C.** MOLM-14 cells were treated with DMSO (control) or SAR-405 (3 µM) for 3 days before cell death was assessed by annexin V labelling and flow cytometry analysis. The graph represents the percentage of annexin V-positive cells (n=3 ± SEM).

**D.** MOLM-14 cells stably expressing an ATG12-specific inducible shRNA were treated with PBS (control) or doxycycline (2 µg/ml) for 3 days. For the final 2 h cells were also treated with bafilomycin (20 nM) or not before being processed for western blot analysis of ATG12 and LC3B. Actin was used as a loading control. Numbers represent the LC3B-II/actin ratios obtained by densitometric analysis (n=3 ± SEM).

**E.** MOLM-14 cells stably expressing ATG12-specific inducible shRNA were treated with PBS (control) or doxycycline (2 µg/ml) for 3 days before the number of cells was assessed by trypan blue exclusion counting. The graph represents the number of cells per day (n=3 ± SEM).

**F**. MOLM-14 cells stably expressing ATG12-specific inducible shRNA were treated with PBS (control) or doxycycline (2 µg/ml) for 3 days before cell death was assessed by annexin V labelling. The graph represents the percentage of dead cells (n=3 ± SEM).

**G.** MOLM-14 cells stably expressing ATF4-specific inducible shRNA were treated with DMSO or doxycycline (2 µg/ml) for 3 days before the number of cells was assessed by trypan blue exclusion counting. The graph represents the number of cells per day (n=3 ± SEM).

**H**. MOLM-14 cells stably expressing ATF4-specific inducible shRNA were treated with PBS (control) or doxycycline (2 µg/ml) for 3 days before cell death was assessed by annexin V labelling. The graph represents the percentage of dead cells (n=3 ± SEM).

**<u>Figure 4:</u> Targeting autophagy or ATF4 decreases tumor burden and increases survival of mice xenografted with FLT3-ITD AML cells.**

**A.** NSG mice (n=15) engrafted with MOLM-14 cells stably expressing the indicated inducible shRNAs by intravenous (IV) injection, were treated with sucrose (10 µg/ml) and doxycycline (200 µg/ml) via their drinking water. 25 days post-graft, 6 mice per group were sacrificed and the number of human cells (hCD45+ and hCD33+) present in the bone marrow and spleen was analysed by flow cytometry. The remaining 9 mice per group were used for overall survival analysis.

**B-C.** Graphs representing the number of human cells positive for hCD45 and hCD33 within the murine bone marrow (B) and spleen (C).

**D.** Histochemical MGG (May-Grünwald-Giemsa) staining of sternums of NSG mice engrafted with MOLM-14 cells stably expressing a control inducible shRNA (n=6), an ATG5-specific inducible shRNA (n=6) or an ATF4-specific inducible shRNA (n=6) by IV injection. Scale bar: 200 µm.

**E.** Graph representing the Kaplan–Meier survival curves of mice engrafted as described in **A**.

**F.** NSG mice were engrafted with MOLM-14 cells stably expressing an ATG12-specific inducible shRNA by IV injection, and were then treated with sucrose (10 µg/ml) with or without doxycycline (200 µg/ml) via their drinking water. The graph represents the Kaplan–Meier survival curves of mice treated with sucrose (n=7) or sucrose + doxycycline (n=8).

**<u>Figure 5:</u> Targeting autophagy or ATF4 overcomes resistance to FLT3 inhibitors.**

**A.** MOLM-14 TKD cells were treated with DMSO (control) or SAR405 (a VPS34 inhibitor, 3 µM), for 3 days. For the final 2 h cells were then treated with bafilomycin (20 nM) or not and then processed for western blot analysis of LC3B. Actin was used as a loading control. Numbers represent the LC3B-II/actin ratios obtained by densitometric analysis (n=3 ± SEM).

**B.** MOLM-14 TKD cells were treated with DMSO (control) or SAR405 (3 µM) for 3 days before the number of cells was assessed by trypan blue exclusion counting. The graph represents the number of cells per day (n=3 ± SEM).

**C.** MOLM-14 TKD cells stably expressing ATG12-specific inducible shRNA were treated with PBS (control) or doxycycline (2 µg/ml) for 3 days. For the final 2 h cells were then treated with bafilomycin (20 nM) or not and processed for western blot analysis of ATG12 and LC3B. Actin was used as a loading control. Numbers represent the LC3B-II/actin ratios obtained by densitometric analysis (n=3 ± SEM).

**D.** MOLM-14 TKD cells stably expressing ATG12-specific inducible shRNA were treated with PBS (control) or doxycycline (2 µg/ml) for 3 days before the number of cells was assessed by trypan blue exclusion counting. The graph represents the number of cells per day (n=3 ± SEM).

**E.** NSG mice (n=15) engrafted with MOLM-14 TKD cells stably expressing the ATG12 inducible shRNAs by IV injection, were treated with sucrose (10 µg/ml) with or without doxycycline (200 µg/ml) via their drinking water and their overall survival was analyzed. The graph represents the Kaplan–Meier survival curves.

# IX. Discussion générale

## 1. L'autophagie, une cible thérapeutique dans les LAM ?

Il est maintenant clairement établi que l'autophagie possède un rôle central dans le développement et la progression des cancers. La majorité des études réalisées sur les fonctions de l'autophagie dans les cancers ont conclu que ce processus est globalement cytoprotecteur et ont suggéré que l'induction de l'autophagie est un mécanisme de résistance (Levy, 2011, Maycotte, 2011, White, 2012). Ceci est la base de différents essais cliniques en cours dans lesquelles les thérapies conventionnelles sont associées à des inhibiteurs de l'autophagie. Néanmoins, en fonction du stade de développement, des mutations impliquées, du type de maladie ou du type de traitement, l'autophagie peut conduire à des résultats divergents sur le processus tumoral (Joffre, 2017). Il est donc très difficile d'attribuer un rôle bien défini à l'autophagie, contribuant ainsi à la grande complexité du système. Le bilan actuel sur le bénéfice clinique du ciblage de l'autophagie chez les patients reste flou et beaucoup de questions restent en suspens.

La première question est de savoir si l'autophagie possède un rôle cytoprotecteur ou cytotoxique dans un contexte en particulier de traitement. Dans différents cas, il a été conclu que l'autophagie ne possédait pas une fonction de résistance mais au contraire les drogues utilisées peuvent avoir des effets anti-tumoraux dépendants de l'induction de l'autophagie en réponse à une drogue. Par conséquent, l'inhibition de l'autophagie diminue la mort cellulaire et augmente la progression tumorale. Par exemple, une étude a montré que l'inhibition du récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor) avec l'erlotinib (thérapie standard dans le cancer du poumon exprimant un récepteur à l'EGF muté) a besoin d'une induction de l'autophagie pour être efficace et diminuer le développement tumoral (Wei, 2013). Dans les LAM, des études récentes sur le récepteur FLT3-ITD ont montré que l'utilisation d'un inhibiteur du protéasome, le bortézomib, a besoin de l'induction de l'autophagie pour dégrader l'oncogène FLT3-ITD et ainsi inhiber le développement des cellules cancéreuses. Il serait donc contradictoire d'inhiber l'autophagie lors d'un traitement au bortézomib (Larrue, 2015). Cependant, nos travaux montrent que dans ce modèle, l'autophagie basale est importante pour soutenir la prolifération des cellules exprimant le récepteur FLT3-ITD et qu'inhiber cette autophagie diminue le développement des cellules cancéreuses. Il est donc nécessaire de définir le rôle de l'autophagie en fonction des traitements et du contexte étudié pour optimiser la prise en charge des patients.

La deuxième chose à considérer est que les molécules utilisées en clinique pour bloquer l'autophagie ne sont pas spécifiques du processus d'autophagie. La chloroquine et l'hydroxychloroquine inhibent l'autophagie en altérant le pH des lysosomes tout en provoquant l'accumulation des autophagosomes. Ces molécules sont peu coûteuses et approuvées par le FDA et peuvent donc être administrées chez les patients. Néanmoins, ces molécules qui ont été décrites pour inhiber l'autophagie peuvent avoir des effets autres qu'inhibiteurs de l'autophagie. En effet, ils peuvent sensibiliser aux autres chimiothérapies par des

mécanismes indépendants de l'autophagie (Maycotte, 2012, Eng, 2016). Deuxièmement, toute modification du pH de la tumeur peut altérer la biodisponibilité du médicament diminuant ainsi l'efficacité d'un traitement (Pellegrini, 2014). C'est pourquoi les industries pharmaceutiques se sont focalisées sur l'identification et le développement d'inhibiteurs plus puissants et plus spécifiques de l'autophagie. Plusieurs petites molécules ont récemment été mises au point pour cibler l'initiation du processus autophagique. Ces molécules, qui sont testée *in cellulo* ou au stade préclinique, ciblent différentes protéines impliquées dans le processus autophagique comme : PIK3C3/Vps34 (formation de l'autophagosome) avec le SAR405 (Ronan, 2014), ULK1 (induction et l'allongement de la phagophore, le précurseur de l'autophagosome) avec le SBI-0206965 (Egan, 2015) ou ATG4 (maturation de LC3) (Xu, 2016).

Une autre difficulté est la visualisation des réponses autophagiques réelles au sein de la tumeur lors du traitement des patients avec des modulateurs de l'autophagie (inhibiteur ou stimulateur). C'est-à-dire, comment pouvons-nous mesurer *in vivo* si l'autophagie a bien été bloquée ou stimulée. L'autophagie est, de par sa nature, un phénomène très dynamique. Alors que nous possédons plusieurs méthodes nous permettant de mesurer ce processus dynamique *in vitro*, nous avons très peu de moyens pour évaluer ce dynamisme dans un organisme vivant (surtout dans les tissus humain) (Thorburn, 2014). L'approche réalisable avec un échantillon de biopsie d'une tumeur à la suite d'un traitement correspond à l'étude du nombre d'autophagosomes grâce à une immunohistochimie ciblant la protéine LC3 (Ladoire, 2012), la protéine Béclin ou une autre protéine connue pour dans les autophagosomes, p62/SQSTM. Il est également possible d'utiliser la microscopie électronique pour évaluer le nombre d'autophagosomes et d'autolysosomes dans le tissu tumoral. Néanmoins ces moyens ne nous permettent pas d'évaluer le flux des cellules cancéreuses. Pour cela, il faudrait réaliser des expériences *ex vivo* et de regarder le flux en présence de bafilomycine. Ceci est plus facilement réalisable dans les cancers liquides type leucémie. En effet, à la suite d'une ponction ou d'une prise de sang il est possible d'utiliser sur les cellules leucémiques du patient les techniques utilisées en routine *in vitro*.

L'autophagie est plus importante pour certaines cellules tumorales que pour d'autres. Cette idée a été appelée « la dépendance à l'autophagie » (Guo, 2011) et identifie l'autophagie comme une nouvelle cible thérapeutique pour certaines tumeurs tout en soulevant la question, lesquelles ? La dernière question est donc de savoir si nous pouvons identifier et valider des biomarqueurs qui prédiront la dépendance des cellules leucémiques à l'autophagie *in vivo*. En d'autres termes, ceci permettrait l'identification des patients qui profiteront au maximum de la modulation de l'autophagie. Certains biomarqueurs comme les oncogènes Ras, $Raf^{V600E}$ dans le mélanome ainsi que BCR/ABL dans les leucémies myéloïdes chroniques ont déjà été décrits pour activer le processus autophagique. Ces oncogènes semblent augmenter une autophagie basale qui est nécessaire au développement des cellules cancéreuses (Guo, 2011, Corazzari, 2015, Colecchia, 2015). Dans notre étude, nous avons mis en évidence des résultats similaires avec

l'implication de l'oncogène FLT3-ITD dans l'induction et la dépendance des cellules cancéreuses à l'autophagie. L'effet cytotoxique des traitements conventionnels pourrait donc être amélioré avec un traitement combiné avec des inhibiteurs de l'autophagie. Des études appuient déjà cette hypothèse avec l'amélioration de l'effet cytotoxique de la cisplatine en combinaison avec une inhibition de l'autophagie basale qui potentialise dans le cancer du poumon (Kaminsky, 2012).

## 2. La voie de signalisation PKC-eIF6-ATF4, une cible thérapeutique potentielle ?

Au cours de notre travail, nous avons été les premiers à montrer l'implication de la voie PKCβII-eIF6 dans la régulation de l'expression de la protéine ATF4 en aval de FLT3-ITD. De plus, nous avons observé que ce facteur de traduction est essentiel à l'expression de gènes nécessaires au processus d'autophagie ainsi qu'à la survie des cellules dans notre modèle. De façon intéressante, dans la littérature, ce facteur est décrit comme étant surexprimé dans les cancers et impliqué dans la résistance aux traitements. En effet, le niveau d'ARN messager d'ATF4 est corrélé avec la chimiorésistance des cellules tumorales aux molécules interagissant avec l'ADN comme la cisplatine, la doxorubicine ou l'ectoposide (Levenson, 2000, Tanabe, 2003). Des travaux montrent que les mécanismes de résistance pouvant intervenir font appel à la protéine régulatrice Clock. Cette protéine se lie à la E-Box du promoteur ATF4 augmentant ainsi sa transcription en réponse au cisplatine, induisant ainsi les enzymes impliquées dans le métabolisme du glutathion et contribuant ainsi à la chimiorésistance (Igarashi, 2007). De plus, d'autres études montrent que les carences en glucose engendrent une chimiorésistance des cellules cancéreuses du colon en surexprimant le facteur ATF4 (Hu, 2016). Il peut donc y avoir une induction d'autophagie dans ces cellules cancéreuses. Nos résultats et l'ensemble de ces données bibliographiques, suggèrent qu'ATF4 est une cible thérapeutique attrayante et indiquent que le développement de thérapies anticancéreuses visant ce facteur devrait être mis en place. Cependant, il est compliqué de cibler les facteurs de transcription avec de petites molécules. Il est donc préférable de développer des inhibiteurs visant les enzymes qui catalysent la synthèse, qui permettent les modifications post-traductionnelles ou qui influencent l'activité transcriptionnelle d'ATF4 que de le cibler directement. D'après nos travaux, la voie PKCβII-eIF6 représenterait une cible prometteuse dans le modèle FLT3-ITD.

Les différentes protéines de la voie PKC-eIF6 sont souvent retrouvées surexprimées dans les cancers et impliquées dans le développement tumoral. Les premières études réalisées sur les protéines PKC ont montré des niveaux élevés de PKCβII lors des étapes initiales de la tumorigenèse et dans les carcinomes du côlon par rapport au tissu colique normal (Craven, 1992, Davidson, 1998). Des études plus récentes indiquent que 18 % des adénocarcinomes primaires du colon présentent des niveaux très élevés de PKCβII et ceux-ci associés à des taux de survie très faibles (Spindler, 2009). En plus du cancer colorectal, PKCβII est retrouvée surexprimée dans des cellules du cancer du sein. La protéine PKCβII augmente les niveaux de cycline D1, permettant ainsi la prolifération des cellules cancéreuses du sein (Li, 2006). Les

hémopathies malignes ont également étaient décrites pour surexprimer PKCβII. C'est le cas des lymphomes B diffus à grandes cellules où l'expression de PKCβII est associée ici aussi à un mauvais pronostic (Li, 2007). Les études sur l'implication du facteur eIF6 dans le développement des cancers sont quant à elles encore à leurs débuts. Certaines ont retrouvé ce facteur surexprimé dans certains types de cancers comme les cancers colorectaux, les cancers de la tête et du cou ainsi que les leucémies aiguës promyélocytaire (Sanvito, 2000, Rosso, 2004, Harris 2004). La surexpression d'eIF6 a été décrite pour être impliquée dans la migration et l'invasion des cellules cancéreuses. Dans ce contexte, les protéines régulées en aval d'eIF6 sont présents au sein d'un réseau fonctionnel contrôlant la motilité cellulaire et les métastases tumorales (Pinzaglia, 2015). Cependant, le mécanisme permettant la surexpression d'eIF6 n'est pas encore bien défini. Seule la phosphorylation sur la sérine 235 d'eIF6 a été décrite pour être impliquée dans l'activité pro-tumorale d'eIF6 et des études ont montré que cette phosphorylation est stimulée par la protéine PKCβII *in vitro* (Ceci, 2003).

Ces différentes observations ont permis le développement d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques des différentes isoformes des PKC. C'est le cas de l'Enzastaurine qui cible spécifiquement PKCβII. Cet inhibiteur génère des effets significatifs sur la croissance des cellules cancéreuses du sein *in vitro* et *in vivo* (Hanauske, 2007). Dans les hémopathies malignes, l'Enzastaurin affiche les propriétés pro-apoptotique dans les lymphocytes T et des lignées de lymphomes à cellules B. L'utilisation de cet inhibiteur présente également un intérêt dans le traitement de divers types de lymphomes, notamment en monothérapie dans les thérapies de combinaison (Civallero, 2010, Miluzio, 2011). Cependant, le développement de l'Enzastaurin comme thérapie anticancéreuse a été interrompu en raison de son efficacité limitée dans des essais cliniques de phase III. Bien que l'Enzastaurin n'ait pas pu produire des résultats thérapeutiques attendus, il est important de se baser sur ces échecs cliniques pour en retirer des informations (biomarqueurs, etc.) permettant d'améliorer les stratégies thérapeutiques mieux tolérées et plus efficace.

# Références bibliographiques


Afonyushkin, T., Oskolkova, O. V., Philippova, M., Resink, T.J., Erne, P., Binder, B.R., and Bochkov, V.N. (2010). Oxidized phospholipids regulate expression of ATF4 and VEGF in endothelial cells via NRF2-dependent mechanism: Novel point of convergence between electrophilic and unfolded protein stress pathways. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *30*, 1007–1013.

Agarraberes, F. a, and Dice, J.F. (2001). A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. J. Cell Sci. *114*, 2491–2499.

Aita, V.M., Liang, X.H., Murty, V. V, Pincus, D.L., Yu, W., Cayanis, E., Kalachikov, S., Gilliam, T.C., and Levine, B. (1999). Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. Genomics *59*, 59–65.

Aitken, C.E., and Lorsch, J.R. (2012). A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. Nat. Struct. Mol. Biol. *19*, 568–576.

Akin, C., Fumo, G., Yavuz, A.S., Lipsky, P.E., Neckers, L., and Metcalfe, D.D. (2004). A novel form of mastocytosis associated with a transmembrane c-kit mutation and response to imatinib. Blood *103*, 3222–3225.

Ameri, K., and Harris, A.L. (2008). Activating transcription factor 4. Int. J. Biochem. Cell Biol. *40*, 14–21.

Andrae, J., Gallini, R., and Betsholtz, C. (2008). Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. 1276–1312.

Andrews, B.N.C., and Levy, J.E. (1998). The Journal of The American Society of Hematology. Blood *92*, 1845–1851.

Antonioli, M., Di Rienzo, M., Piacentini, M., and Fimia, G.M. (2017). Emerging Mechanisms in Initiating and Terminating Autophagy. Trends Biochem. Sci. *42*, 28–41.

Araki, K., and Nagata, K. (2012). SUP: Protein folding and quality control in the ER. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *4*, a015438.

Arber, D.A., Orazi, A., Hasserjian, R., Borowitz, M.J., Beau, M.M. Le, Bloomfield, C.D., Cazzola, M., and Vardiman, J.W. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classi fi cation of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood *127*, 2391–2406.

Arstila, A.U., and Trump, B.F. (1973). Studies on Cellular Autophagocytosis. Am. J. Pathol. *73*, 641–670.

Auberger, P., and Puissant, A. (2017). Autophagy, a key mechanism of oncogenesis and resistance in leukemia. Blood *129*, 547–552.

Axe, E.L., Walker, S.A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H.L., Habermann, A., Griffiths, G., and Ktistakis, N.T. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. J. Cell Biol. *182*, 685–701.

B'Chir, W., Maurin, A.C., Carraro, V., Averous, J., Jousse, C., Muranishi, Y., Parry, L., Stepien, G., Fafournoux, P., and Bruhat, A. (2013). The eIF2α/ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. Nucleic Acids Res. *41*, 7683–7699.

Back, S.H., Scheuner, D., Han, J., Song, B., Ribick, M., Wang, J., Gildersleeve, R.D., Pennathur, S., and Randal, J. (2010). NIH Public Access. *10*, 13–26.

Bagrintseva, K., Schwab, R., Kohl, T.M., Schnittger, S., Eichenlaub, S., Ellwart, W., Hiddemann, W., Spiekermann, K., and Ellwart, J.W. (2004). Mutations in the tyrosine kinase domain of FLT3 define a new molecular mechanism of acquired drug resistance to PTK inhibitors in Mutations in the tyrosine kinase domain of FLT3 define a new molecular mechanism of acquired drug resistance to PTK inhibitor. Blood *103*, 2266–2275.

Balachandran, S., Roberts, P.C., Brown, L.E., Truong, H., Pattnaik, A.K., Archer, D.R., and Barber, G.N. (2000). Essential Role for the dsRNA-Dependent Protein Kinase PKR in Innate Immunity to Viral Infection. Immunity *13*, 129–141.

Bellodi C1, Lidonnici MR, Hamilton A, Helgason GV, Soliera AR, Ronchetti M, Galavotti S, Young KW, Selmi T, Yacobi R, Van Etten RA, Donato N, Hunter A, Dinsdale D, Tirrò E, Vigneri P, Nicotera P, Dyer MJ, Holyoake T, Salomoni P, Calabretta B. Targeting autophagy potentiates tyrosine kinase inhibitor-induced cell death in Philadelphia chromosome-positive cells, including primary CML stem cells. (2009). J Clin Invest *119* 1109-1123.

Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R., and Sultan, C. (1976). Proposals for the classification of the acute leukaemias. French- American-British (FAB) co-operative group. Br J Haematol *33*, 451–458.

Bertoli, S., Boutzen, H., David, L., Larrue, C., Vergez, F., Fernandez-vidal, A., Yuan, L., Hospital, M., Tamburini, J., Demur, C., et al. (2015). CDC25A governs proliferation and differentiation of FLT3-ITD acute myeloid leukemia. Oncotarget *6*, 38061–38078.

Birg, F., Courcoul, M., Rosnet, O., Bardin, F., Pébusque, M.J., Marchetto, S., Tabilio, a, Mannoni, P., and Birnbaum, D. (1992). Expression of the FMS/KIT-like gene FLT3 in human acute leukemias of the myeloid and lymphoid lineages. Blood *80*, 2584–2593.

Blais, J., Filipenko, V., Bi, M., and Harding, H. (2004). Activating Transcription Factor 4 Is Translationally Regulated by Hypoxic Stress. Mol. Cell. Biol. Cell. Biol. *24*, 7469–7482.

Blommaart, E.F.C., Krause, U., Schellens, J.P.M., Vreeling-Sindelarova, H., and Meijer, A.J. (1997). The Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibitors Wortmannin and LY294002 Inhibit Autophagy in Isolated Rat Hepatocytes. Eur. J. Biochem. *243*, 240–246.

Blumenthal, R.D., Lew, W., Juweid, M., Alisauskas, R., Ying, Z., and Goldenberg, D.M. (2000). Plasma FLT3-L levels predict bone marrow recovery from myelosuppressive therapy. Cancer *88*, 333–343.

Bo, A., Markova, B., Choudhary, C., Serve, H., and Bo, F. (2005). Tyrosine Phosphorylation Regulates Maturation of Receptor Tyrosine Kinases. *25*, 3690–3703.

Bodemann, B.O., Orvedahl, A., Cheng, T., Ram, R.R., Ou, Y.H., Formstecher, E., Maiti, M., Hazelett, C.C., Wauson, E.M., Balakireva, M., et al. (2011). RalB and the exocyst mediate the cellular starvation response by direct activation of autophagosome assembly. Cell *144*, 253–267.

Bos, J.L. (1989). Ras Oncogenes in Human Cancer: A Review. Cancer Res. *49*, 4682–4689.

Bosnjak, M., Ristic, B., Arsikin, K., Mircic, A., Suzin-Zivkovic, V., Perovic, V., Bogdanovic, A., Paunovic, V., Markovic, I., Bumbasirevic, V., et al. (2014). Inhibition of mTOR-dependent autophagy sensitizes leukemic cells to cytarabine-induced apoptotic death. PLoS One *9*, 1–12.

Boya, P., Gonzalez-Polo, Rosa-Ana Casares, N., Perfettini, J.-L., Dessen, P., Larochette, N., Métivier, D., Meley, D., Souquere, S., Yoshimori, T., Pierron, G., et al. (2005). Inhibition of Macroautophagy Triggers Apoptosis Inhibition of Macroautophagy Triggers Apoptosis †. Mol. Cell. Biol. *25*, 1025–1040.

Braden, C.R., and Neufeld, T.P. (2016). Atg1-independent induction of autophagy by the Drosophila Ulk3 homolog, ADUK. FEBS J. *283*, 3889–3897.

Brandts, C.H., Sargin, B., Rode, M., Biermann, C., Lindtner, B., Schw??ble, J., Buerger, H., M??ller-Tidow, C., Choudhary, C., McMahon, M., et al. (2005). Constitutive activation of Akt by Flt3 internal tandem duplications is necessary for increased survival, proliferation, and myeloid transformation. Cancer Res. *65*, 9643–9650.

Brina, D., Miluzio, A., Ricciardi, S., Clarke, K., Davidsen, P.K., Viero, G., Tebaldi, T., Offenhäuser, N., Rozman, J., Rathkolb, B., et al. (2015). eIF6 coordinates insulin sensitivity and lipid metabolism by coupling translation to transcription. Nat. Commun. *6*, 8261.

Brocato, J., Chervona, Y., and Costa, M. (2014). Molecular Responses to Hypoxia-Inducible Factor 1 and Beyond. Mol. Pharmacol. *85*, 651–657.

Brüning, A. (2011). Analysis of nelfinavir-induced endoplasmic reticulum stress. Methods Enzymol. *491*, 127–142.

Cai, H., Wolfenson, H., Depoil, D., Dustin, M.L., Sheetz, M.P., Wind, S.J., Mathematics, A., States, U., and Kingdom, U. (2017). HHS Public Access. *10*, 4173–4183.

Cam, H., and Houghton, P.J. (2011). Regulation of mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) by hypoxia: Causes and consequences. Target. Oncol. *6*, 95–102.

Caplan, A.I., and Correa, D. (2011). PDGF in bone formation and regeneration: New insights into a novel mechanism involving MSCs. J. Orthop. Res. *29*, 1795–1803.

Carow, C.E., Levenstein, M., Kaufmann, S.H., Chen, J., Amin, S., Rockwell, P., Witte, L., Borowitz, M.J., Civin, C.I., and Small, D. (1996). Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias. Blood *87*, 1089–1096.

Carracedo, A., and Pandolfi, P.P. (2008). The PTEN–PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. Oncogene *27*, 5527–5541.

Carrara, M., Prischi, F., Nowak, P.R., Kopp, M.C., and Ali, M.M. u (2015). Noncanonical binding of BiP ATPase domain to Ire1 and Perk is dissociated by unfolded protein CH1 to initiate ER stress signaling. Elife *4*, 1–16.

Castilho, B.A., Shanmugam, R., Silva, R.C., Ramesh, R., Himme, B.M., and Sattlegger, E. (2014). Keeping the eIF2 alpha kinase Gcn2 in check. Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res. *1843*, 1948–1968.

Ceci, M., Gaviraghi, C., Gorrini, C., Marchisio, P.C., Sala, L.A., Offenha, N., and Biffo, S. (2003). Release of eIF6 (p27 BBP) from the 60S subunit allows 80S ribosome assembly. Nature. *426*, 579–584.

Chan, C.P., Kok, K.H., Tang, H.M.V., Wong, C.M., and Jin, D.Y. (2013). Internal ribosome entry site-mediated translational regulation of ATF4 splice variant in mammalian unfolded protein response. Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res. *1833*, 2165–2175.

Chan, E.Y.W., Longatti, A., McKnight, N.C., and Tooze, S.A. (2009). Kinase-Inactivated ULK Proteins Inhibit Autophagy via Their Conserved C-Terminal Domains Using an Atg13-Independent Mechanism. Mol. Cell. Biol. *29*, 157–171.

Chan, P.M., Ilangumaran, S., Rose, J. La, and Chakrabartty, A. (2003). Autoinhibition of the Kit Receptor Tyrosine Kinase by the Cytosolic Juxtamembrane Region Autoinhibition of the Kit Receptor Tyrosine Kinase by the Cytosolic Juxtamembrane Region. Society *23*, 3067–3078.

Chérasse, Y., Maurin, A.C., Chaveroux, C., Jousse, C., Carraro, V., Parry, L., Deval, C., Chambon, C., Fafournoux, P., and Bruhat, A. (2007). The p300/CBP-associated factor (PCAF) is a cofactor of ATF4 for amino acid-regulated transcription of CHOP. Nucleic Acids Res. *35*, 5954–5965.

Chernokhvostov, V.V.L., Davidovich, I.A., and Roninson, I.B. (2000). Pleiotropic Resistance to DNA-interactive Drugs Is Associated with Increased Expression of Genes Involved in DNA Replication, Repair, and Stress Response 1. DNA Repair (Amst). 5027–5030.

Choudhary, C., Schwäble, J., Brandts, C., Tickenbrock, L., Sargin, B., Kindler, T., Fischer, T., Berdel, W.E., Müller-Tidow, C., and Serve, H. (2005). AML-associated Flt3 kinase domain mutations show signal transduction differences compared with Flt3 ITD mutations. Blood *106*, 265–273.

Choudhary, C., Olsen, J. V., Brandts, C., Cox, J., Reddy, P.N.G., Böhmer, F.D., Gerke, V., Schmidt-Arras, D.E., Berdel, W.E., Müller-Tidow, C., et al. (2009). Mislocalized Activation of Oncogenic RTKs Switches Downstream Signaling Outcomes. Mol. Cell *36*, 326–339.

Civallero, M., Cosenza, M., Grisendi, G., Marcheselli, L., Todoerti, K., and Sacchi, S. (2010). Effects of enzastaurin, alone or in combination, on signaling pathway controlling growth and survival of B-cell lymphoma cell lines. Leuk Lymphoma *51*, 671–679.

Clarke, P.G. (1990). Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. Anat. Embryol. (Berl). *181*, 195–213.

Codogno, P. (2004). Les gènes ATG. *20*, 8–10.

Colecchia, D., Rossi, M., Sasdelli, F., Sanzone, S., Strambi, A., and Chiariello, M. (2015). MAPK15 mediates BCR-ABL1-induced autophagy and regulates oncogene-dependent cell proliferation and tumor formation. Autophagy *11*, 1790–1802.

Collier, A.E., Wek, R.C., Spandau, D.F., and States, U. (2016). response. *135*, 2502–2511.

Cools, J., Mentens, N., Furet, P., Cools, J., Mentens, N., Furet, P., Fabbro, D., Clark, J.J., Griffin, J.D., Marynen, P., et al. (2004). Prediction of Resistance to Small Molecule FLT3 Inhibitors : Implications for Molecularly Targeted Therapy of Acute Leukemia Advances in Brief Prediction of Resistance to Small Molecule FLT3 Inhibitors : Implications for Molecularly Targeted Therapy of Ac. 6385–6389.

Corazzari, M., Rapino, F., Ciccosanti, F., Giglio, P., Antonioli, M., Conti, B., Fimia, G.M., Lovat, P.E., and Piacentini, M. (2015). Oncogenic BRAF induces chronic ER stress condition resulting in increased basal autophagy and apoptotic resistance of cutaneous melanoma. Cell Death Differ. *22*, 946–958.

Craven, P.A., and Derubertis, F.R. (1992). Alterations in Protein Kinase C in 1 , 2-Dimethylhydrazine. 2216–2221.

Cuervo, A.M. (2004). Autophagy: Many paths to the same end. Mol. Cell. Biochem. *263*, 55–72.

Dakic, A., Metcalf, D., Di Rago, L., Mifsud, S., Wu, L., and Nutt, S.L. (2005). PU.1 regulates the commitment of adult hematopoietic progenitors and restricts granulopoiesis. J. Exp. Med. *201*, 1487–1502.

Dall'Armi, C., Devereaux, K.A., and Di Paolo, G. (2013). The role of lipids in the control of autophagy. Curr. Biol. *23*, R33–R45.

Das, S., Maiti, T., Das, K., and Maitra, U. (1997). Specific Interaction of Eukaryotic Translation Initiation Factor 5 (eIF5) with the -Subunit of eIF2. J. Biol. Chem. *272*, 31712–31718.

Davidson, L.A., Aymond, C.M., Jiang, Y.H., Turner, N.D., Lupton, J.R., and Chapkin, R.S. (1998). Non-invasive detection of fecal protein kinase C ??(I)I and ?? messenger RNA: Putative biomarkers for colon cancer. Carcinogenesis *19*, 253–257.

DeKoter, R.P., and Singh, H. (2000). Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. Science *288*, 1439–1441.

Demachi-Okamura, A., Torikai, H., Akatsuka, Y., Miyoshi, H., Yoshimori, T., and Kuzushima, K. (2012). Autophagy Creates a CTL Epitope That Mimics Tumor-Associated Antigens. PLoS One *7*, 1–13.

Denoyelle, C., Abou-Rjaily, G., Bezrookove, V., Verhaegen, M., Johnson, T.M., Fullen, D.R., Pointer, J.N., Gruber, S.B., Su, L.D., Nikiforov, M.A., et al. (2006). Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway. Nat. Cell Biol. *8*, 1053–1063.

Dey, S., Baird, T.D., Zhou, D., Palam, L.R., Spandau, D.F., and Wek, R.C. (2010). Both transcriptional regulation and translational control of ATF4 are central to the integrated stress response. J. Biol. Chem. *285*, 33165–33174.

Dey, S., Savant, S., Teske, B.F., Hatzoglou, M., Calkhoven, C.F., and Wek, R.C. (2012). Transcriptional repression of ATF4 gene by CCAAT/enhancer-binding protein ?? (C/EBP??) differentially regulates integrated stress response. J. Biol. Chem. *287*, 21936–21949.

Deyoung, M.P., Horak, P., Sofer, A., Sgroi, D., and Ellisen, L.W. (2008). Hypoxia regulates TSC1 / 2 – mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14 – 3 – 3 shuttling. Genes (Basel). 239–251.

Differences, A., Bonekamp, D., Nagae, L.M., Degaonkar, M., Matson, M., Wael, M., Abdalla, A., Barker, P.B., Mori, S., and Horská, A. (2007). NIH Public Access. Radiology *34*, 733–742.

Ding, W.-X., Ni, H.-M., Gao, W., Yoshimori, T., Stolz, D.B., Ron, D., and Yin, X.-M. (2007). Linking of Autophagy to Ubiquitin-Proteasome System Is Important for the Regulation of Endoplasmic Reticulum Stress and Cell Viability. Am. J. Pathol. *171*, 513–524.

Ding, W.-X., Ni, H.-M., Gao, W., Chen, X., Kang, J.H., Stolz, D.B., Liu, J., and Yin, X.-M. (2009). Oncogenic transformation confers a selective susceptibility to the combined suppression of the proteasome and autophagy. Mol. Cancer Ther. *8*, 2036–2045.

Donnelly, N., Gorman, A.M., Gupta, S., and Samali, A. (2013). The eIF2?? kinases: Their structures and functions. Cell. Mol. Life Sci. *70*, 3493–3511.

Dosil, M., Wang, S., and Lemischka, I.R. (1993). Mitogenic signalling and substrate specificity of the Flk2/Flt3 receptor tyrosine kinase in fibroblasts and interleukin 3-dependent hematopoietic cells. Mol. Cell. Biol. *13*, 6572–6585.

Dunn, W.A. (1994). Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. Trends Cell Biol. *4*, 139–143.

Ebert, S.M., Dyle, M.C., Bullard, S.A., Dierdorff, J.M., Murry, D.J., Fox, D.K., Bongers, K.S., Lira, V.A., Meyerholz, D.K., Talley, J.J., et al. (2015). Identification and small molecule inhibition of an activating transcription factor 4 (ATF4)-dependent pathway to age-related skeletal muscle weakness and atrophy. J. Biol. Chem. *290*, 25497–25511.

Ebihara, Y., Tsuji, K., Lyman, S.D., Sui, X., Yoshida, M., Muraoka, K., Yamada, K., Tanaka, R., and Nakahata, T. (1997). Synergistic action of Flt3 and gp130 signalings in human hematopoiesis. Blood *90*, 4363–4368.

Elefteriou, F., Ahn, J.D., Takeda, S., Starbuck, M., Yang, X., Liu, X., Kondo, H., Richards, W.G., Bannon, T.W., Noda, M., et al. (2005). Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. Nature *434*, 514–520.

Ellgaard, L., and Helenius, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *4*, 181–191.

Eng, C.H., Wang, Z., Tkach, D., Toral-Barza, L., Ugwonali, S., Liu, S., Fitzgerald, S.L., George, E., Frias, E., Cochran, N., et al. (2016). Macroautophagy is dispensable for growth of KRAS mutant tumors and chloroquine efficacy. Proc. Natl. Acad. Sci. *113*, 182–187.

Ericsson, J.L.E. (1969). Studies on induced cellular autophagy: I. Electron microscopy of cells with in vivo labelled lysosomes. Exp. Cell Res. *55*, 95–106.

Eskelinen, E.L. (2005). Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. Autophagy *1*, 1–10.

Etienne, M. (2017). La formation de l ' autophagosome Un nouveau défi pour le biologiste. 217–220.

Fang, Y., Tan, J., and Zhang, Q. (2015). Signaling pathways and mechanisms of hypoxia-induced autophagy in the animal cells. Cell Biol. Int. *39*, 891–898.

Fass, E., Shvets, E., Degani, I., Hirschberg, K., and Elazar, Z. (2006). Microtubules support production of starvation-induced autophagosomes but not their targeting and fusion with lysosomes. J. Biol. Chem. *281*, 36303–36316.

Fawcett, T.W., Martindale, J.L., Guyton, K.Z., Hai, T., and Holbrook, N.J. (1999). the Stress Response. *141*, 135–141.

Finger, C., Escher, C., and Schneider, D. (2009). The Single Transmembrane Domains of Human Receptor Tyrosine Kinases Encode Self-Interactions. Sci. Signal. *2*, ra56-ra56.

Fröhling, S., Schlenk, R.F., Breitruck, J., Benner, A., Kreitmeier, S., Tobis, K., Döhner, H., and Döhner, K. (2002). Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: A study of the AML study group Ulm. Blood *100*, 4372–4380.

Fujita, E., Kouroku, Y., Isoai, A., Kumagai, H., Misutani, A., Matsuda, C., Hayashi, Y.K., and Momoi, T. (2007). Two endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) systems for the novel variant of the mutant dysferlin: Ubiquitin/proteasome ERAD(I) and autophagy/lysosome ERAD(II). Hum. Mol. Genet. *16*, 618–629.

Fujiwara, Y., Browne, C.P., Cunniff, K., Goff, S.C., and Orkin, S.H. (1996). Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *93*, 12355–12358.

Furuta, S., Hidaka, E., Ogata, A., Yokota, S., and Kamata, T. (2004). Ras is involved in the negative control of autophagy through the class I PI3-kinase. Oncogene *23*, 3898–3904.

Gabbianelli, M., Pelosi, E., Montesoro, E., Valtieri, M., Luchetti, L., Samoggia, P., Vitelli, L., Barberi, T., Testa, U., and Lyman, S. (1995). Multi-level effects of flt3 ligand on human hematopoiesis: expansion of putative stem cells and proliferation of granulomonocytic progenitors/monocytic precursors. Blood *86*, 1661–1670.

Ganley, I.G. (2013). Autophagosome maturation and lysosomal fusion. Essays Biochem. *55*, 65–78.

Gardner, B.M., and Walter, P. (2011). Unfolded Proteins Are Ire1-Activating Ligands That Directly Induce the Unfolded Protein Response. Science (80-. ). *333*, 1891–1894.

Gary Gilliland, D., and Griffin, J.D. (2002). The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. Blood *100*, 1532–1542.

Gaspar (1994). Translation initiation factor eIF2. Cloning and expression of the human cDNA encoding the gamma subunit. Mol. Biochem. Parasitol. *269*, 3415–3422.

Geiger, H., de Haan, G., and Florian, M.C. (2013). The ageing haematopoietic stem cell compartment. Nat. Rev. Immunol. *13*, 376–389.

Gendron, P., Boivin, I., Armstrong, R.N., and Sauvageau, G. (2016). Letters to Blood To the editor : *127*, 2498–2502.

Ginet, V., Puyal, J., Rummel, C., Aubry, D., Breton, C., Cloux, A.J., Majjigapu, S.R., Sordat, B., Vogel, P., Bruzzone, S., et al. (2014). A critical role of autophagy in antileukemia/lymphoma effects of APO866, an inhibitor of NAD biosynthesis. Autophagy *10*, 603–617.

Grafone, T., Palmisano, M., Nicci, C., and Storti, S. (2012). An overview on the role of FLT3-tyrosine kinase receptor in acute myeloid leukemia: Biology and treatment. Oncol. Rev. *6*, 64–74.

Greenblatt, S., Li, L., Slape, C., Nguyen, B., Novak, R., Duffield, A., Huso, D., Desiderio, S., Borowitz, M.J., Aplan, P., et al. (2012). Knock-in of a FLT3/ITD mutation cooperates with a NUP98-HOXD13 fusion to generate acute myeloid leukemia in a mouse model. Blood *119*, 2883–2894.

Gregory, M.A., D'Alessandro, A., Alvarez-Calderon, F., Kim, J., Nemkov, T., Adane, B., Rozhok, A.I., Kumar, A., Kumar, V., Pollyea, D.A., et al. (2016). ATM/G6PD-driven redox metabolism promotes FLT3 inhibitor resistance in acute myeloid leukemia. Proc. Natl. Acad. Sci. *113*, E6669–E6678.

Griffith, J., Black, J., Faerman, C., Swenson, L., Wynn, M., Lu, F., Lippke, J., and Saxena, K. (2004). The Structural Basis for Autoinhibition of FLT3 by the Juxtamembrane Domain. Mol. Cell *13*, 169–178.

Griner, E.M., and Kazanietz, M.G. (2007). Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. Nat. Rev. Cancer *7*, 281–294.

Grundler, R., Miething, C., Thiede, C., Peschel, C., and Duyster, J. (2008). phenotypes in a murine bone marrow transplantation model FLT3-ITD and tyrosine kinase domain mutants induce 2 distinct phenotypes in a murine bone marrow transplantation model. *105*, 4792–4799.

Guo, J.Y., Chen, H.Y., Mathew, R., Fan, J., Strohecker, A.M., Karsli-Uzunbas, G., Kamphorst, J.J., Chen, G., Lemons, J.M.S., Karantza, V., et al. (2011). Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. Genes Dev. *25*, 460–470.

Gürkan, E. (2006). Vaso-occlusive manifestations in a patient with sickle cell-hemoglobin E (HbSE) disease [1]. Am. J. Hematol. *81*, 149.

Hailey, D.W., Rambold, A.S., Satpute-Krishnan, P., Mitra, K., Sougrat, R., Kim, P.K., and Lippincott-Schwartz, J. (2010). Mitochondria Supply Membranes for Autophagosome Biogenesis during Starvation. Cell *141*, 656–667.

Han, A.P., Yu, C., Lu, L., Fujiwara, Y., Browne, C., Chin, G., Fleming, M., Leboulch, P., Orkin, S.H., and Chen, J.J. (2001). Heme-regulated eIF2α kinase (HRI) is required for translational regulation and survival of erythroid precursors in iron deficiency. EMBO J. *20*, 6909–6918.

Han, W., Sun, J., Feng, L., Wang, K.F., Li, D., Pan, Q., Chen, Y., Jin, W., Wang, X., Pan, H., et al. (2011). Autophagy inhibition enhances daunorubicin-induced apoptosis in K562 cells. PLoS One *6*, 1–7.

Hanauske, A.R., Oberschmidt, O., Hanauske-Abel, H., Lahn, M.M., and Eismann, U. (2007). Antitumor activity of enzastaurin (LY317615.HCl) against human cancer cell lines and freshly explanted tumors investigated in vitro soft-agar cloning experiments. Invest. New Drugs *25*, 205–210.

Hannum, C., Culpepper, J., Campbell, D., McClanahan, T., Zurawsk, S., Bazan, J.F., Kastelein, R., Hudak, S., Wagner, J., Mattson, J., et al. (1994). Ligand for FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase regulates grouth of haematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs. Nature *368*, 643–648.

Harding, H.P., Zhang, Y., and Ron, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. Nature *397*, 271–274.

Harding, H.P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P.D., Calfon, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., et al. (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. Mol. Cell *11*, 619–633.

Harris, M.N., Ozpolat, B., Abdi, F., Gu, S., Legler, A., Mawuenyega, K.G., Tirado-gomez, M., Lopez-berestein, G., and Chen, X. (2004). Comparative proteomic analysis of all-trans-retinoic acid treatment reveals systematic posttranscriptional control mechanisms in acute promyelocytic leukemia. Proteomics *104*, 1314–1323.

Hart, L.S., Cunningham, J.T., Datta, T., Dey, S., Tameire, F., Lehman, S.L., Qiu, B., Zhang, H., Cerniglia, G., Bi, M., et al. (2012). ER stress-mediated autophagy promotes Myc-dependent transformation and tumor growth. J. Clin. Invest. *122*, 4621–4634.

Hartwell, K., Miller, P., and Mukherjee, S. (2013). Niche-based screening identifies small-molecule inhibitors of leukemia stem cells. Nat. Chem. … *9*, 840–848.

Hayakawa, F., Towatari, M., Kiyoi, H., Tanimoto, M., Kitamura, T., Saito, H., and Naoe, T. (2000). Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. Oncogene *19*, 624–631.

Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T., and Yamamoto, A. (2009). A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. Nat. Cell Biol. *11*, 1433–1437.

He, C., and Klionsky, D.J. (2009). Regulation Mechanisms and Signalling Pathways of Autophagy. Annu. Rev. Genet. *43*, 67.

Healy, S.J.M., Gorman, A.M., Mousavi-Shafaei, P., Gupta, S., and Samali, A. (2009). Targeting the endoplasmic reticulum-stress response as an anticancer strategy. Eur. J. Pharmacol. *625*, 234–246.

Hettmann, T., Barton, K., and Leiden, J.M. (2000). Microphthalmia due to p53-mediated apoptosis of anterior lens epithelial cells in mice lacking the CREB-2 transcription factor. Dev. Biol. *222*, 110–123.

Hinnebusch, A.G. (1997). Translational Regulation of Yeast GCN4. J. Biol. Chem. *272*, 21661–21664.

Hinnebusch, A.G. (2005). TRANSLATIONAL REGULATION OF *GCN4* AND THE GENERAL AMINO ACID CONTROL OF YEAST. Annu. Rev. Microbiol. *59*, 407–450.

Hinnebusch, A.G., and Natarajan, K. (2002). Gcn4p , a Master Regulator of Gene Expression , Is Controlled at Multiple Levels by Diverse Signals of Starvation and Stress Gcn4p , a Master Regulator of Gene Expression , Is Controlled at Multiple Levels by Diverse Signals of Starvation and Stress. *1*, 22–32.

Horiuchi, K., Morioka, H., Takaishi, H., Akiyama, H., Blobel, C.P., and Toyama, Y. (2009). Ectodomain Shedding of FLT3 Ligand Is Mediated by TNF- Converting Enzyme. J. Immunol. *182*, 7408–7414.

How, I., Lonial, S., Boise, L.H., and Kaufman, J. (2015). How I Treat. *126*, 1536–1544.

How, J., Sykes, J., Gupta, V., Yee, K.W.L., Schimmer, A.D., Schuh, A.C., Minden, M.D., Kamel-Reid, S., and Brandwein, J.M. (2012). Influence of FLT3-internal tandem duplication allele burden and white blood cell count on the outcome in patients with intermediate-risk karyotype acute myeloid leukemia. Cancer *118*, 6110–6117.

Hu, Y.L., Yin, Y., Liu, H.Y., Feng, Y.Y., Bian, Z.H., Zhou, L.Y., Zhang, J.W., Fei, B.J., Wang, Y.G., and Huang, Z.H. (2016). Glucose deprivation induces chemoresistance in colorectal cancer cells by increasing ATF4 expression. World J. Gastroenterol. *22*, 6235–6245.

Hubbard, S.R. (2004). Juxtamembrane autoinhibition in receptor tyrosine kinases. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *5*, 464–471.

Hye-Ryong Shim, A., Liu, H., Focia, P.J., Chen, X., Lin, P.C., and He, X. (2010). Structures of a platelet-derived growth factor/propeptide complex and a platelet-derived growth factor/receptor complex. Proc. Natl. Acad. Sci. *107*, 11307–11312.

Igarashi, T., Izumi, H., Uchiumi, T., Nishio, K., Arao, T., Tanabe, M., Uramoto, H., Sugio, K., Yasumoto, K., Sasaguri, Y., et al. (2007). Clock and ATF4 transcription system regulates drug resistance in human cancer cell lines. Oncogene *26*, 4749–4760.

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

Iwamaru, A., Kondo, Y., Iwado, E., Aoki, H., Fujiwara, K., Yokoyama, T., Mills, G.B., and Kondo, S. (2007). Silencing mammalian target of rapamycin signaling by small interfering RNA enhances rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells. Oncogene *26*, 1840–1851.

Iwasaki, H., Somoza, C., Shigematsu, H., Duprez, E. a, Iwasaki-Arai, J., Mizuno, S.-I., Arinobu, Y., Geary, K., Zhang, P., Dayaram, T., et al. (2005). Distinctive and indispensable roles of PU. 1 in maintenance of hematopoietic stem cells and their differentiation. Blood *106*, 1590–1600.

Jacquel, A., Luciano, F., Puissant, A., Robert, G., and Auberger, P. L ' autophagie , acteur clé de la leucémogenèse et cible thérapeutique dans les hémopathies malignes.

Jäger, R., Bertrand, M.J.M., Gorman, A.M., Vandenabeele, P., and Samali, A. (2012). The unfolded protein response at the crossroads of cellular life and death during endoplasmic reticulum stress. Biol. Cell *104*, 259–270.

Jahreiss, L., Menzies, F.M., and Rubinsztein, D.C. (2008). The itinerary of autophagosomes: From peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. Traffic *9*, 574–587.

Joffre, C., and Djavaheri-mergny, M. (2017). L ' autophagie : le yin et le yang des cancers. *33*.

Kabeya, Y. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. EMBO J. *19*, 5720–5728.

Kabeya, Y. (2004). LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. J. Cell Sci. *117*, 2805–2812.

Kaminskyy, V.O., Piskunova, T., Zborovskaya, I.B., Tchevkina, E.M., and Zhivotovsky, B. (2012). Suppression of basal autophagy reduces lung cancer cell proliferation and enhances caspase-dependent and -independent apoptosis by stimulating ROS formation. Autophagy *8*, 1032–1044.

Kantarjian, H., O'Brisn, S., Cortes, J., Giles, F., Faderl, S., Jabbour, E., Garcia-Manero, G., Wierda, W., Pierce, S., Shan, J., et al. (2006). Results of intensive chemotherapy in 998 patients age 65 years or older with acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome: Predictive prognostic models for outcome. Cancer *106*, 1090–1098.

Karantza-Wadsworth, V., Patel, S., Kravchuk, O., Chen, G., Mathew, R., Jin, S., and White, E. (2007). Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. Genes Dev. *21*, 1621–1635.

Kihara, R., Nagata, Y., Kiyoi, H., Kato, T., Yamamoto, E., Suzuki, K., Chen, F., Asou, N., Ohtake, S., Miyawaki, S., et al. (2014). Comprehensive analysis of genetic alterations and their prognostic impacts in adult acute myeloid leukemia patients. Leukemia *28*, 1586–1595.

Kikushige, Y., Yoshimoto, G., Miyamoto, T., Iino, T., Mori, Y., Iwasaki, H., Niiro, H., Takenaka, K., Nagafuji, K., Harada, M., et al. (2008). Human Flt3 Is Expressed at the Hematopoietic Stem Cell and the Granulocyte/Macrophage Progenitor Stages to Maintain Cell Survival. J. Immunol. *180*, 7358–7367.

Kim, K.T., Baird, K., Ahn, J.Y., Meltzer, P., Lilly, M., Levis, M., and Small, D. (2005). Pim-1 is up-regulated by constitutively activated FLT3 and plays a role in FLT3-mediated cell survival. Blood *105*, 1759–1767.

Kimball, S.R. (1999). Eukaryotic initiation factor eIF2. Int. J. Biochem. Cell Biol. *31*, 25–29.

Kimball, S.R., Heinzinger, N.K., Horetsky, R.L., and Jefferson, L.S. (1998). Identification of interprotein interactions between the subunits of eukaryotic initiation factors eIF2 and eIF2B. J. Biol. Chem. *273*, 3039–3044.

Kimura, S., Noda, T., and Yoshimori, T. (2008). Dynein-dependent Movement of Autophagosomes Mediates Efficient Encounters with Lysosomes. Cell Struct. Funct. *33*, 109–122.

Kindler, T., Lipka, D.B., and Fischer, T. (2014). FLT3 as a therapeutic target in AML : still challenging after all these years Review article FLT3 as a therapeutic target in AML : still challenging after all these years. Blood *116*, 5089–5102.

Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., Ohsumi, M., Yoshimori, T., Noda, T., and Ohsumi, Y. (1999). Formation Process of Autophagosome Is Traced with Apg8 / Aut7p in Yeast. Jcb *147*, 435–446.

Kiyoi, H., Towatari, M., Yokota, S., Hamaguchi, M., Ohno, R., Saito, H., and Naoe, T. (1998). Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund, U.K *12*, 1333–1337.

Kiyoi, H., Ohno, R., Ueda, R., Saito, H., and Naoe, T. (2002). Mechanism of constitutive activation of FLT3 with internal tandem duplication in the juxtamembrane domain. Oncogene *21*, 2555–2563.

Klionsky, D.J. (2008). Autophagy revisited: A conversation with Christian de Duve. Autophagy *4*, 740–743.

Klionsky, D.J., Cregg, J.M., Dunn, W.A., Emr, S.D., Sakai, Y., Sandoval, I. V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M., et al. (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. Dev. Cell *5*, 539–545.

Klionsky, D.J., Abeliovich, H., Agostinis, P., Agrawal, D.K., Aliev, G., Askew, D.S., Baba, M., Baehrecke, E.H., Bahr, B.A., Ballabio, A., et al. (2009). NIH Public Access. *4*, 151–175.

Koch, S., Jacobi, A., Ryser, M., Ehninger, G., and Thiede, C. (2008). Abnormal localization and accumulation of FLT3-ITD, a mutant receptor tyrosine kinase involved in leukemogenesis. Cells Tissues Organs *188*, 225–235.

Köchl, R., Hu, X.W., Chan, E.Y.W., and Tooze, S.A. (2006). Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes. Traffic *7*, 129–145.

Kohl, T.M., Hellinger, C., Ahmed, F., Buske, C., Hiddemann, W., Bohlander, S.K., and Spiekermann, K. (2007). BH3 mimetic ABT-737 neutralizes resistance to FLT3 inhibitor treatment mediated by FLT3-independent expression of BCL2 in primary AML blasts. Leukemia *21*, 1763–1772.

Kornblau, S.M., Womble, M., Qiu, Y.H., Jackson, C.E., Chen, W., Konopleva, M., Estey, E.H., and Andreeff, M. (2006). Simultaneous activation of multiple signal transduction pathways confers poor prognosis in acute myelogenous leukemia. October *108*, 2358–2365.

Köthe, S., Müller, J.P., Böhmer, S.-A., Tschongov, T., Fricke, M., Koch, S., Thiede, C., Requardt, R.P., Rubio, I., and Böhmer, F.D. (2013). Features of Ras activation by a mislocalized oncogenic tyrosine kinase: FLT3 ITD signals through K-Ras at the plasma membrane of acute myeloid leukemia cells. J. Cell Sci. *126*, 4746–4755.

Kottaridis, P.D., Gale, R.E., and Linch, D.C. (2003). FLT3 mutations and leukaemia. Br. J. Haematol. *122*, 523–538.

Kottaridis, P.D., Gale, R.E., Frew, M.E., Harrison, G., Langabeer, S.E., Belton, A.A., Walker, H., Wheatley, K., Bowen, D.T., Burnett, A.K., et al. (2015). The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 .pdf. Blood *98*, 1752–1760.

Kouroku, Y., Fujita, E., Tanida, I., Ueno, T., Isoai, A., Kumagai, H., Ogawa, S., Kaufman, R.J., Kominami, E., and Momoi, T. (2007). ER stress (PERK/eIF2α phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. Cell Death Differ. *14*, 230–239.

Kozel, C., Thompson, B., Hustak, S., Moore, C., Nakashima, A., Singh, C.R., Reid, M., Cox, C., Papadopoulos, E., Luna, R.E., et al. (2016). Overexpression of eIF5 or its protein mimic 5MP perturbs eIF2 function and induces ATF4 translation through delayed re-initiation. Nucleic Acids Res. *44*, 8704–8713.

De La Cadena, S.G., Hernández-Fonseca, K., Camacho-Arroyo, I., and Massieu, L. (2014). Glucose deprivation induces reticulum stress by the PERK pathway and caspase-7- and calpain-mediated caspase-12 activation. Apoptosis *19*, 414–427.

Ladoire, S., Chaba, K., Martins, I., Sukkurwala, A.Q., Adjemian, S., Michaud, M., Poirier-Colame, V., Andreiuolo, F., Galluzzi, L., White, E., et al. (2012). Immunohistochemical detection of cytoplasmic LC3 puncta in human cancer specimens. Autophagy *8*, 1175–1184.

Lamb, C.A., Yoshimori, T., and Tooze, S.A. (2013a). The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *14*, 759–774.

Lamb, C.A., Yoshimori, T., and Tooze, S.A. (2013b). The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *14*, 759–774.

Larrue, C., Saland, E., Boutzen, H., Vergez, F., David, M., Joffre, C., Hospital, M.A., Tamburini, J., Delabesse, E., Manenti, S., et al. (2016). Proteasome inhibitors induce FLT3-ITD degradation through autophagy in AML cells. Blood *127*, 882–892.

Lassot, I., Segeral, E., Berlioz-Torrent, C., Durand, H., Groussin, L., Hai, T., Benarous, R., and Margottin-Goguet, F. (2001). ATF4 Degradation Relies on a Phosphorylation-Dependent Interaction with the SCF TrCP Ubiquitin Ligase. Mol. Cell. Biol. *21*, 2192–2202.

Lassot, I., Estrabaud, E., Emiliani, S., Benkirane, M., Benarous, R., and Margottin-Goguet, F. (2005). p300 modulates ATF4 stability and transcriptional activity independently of its acetyltransferase domain. J. Biol. Chem. *280*, 41537–41545.

Lavoie, H., Li, J.J., Thevakumaran, N., Therrien, M., and Sicheri, F. (2014). Dimerization-induced allostery in protein kinase regulation. Trends Biochem. Sci. *39*, 475–486.

Lee, J.H., Budanov, A. V, Park, E.J., Birse, R., Kim, T.E., Guy, A., Ocorr, K., Ellisman, M.H., Bodmer, R., and Bier, E. (2011). NIH Public Access. *327*, 1223–1228.

Lee, Y.Y., Cevallos, R.C., and Jan, E. (2009). An upstream open reading frame regulates translation of GADD34 during cellular stresses that induce eIF2phosphorylation. J. Biol. Chem. *284*, 6661–6673.

Leischner, H., Albers, C., Grundler, R., Razumovskaya, E., Spiekermann, K., Bohlander, S., Rönnstrand, L., Götze, K., Peschel, C., and Duyster, J. (2012). SRC is a signaling mediator in FLT3-ITD - But not in FLT3-TKD-positive AML. Blood *119*, 4026–4033.

Lemmon, M. a, and Schlessinger, J. (2011). NIH Public Access. Biochemistry *141*, 1117–1134.

Leung, A.Y.H., Man, C.-H., and Kwong, Y.-L. (2013). FLT3 inhibition: a moving and evolving target in acute myeloid leukaemia. Leukemia *27*, 260–268.

Levis, M., Tse, K., Smith, B.D., Garrett, E., and Small, D. (2009). A FLT3 tyrosine kinase inhibitor is selectively cytotoxic to acute myeloid leukemia blasts harboring FLT3 internal tandem duplication mutations Brief report A FLT3 tyrosine kinase inhibitor is selectively cytotoxic to acute myeloid leukemia blasts harbori. *98*, 885–887.

Levy, J. M. M., and Thorburn, A. (2011). Targeting Autophagy During Cancer Therapy to Improve Clinical Outcomes. Pharmacol Ther. *131*, 130-141.

Li, E., and Hristova, K. (2010). Receptor tyrosine kinase transmembrane domains: Function, dimer structure and dimerization energetics. Cell Adhes. Migr. *4*, 249–254.

Li, H., and Weinstein, I.B. (2006). Protein Kinase C Enhances Growth and Expression of Cyclin D1 in Human Breast Cancer Cells. Cancer Res. *66*, 11399–11408.

Li, J., Ni, M., Lee, B., Barron, E., Hinton, D.R., and Lee, A.S. (2008). The unfolded protein response regulator GRP78/BiP is required for endoplasmic reticulum integrity and stress-induced autophagy in mammalian cells. Cell Death Differ. *15*, 1460–1471.

Li, L., Chen, Y., and Gibson, S.B. (2013). Starvation-induced autophagy is regulated by mitochondrial reactive oxygen species leading to AMPK activation. Cell. Signal. *25*, 50–65.

Li, L., Bennett, S.A.L., and Wang, L. (2017). © 2012 Landes Bioscience . Do not distribute . *6918*, 165–176.

Li, S., Phong, M., Lahn, M., Brail, L., Sutton, S., Lin, B.K., Thornton, D., and Liao, B. (2007). Retrospective analysis of protein

kinase C-beta (PKC-beta) expression in lymphoid malignancies and its association with survival in diffuse large B-cell lymphomas. Biol. Direct *2*, 8.

Li, W.W., Li, J., and Bao, J.K. (2012). Microautophagy: Lesser-known self-eating. Cell. Mol. Life Sci. *69*, 1125–1136.

Liang, C., Lee, J., Inn, K.-S., Gack, M.U., Li, Q., Roberts, E.A., Vergne, I., Deretic, V., Feng, P., Akazawa, C., et al. (2008). Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. Nat. Cell Biol. *10*, 776–787.

Limitation, A.A. (2013). NIH Public Access. *20*, 436–443.

Lin, M.G., and Hurley, J.H. (2016). Structure and function of the ULK1 complex in autophagy. Curr. Opin. Cell Biol. *39*, 61–68.

Liu, F., Lee, J.Y., Wei, H., Tanabe, O., Engel, J.D., Morrison, S.J., and Guan, J.L. (2010). FIP200 is required for the cell-autonomous maintenance of fetal hematopoietic stem cells. Blood *116*, 4806–4814.

Liu, H., Chen, X., Focia, P.J., and He, X. (2007). Structural basis for stem cell factor–KIT signaling and activation of class III receptor tyrosine kinases. EMBO J. *26*, 891–901.

Lomakin, I.B., and Steitz, T.A. (2013). The initiation of mammalian protein synthesis and the mechanism of scanning. Nature *500*, 307–311.

Long, X., Lin, Y., Ortiz-Vega, S., Yonezawa, K., and Avruch, J. (2005). Rheb binds and regulates the mTOR kinase. Curr. Biol. *15*, 702–713.

Lu, P.D., Harding, H.P., and Ron, D. (2004). Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. J. Cell Biol. *167*, 27–33.

Lum, J.J., Bauer, D.E., Kong, M., Harris, M.H., Li, C., Lindsten, T., and Thompson, C.B. (2005). Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. Cell *120*, 237–248.

Luo, S., Mao, C., Lee, B., and Lee, A.S. (2006). GRP78/BiP Is Required for Cell Proliferation and Protecting the Inner Cell Mass from Apoptosis during Early Mouse Embryonic Development. Mol. Cell. Biol. *26*, 5688–5697.

Lyman, S.D., James, L., Bos, T. V., De Vries, P., Brasel, K., Gliniak, B., Hollingsworth, L.T., Picha, K.S., McKenna, H.J., Splett, R.R., et al. (1993). Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: A proliferative factor for primitive hematopoietic cells. Cell *75*, 1157–1167.

Ma, X., Lin, W.Y., Chen, Y., Stawicki, S., Mukhyala, K., Wu, Y., Martin, F., Bazan, J.F., and Starovasnik, M.A. (2012). Structural basis for the dual recognition of helical cytokines IL-34 and CSF-1 by CSF-1R. Structure *20*, 676–687.

Mackarehtschian, K., Hardin, J.D., Moore, K.A., Boast, S., Goff, S.P., and Lemischka, I.R. (1995). Targeted disruption of the flk2/flt3 gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. Immunity *3*, 147–161.

Majeski, A.E., and Fred Dice, J. (2004). Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. Int. J. Biochem. Cell Biol. *36*, 2435–2444.

Manning, B.D., Tee, A.R., Logsdon, M.N., Blenis, J., and Cantley, L.C. (2002). The PI3K-Akt Pathway Regulates Tuberin Identification of the Tuberous Sclerosis Complex-2 Tumor Suppressor Gene Product Tuberin as a Target of the Phosphoinositide 3- Kinase / Akt Pathway An Approach to Determine Substrates of Protein Kinases a PI3K-Depen. Cell *10*, 151–162.

Manuscript, A. (2008). NIH Public Access. Growth (Lakeland) *23*, 1–7.

Manuscript, A. (2013). Eaten alive : a history of macroautophagy. *12*, 814–822.

Manuscript, A., and Cells, H.S. (2013). NIH Public Access. *494*, 323–327.

Manuscript, A., and Nanostructures, S.P.C. (2008). NIH Public Access. Nano *6*, 2166–2171.

Marchetto, S., Fournier, E., Beslu, N., Aurran-Schleinitz, T., Dubreuil, P., Borg, J.P., Birnbaum, D., and Rosnet, O. (1999). SHC and SHIP phosphorylation and interaction in response to activation of the FLT3 receptor. Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund, U.K *13*, 1374–1382.

Markovic, A., MacKenzie, K.L., and Lock, R.B. (2005). FLT-3: A new focus in the understanding of acute leukemia. Int. J. Biochem. Cell Biol. *37*, 1168–1172.

Martina, J.A., Diab, H.I., Brady, O.A., and Puertollano, R. (2016). TFEB and TFE3 are novel components of the integrated stress response. EMBO J. *35*, 479–495.

Martinez-Lopez, N., Athonvarangkul, D., Mishall, P., Sahu, S., and Singh, R. (2013). Autophagy proteins regulate ERK phosphorylation. Nat. Commun. *4*, 1–14.

Marzella, L., Ahlberg, J., and Glaumann, H. (1981). Autophagy, heterophagy, microautophagy and crinophagy as the means for intracellular degradation. Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol. *36*, 219–234.

Masuoka, H.C., and Townes, T.M. (2002). Targeted disruption of the activating transcription factor 4 gene results in severe fetal anemia in mice. Blood *99*, 736–745.

Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V., and White, E. (2007a). Role of autophagy in cancer. Nat. Rev. Cancer *7*, 961–967.

Mathew, R., Kongara, S., Beaudoin, B., Karp, C.M., Bray, K., Degenhardt, K., Chen, G., Jin, S., and White, E. (2007b). chromosomal instability Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. Genes Dev. 1367–1381.

Mathew, R., Karp, C., Beaudoin, B., Vuong, N., Chen, H., Bray, K., Reddy, A., Bhanot, G., Dipaola, R.S., Karantza-wadsworth, V., et al. (2010). NIH Public Access. *137*, 1062–1075.

Matthews, W., Jordan, C.T., Wiegand, G.W., Pardoll, D., and Lemischka, I.R. (1991). A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations. Cell *65*, 1143–1152.

Maycotte, P., and Thorburn, A. (2011). Autophagy and cancer therapy. Cancer Biol. Ther. *11*, 127–137.

Maycotte, P., Aryal, S., Cummings, C.T., Thorburn, J., Morgan, M.J., and Thorburn, A. (2012). Chloroquine sensitizes breast cancer cells to chemotherapy independent of autophagy. Autophagy *8*, 200–212.

Mazure, N.M., and Pouysségur, J. (2010). Hypoxia-induced autophagy: Cell death or cell survival? Curr. Opin. Cell Biol. *22*, 177–180.

Mckenna, H.J., Stocking, K.L., Miller, R.E., Brasel, K., De Smedt, T., Maraskovsky, E., Maliszewski, C.R., Lynch, D.H., Smith, J., Pulendran, B., et al. (2000). Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. Bloo *95*, 3489–3497.

Meierhoff, G., Dehmejl, U., Gruss, H., Dirks, W., and Drexlerl, H.G. (1997). Expression of FL T3 and FL T3 Ligand in Human Leukemia-Lymphoma Cell Lines. 185–192.

Metcalf, D. (2009). ASH 50th anniversary review Hematopoietic cytokines. Blood *111*, 485–491.

Metcalf, D., and Isaacs, A.M. (2010). The role of ESCRT proteins in fusion events involving lysosomes, endosomes and autophagosomes: Figure 1. Biochem. Soc. Trans. *38*, 1469–1473.

Mihalache, C.C., Yousefi, S., Conus, S., Villiger, P.M., Schneider, E.M., and Simon, H.-U. (2011). Inflammation-Associated Autophagy-Related Programmed Necrotic Death of Human Neutrophils Characterized by Organelle Fusion Events. J. Immunol. *186*, 6532–6542.

Mijaljica, D., Prescott, M., and Devenish, R.J. (2011). Microautophagy in mammalian cells: Revisiting a 40-year-old conundrum. Autophagy *7*, 673–682.

Milani, M., Rzymski, T., Mellor, H.R., Pike, L., Bottini, A., Generali, D., and Harris, A.L. (2009). The role of ATF4 stabilization and autophagy in resistance of breast cancer cells treated with Bortezomib. Cancer Res. *69*, 4415–4423.

Miluzio, A., Beugnet, A., Volta, V., and Biffo, S. (2009). Eukaryotic initiation factor 6 mediates a continuum between 60S ribosome biogenesis and translation. EMBO Rep. *10*, 459–465.

Miluzio, A., Beugnet, A., Grosso, S., Brina, D., Mancino, M., Campaner, S., Amati, B., de Marco, A., and Biffo, S. (2011). Impairment of cytoplasmic eIF6 activity restricts lymphomagenesis and tumor progression without affecting normal growth. Cancer Cell *19*, 765–775.

Miluzio, A., Oliveto, S., Pesce, E., Mutti, L., Murer, B., Grosso, S., Ricciardi, S., Brina, D., Biffo, S., Miluzio, A., et al. (2015). Expression and activity of eIF6 trigger Malignant Pleural Mesothelioma growth in vivo. Oncotarget *6*, 37471–37485.

Miluzio, A., Ricciardi, S., Manfrini, N., Alfieri, R., Oliveto, S., Brina, D., and Biffo, S. (2016). Translational control by mTOR-independent routes: how eIF6 organizes metabolism. Biochem. Soc. Trans. *44*, 1667–1673.

Mitnick, C.D., Shin, S.S., Seung, K.J., Rich, M.L., Atwood, S.S., Furin, J.J., Fitzmaurice, G.M., Viru, F.A.A., Appleton, S.C., Bayona, J.N., et al. (2008). New England Journal. Library (Lond). 563–574.

Mizuki, M., Fenski, R., Halfter, H., Matsumura, I., Schmidt, R., Müller, C., Grüning, W., Kratz-Albers, K., Serve, S., Steur, C., et al. (2000). Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. Blood *96*, 3907–3914.

Mizushima, N. (2004). Methods for monitoring autophagy. Int. J. Biochem. Cell Biol. *36*, 2491–2502.

Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M.D., Klionsky, D.J., Ohsumi, M., and Ohsumi, Y. (1998). A protein conjugation system essential for autophagy. Nature *395*, 395–398.

Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabey, Y., Suzuki, K., Tokuhis, T., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2001). Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. J. Cell Biol. *152*, 657–667.

Mizushima, N., Yoshimorim, T., and Levine, B. (2010). NIH Public Access. Cell *140*, 313–326.

Mizushima, N., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (2011). The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *27*, 107–132.

Mori, S., Rönnstrand, L., Yokote, K., Engström, A., Courtneidge, S.A., Claesson-Welsh, L., and Heldin, C.H. (1993). Identification of two juxtamembrane autophosphorylation sites in the PDGF beta-receptor; involvement in the interaction with Src family tyrosine kinases. EMBO J. *12*, 2257–2264.

Mortensen, M., Soilleux, E.J., Djordjevic, G., Tripp, R., Lutteropp, M., Sadighi-Akha, E., Stranks, A.J., Glanville, J., Knight, S., W. Jacobsen, S.-E., et al. (2011). The autophagy protein Atg7 is essential for hematopoietic stem cell maintenance. J. Exp. Med. *208*, 455–467.

Mortimore, G.E., and Schworer, C.M. (1977). Induction of autophagy by amino-acid deprivation in perfused rat liver. Nature *270*, 174–176.

Mupo, A., Celani, L., Dovey, O., Cooper, J.L., Grove, C., Rad, R., Sportoletti, P., Falini, B., Bradley, A., and Vassiliou, G.S. (2013). A powerful molecular synergy between mutant Nucleophosmin and Flt3-ITD drives acute myeloid leukemia in mice. Leukemia *27*, 1917–1920.

Nahimana, A., Aubry, D., Breton, C.S., Majjigapu, S.R., Sordat, B., Vogel, P., and Duchosal, M. a (2014). The anti-lymphoma activity of APO866, an inhibitor of nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis, is potentialized when used in combination with anti-CD20 antibody. Leuk. Lymphoma *55*, 2141–2150.

Narasimhan, J., Staschke, K.A., and Wek, R.C. (2004). Dimerization is required for activation of eIF2 kinase Gcn2 in response to diverse environmental stress conditions. J. Biol. Chem. *279*, 22820–22832.

Nazarko, V.Y., Nazarko, T.Y., Farré, J.C., Stasyk, O. V., Warnecke, D., Ulaszewski, S., Cregg, J.M., Sibirny, A.A., and Subramani, S. (2011). Atg35, a micropexophagy-specific protein that regulates micropexophagic apparatus formation in Pichia pastoris. Autophagy *7*, 375–385.

Nelson, D.A., Tan, T.T., Rabson, A.B., Anderson, D., Degenhardt, K., and White, E. (2004). Hypoxia and defective apoptosis drive genomic instability and tumorigenesis. Genes Dev. *18*, 2095–2107.

Noda, N.N., and Fujioka, Y. (2015). Atg1 family kinases in autophagy initiation. Cell. Mol. Life Sci. *72*, 3083–3096.

Ogata, M., Hino, S. -i., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., Murakami, T., Taniguchi, M., Tanii, I., Yoshinaga, K., et al. (2006). Autophagy Is Activated for Cell Survival after Endoplasmic Reticulum Stress. Mol. Cell. Biol. *26*, 9220–9231.

Pakos-Zebrucka, K., Koryga, I., Mnich, K., Ljujic, M., Samali, A., and Gorman, A.M. (2016). The integrated stress response. EMBO Rep. *17*, 1374–1395.

Palam, L.R., Baird, T.D., and Wek, R.C. (2011). Phosphorylation of eIF2 facilitates ribosomal bypass of an inhibitory upstream ORF to enhance CHOP translation. J. Biol. Chem. *286*, 10939–10949.

Palmeira-Dos-Santos, C., Pereira, G.J.S., Barbosa, C.M. V, Jurkiewicz, A., Smaili, S.S., and Bincoletto, C. (2014). Comparative study of autophagy inhibition by 3MA and CQ on Cytarabine-induced death of leukaemia cells. J. Cancer Res. Clin. Oncol. *140*, 909–920.

Papandreou, I., Lim, A.L., Laderoute, K., and Denko, N.C. (2008). Hypoxia signals autophagy in tumor cells via AMPK activity, independent of HIF-1, BNIP3, and BNIP3L. Cell Death Differ. *15*, 1572–1581.

Parcells, B.W., Ikeda, A.K., Simms-Waldrip, T., Moore, T.B., and Sakamoto, K.M. (2006). FMS-Like Tyrosine Kinase 3 in

Normal Hematopoiesis and Acute Myeloid Leukemia. Stem Cells *24*, 1174–1184.

Pasquier, B. (2015). SAR405, a PIK3C3/VPS34 inhibitor that prevents autophagy and synergizes with MTOR inhibition in tumor cells. Autophagy *11*, 725–726.

Pattingre, S., Bauvy, C., and Codogno, P. (2003). Amino acids interfere with the ERK1/2-dependent control of macroautophagy by controlling the activation of Raf-1 in human colon cancer HT-29 cells. J. Biol. Chem. *278*, 16667–16674.

Pellegrini, P., Strambi, A., Zipoli, C., Hägg-Olofsson, M., Buoncervello, M., Linder, S., and De Milito, A. (2014). Acidic extracellular pH neutralizes the autophagy-inhibiting activity of chloroquine: Implications for cancer therapies. Autophagy *10*, 562–571.

Petiot, A., Ogier-denis, E., Edward, F.C., Meijer, A.J., Chem, J.B., Blommaart, E.F.C., and Codogno, P. (2000). Distinct Classes of Phosphatidylinositol 3'-Kinases Are Involved in Signaling Pathways That Control Macroautophagy in Distinct Classes of Phosphatidylinositol 3 □ -Kinases Are Involved in Signaling Pathways That Control Macroautophagy in HT-29 Cells. J. Biol. Chem. *275*, 992–998.

Pevny, L., Lin, C.S., D'Agati, V., Simon, M.C., Orkin, S.H., and Costantini, F. (1995). Development of hematopoietic cells lacking transcription factor GATA-1. Development *121*, 163–172.

Piloto, O., Nguyen, B., Huso, D., Kim, K.T., Li, Y., Witte, L., Hicklin, D.J., Brown, P., and Small, D. (2006). IMC-EB10, an anti-FLT3 monoclonal antibody, prolongs survival and reduces nonobese diabetic/severe combined immunodeficient engraftment of some acute lymphoblastic leukemia cell lines and primary leukemic samples. Cancer Res. *66*, 4843–4851.

Piloto, O., Wright, M., Brown, P., Kim, K.T., Levis, M., and Small, D. (2007). Prolonged exposure to FLT3 inhibitors leads to resistance via activation of parallel signaling pathways. Blood *109*, 1643–1652.

Pinzaglia, M., Montaldo, C., Polinari, D., Simone, M., La Teana, A., Tripodi, M., Mancone, C., Londei, P., and Benelli, D. (2015). EIF6 over-expression increases the motility and invasiveness of cancer cells by modulating the expression of a critical subset of membrane-bound proteins. BMC Cancer *15*, 131.

Piya, S., Kornblau, S.M., Ruvolo, V.R., Mu, H., Ruvolo, P.P., McQueen, T., Davis, R.E., Hail, N., Kantarjian, H., Andreeff, M., et al. (2016). Atg7 suppression enhances chemotherapeutic agent sensitivity and overcomes stroma-mediated chemoresistance in acute myeloid leukemia. Blood *128*, 1260–1269.

Puente, C., Hendrickson, R.C., and Jiang, X. (2016). Nutrient-regulated phosphorylation of ATG13 inhibits starvation-induced autophagy. J. Biol. Chem. *291*, 6026–6035.

Qiu, F.H., Ray, P., Brown, K., Barker, P.E., Jhanwar, S., Ruddle, F.H., and Besmer, P. (1988). Primary structure of c-kit: relationship with the CSF-1/PDGF receptor kinase family--oncogenic activation of v-kit involves deletion of extracellular domain and C terminus. EMBO J. *7*, 1003–1011.

R, A., AC, K., and E, W. (2016). Recent insights into the function of autophagy in cancer. Genes Dev. *30*, 1913–1930.

Radomska, H.S., Bassères, D.S., Zheng, R., Zhang, P., Dayaram, T., Yamamoto, Y., Sternberg, D.W., Lokker, N., Giese, N.A., Bohlander, S.K., et al. (2006). Block of C/EBPα function by phosphorylation in acute myeloid leukemia with FLT3 activating mutations. J. Exp. Med. *203*, 371–381.

Rafie-Kolpin, M., Han, A.P., and Chen, J.J. (2003). Autophosphorylation of threonine 485 in the activation loop is essential for attaining eIF2α kinase activity of HRI. Biochemistry *42*, 6536–6544.

Ramı, M., Tabor, K., Small, D., Matthews, W., and Civin, C.I. (1998). and Flt3. 1947–1958.

Ravikumar, B., Moreau, K., Jahreiss, L., Puri, C., and Rubinsztein, D.C. (2010). Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. Nat. Cell Biol. *12*, 747–757.

Razi, M., Chan, E.Y.W., and Tooze, S.A. (2009). Early endosomes and endosomal coatomer are required for Autophagy. J. Cell Biol. *185*, 305–321.

Reggiori, F. (2006). Membrane Origin for Autophagy. Curr. Top. Dev. Biol. *74*, 1–30.

Renneville, A., Boissel, N., Gachard, N., Naguib, D., Bastard, C., De Botton, S., Nibourel, O., Pautas, C., Reman, O., Thomas, X., et al. (2009). The favorable impact of CEBPA mutations in patients with acute myeloid leukemia is only observed in the absence of associated cytogenetic abnormalities and FLT3 internal duplication. Blood *113*, 5090–5093.

Richard J. Jackson, Christopher U.T. Hellen, T.V.P. (2015). the Mechanism of Eukaryotic Translation Initiation. *11*, 113–127.

Rivera, M.C., Maguire, B., and Lake, J.A. (2015). Purification of polysomes. Cold Spring Harb. Protoc. *2015*, 303–305.

Robinson, D.R., Wu, Y.-M., and Lin, S.-F. (2000). The protein tyrosine kinase family of the human genome. Oncogene *19*, 5548–5557.

Ronan, B., Flamand, O., Vescovi, L., Dureuil, C., Durand, L., Fassy, F., Bachelot, M.-F., Lamberton, A., Mathieu, M., Bertrand, T., et al. (2014). A highly potent and selective Vps34 inhibitor alters vesicle trafficking and autophagy. Nat. Chem. Biol. *10*, 1013–1019.

Rosnet, O., Schiff, C., Pébusque, M.J., Marchetto, S., Tonnelle, C., Toiron, Y., Birg, F., and Birnbaum, D. (1993). Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells. Blood *82*, 1110–1119.

Rosnet O, Mattei MG, Marchetto S, B.D. (1991). Isolation and Chromosomal Localization of a Novel FMS-like Tyrosine Kinase Gene. Distribution *385*, 380–385.

Rosso, P., Cortesina, G., Sanvito, F., Donadini, A., Di Benedetto, B., Biffo, S., and Marchisio, P.C. (2004). Overexpression of p27BBP in head and neck carcinomas and their lymph node metastases. Head Neck *26*, 408–417.

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

Rubinsztein, D.C., Codogno, P., and Levine, B. (2012a). Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. Nat. Rev. Drug Discov. *11*, 709–730.

Rubinsztein, D.C., Shpilka, T., and Elazar, Z. (2012b). Mechanisms of autophagosome biogenesis. Curr. Biol. *22*, R29–R34.

Russell, R.C., Tian, Y., Yuan, H., Park, H.W., Chang, Y., Kim, H., Neufeld, T.P., Dillin, A., and Guan, K. (2014a). NIH Public Access. *15*, 741–750.

Russell, R.C., Yuan, H.-X., and Guan, K.-L. (2014b). Autophagy regulation by nutrient signaling. Cell Res. *24*, 42–57.

Rusten, L.S., Lyman, S.D., Veiby, O.P., and Jacobsen, S.E. (1996). The FLT3 ligand is a direct and potent stimulator of the growth of primitive and committed human CD34+ bone marrow progenitor cells in vitro. Blood *87*, 1317–1325.

Rzymski, T., Milani, M., Singleton, D.C., and Harris, A.L. (2009). Role of ATF4 in regulation of autophagy and resistance to drugs and hypoxia. Cell Cycle *8*, 3838–3847.

Sachdeva, M.M., Claiborn, K.C., Khoo, C., Yang, J., Groff, D.N., Mirmira, R.G., and Stoffers, D.A. (2009). Pdx1 (MODY4) regulates pancreatic beta cell susceptibility to ER stress. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 19090–19095.

Saito, H., Inazawa, J., Saito, S., Kasumi, F., Koi, S., Sagae, S., Kudo, R., Saito, J., Noda, K., and Nakamura, Y. (1993). Detailed Deletion Mapping of Chromosome 17q in Ovarian and Breast Cancers: 2-cM Region on 17q21.3 Often and Commonly Deleted in Tumors. Cancer Res. *53*, 3382–3385.

Sakai, Y., Koller, A., Rangell, L.K., Keller, G. a, and Subramani, S. (1998). Peroxisome Degradation by Microautophagy in. Cell *141*, 625–636.

Saland, E., Boutzen, H., Castellano, R., Pouyet, L., Griessinger, E., Larrue, C., de Toni, F., Scotland, S., David, M., Danet-Desnoyers, G., et al. (2015). A robust and rapid xenograft model to assess efficacy of chemotherapeutic agents for human acute myeloid leukemia. Blood Cancer J. *5*, e297.

Salemi, S., Yousefi, S., Constantinescu, M.A., Fey, M.F., and Simon, H.-U. (2012). Autophagy is required for self-renewal and differentiation of adult human stem cells. Cell Res. *22*, 432–435.

Sanvito, F., Vivoli, F., Gambini, S., Santambrogio, G., Catena, M., Viale, E., Veglia, F., Donadini, A., Biffo, S., and Marchisio, P.C. (2000). Expression of a Highly Conserved Protein , p27 BBP , during the Progression of Human Colorectal Cancer. Cancer Res. *60*, 510–516.

Sato, T., Yang, X., Knapper, S., White, P., Smith, B.D., Galkin, S., Small, D., Burnett, A., Levis, M., Dc, W., et al. (2012). FLT3 ligand impedes the efficacy of FLT3 inhibitors in vitro and in vivo FLT3 ligand impedes the efficacy of FLT3 inhibitors in vitro and in vivo. *117*, 3286–3293.

Satoo, K., Noda, N.N., Kumeta, H., Fujioka, Y., Mizushima, N., Ohsumi, Y., and Inagaki, F. (2009). The structure of Atg4B–LC3 complex reveals the mechanism of LC3 processing and delipidation during autophagy. EMBO J. *28*, 1341–1350.

Scheijen, B., Ngo, H.T., Kang, H., and Griffin, J.D. (2004). FLT3 receptors with internal tandem duplications promote cell viability and proliferation by signaling through Foxo proteins. Oncogene *23*, 3338–3349.

Scheuner, D., Song, B., McEwen, E., Liu, C., Laybutt, R., Gillespie, P., Saunders, T., Bonner-Weir, S., and Kaufman, R.J.

(2001). Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. Mol. Cell *7*, 1165–1176.

Schlenk, R.F., Kayser, S., Bullinger, L., Kobbe, G., Casper, J., Ringhoffer, M., Held, G., Brossart, P., Michael, L., Katharina, G., et al. (2015). Differential impact of allelic ratio and insertion site in FLT3 -ITD – positive AML with respect to allogeneic transplantation. *124*, 3441–3450.

Schnittger, S., Schoch, C., and Dugas, M. (2002). Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FABsubtype, and prognosis in theAMLCGstudy and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. Blood *100*, 59–67.

Schröder, M., and Kaufman, R.J. (2005). the Mammalian Unfolded Protein Response. Annu. Rev. Biochem. *74*, 739–789.

Schubert, C., Schalk-Hihi, C., Struble, G.T., Ma, H.C., Petrounia, I.P., Brandt, B., Deckman, I.C., Patch, R.J., Player, M.R., Spurlino, J.C., et al. (2007). Crystal structure of the tyrosine kinase domain of colony-stimulating factor-1 receptor (cFMS) in complex with two inhibitors. J. Biol. Chem. *282*, 4094–4101.

Schweichel, J. ???U, and Merker, H. ???J (1973). The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. Teratology *7*, 253–266.

Scortegagna, M., Kim, H., Li, J.L., Yao, H., Brill, L.M., Han, J., Lau, E., Bowtell, D., Haddad, G., Kaufman, R.J., et al. (2014). Fine Tuning of the UPR by the Ubiquitin Ligases Siah1/2. PLoS Genet. *10*.

Scott, E.W., Simon, M.C., Anastasi, J., and Singh, H. (1994). Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopietic lineages. Science (80-. ). *265*, 1573–1577.

Semenza, G.L. (2013). HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. J. Clin. Invest. *123*, 3664–3671.

Shackelford, D.B., and Shaw, R.J. (2010). NIH Public Access. *9*, 563–575.

Shepherd, P.R., Withers, D.J., and Siddle, K. (1998). Phosphoinositide 3-kinase : the key switch mechanism in insulin signalling. Biochem. J *333*, 471–490.

Shibayama, H., Anzai, N., Ritchie, A., Zhang, S., Mantel, C., and Broxmeyer, H.E. (1998). Interleukin-3 and Flt3-Ligand Induce Adhesion of Baf3/Flt3 Precursor B-Lymphoid Cells to Fibronectin via Activation of VLA-4 and VLA-5. Cell. Immunol. *187*, 27–33.

Shih, L., Huang, C., Wu, J., Lin, T., Dunn, P., Wang, P., and Kuo, M. (2002). Internal tandem duplication of FLT3 in relapsed acute myeloid leukemia : a comparative analysis of bone marrow samples from 108 adult patients at diagnosis and relapse. October *100*, 2387–2392.

Shimazawa, M., and Hara, H. (2006). Inhibitor of double stranded RNA-dependent protein kinase protects against cell damage induced by ER stress. Neurosci. Lett. *409*, 192–195.

Singleton, D.C., and Harris, A.L. (2012). Targeting the ATF4 pathway in cancer therapy. Expert Opin. Ther. Targets *16*, 1189–1202.

Siu, F., Bain, P.J., Leblanc-Chaffin, R., Chen, H., and Kilberg, M.S. (2002). ATF4 is a mediator of the nutrient-sensing response pathway that activates the human asparagine synthetase gene. J. Biol. Chem. *277*, 24120–24127.

Smith, C.C., Wang, Q., Chin, C., Salerno, S., Damon, L.E., Levis, J., Perl, A.E., Travers, K.J., Wang, S., Hunt, J.P., et al. (2012). NIH Public Access. *485*, 260–263.

Spindler, K.L.G., Lindebjerg, J., Lahn, M., Kjaer-Frifeldt, S., and Jakobsen, A. (2009). Protein kinase C-beta II (PKC-??II) expression in patients with colorectal cancer. Int. J. Colorectal Dis. *24*, 641–645.

Stirewalt, D.L., and Radich, J.P. (2003). The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. Nat. Rev. Cancer *3*, 650–665.

Stirewalt, D.L., Kopecky, K.J., Meshinchi, S., Engel, J.H., Pogosova-agadjanyan, E.L., Linsley, J., Slovak, M.L., Willman, C.L., and Radich, J.P. (2006). Brief report Size of FLT3 internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia. Significance *107*, 3724–3726.

Stokoe, D., Stephens, L.R., Copeland, T., Gaffney, P.R.J., Reese, C.B., Painter, G.F., Holmes, A.B., Mccormick, F., and Hawkins, P.T. (1997). Protein Kinase B. *277*, 567–570.

Sumitomo, Y., Koya, J., Nakazaki, K., Kataoka, K., Tsuruta-Kishino, T., Morita, K., Sato, T., and Kurokawa, M. (2016). Cytoprotective autophagy maintains leukemia-initiating cells in murine myeloid leukemia. Blood *128*, 1614–1624.

Sun, X.J., Rothenberg, P., Kahn, C.R., Backer, J.M., Araki, E., Wilden, P. a, Cahill, D. a, Goldstein, B.J., and White, M.F. (1991). Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. Nature *352*, 73–77.

Suraweera, A., Münch, C., Hanssum, A., and Bertolotti, A. (2012). Failure of amino acid homeostasis causes cell death following proteasome inhibition. Mol. Cell *48*, 242–253.

Suzuki, H., Osawa, T., Fujioka, Y., and Noda, N.N. (2017). Structural biology of the core autophagy machinery. Curr. Opin. Struct. Biol. *43*, 10–17.

Takahashi, S. (2011). Downstream molecular pathways of FLT3 in the pathogenesis of acute myeloid leukemia: biology and therapeutic implications. J. Hematol. Oncol. *4*, 13.

Tanabe, M., Izumi, H., Ise, T., and Lines, C.C. (2003). Activating Transcription Factor 4 Increases the Cisplatin Resistance of Human Cancer Cell Lines. Cancer Res. 8592–8595.

Tanida, I., Tanida-Miyake, E., Ueno, T., and Kominami, E. (2001). The human homolog of Saccharomyces cerevisiae Apg7p is a protein-activating enzyme for multiple substrates including human Apg12p, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3. J. Biol. Chem. *276*, 1701–1706.

Taniuchi, S., Miyake, M., Tsugawa, K., Oyadomari, M., and Oyadomari, S. (2016). Integrated stress response of vertebrates is regulated by four eIF2α kinases. Sci. Rep. *6*, 32886.

Thiede, C., Steudel, C., Mohr, B., Schaich, M., Schaekel, U., Bornhaeuser, M., Wermke, M., Ritter, M., Neubauer, a, Ehninger, G., et al. (2001). Analysis of FLT3-activating mutations in 713 patients with acute myelogenous leukemia (AML): High prevalence in FAB-subtype M5 and identification of subgroups with poor prognosis. Blood *98*, 2994.

Thorburn, A., Thamm, D.H., and Gustafson, D.L. (2014). Autophagy and Cancer Therapy. Mol. Pharmacol. Mol Pharmacol *85*, 830–838.

Till, J.E., and Mcculloch, E.A. (1961). A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells'. Source Radiat. Res. Radiat. Res. *14*, 213–222.

Tooze, S.A., and Yoshimori, T. (2010a). The origin of the autophagosomal membrane. Nat. Cell Biol. *12*, 831–835.

Tooze, S.A., and Yoshimori, T. (2010b). The origin of the autophagosomal membrane. Nat. Cell Biol. *12*, 831–835.

Towers, C.G., and Thorburn, A. (2016). Therapeutic Targeting of Autophagy. EBioMedicine *14*, 15–23.

Traer, E., Martinez, J., Javidi-Sharifi, N., Agarwal, A., Dunlap, J., English, I., Kovacsovics, T., Tyner, J.W., Wong, M., and Druker, B.J. (2016). FGF2 from marrow microenvironment promotes resistance to FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia. Cancer Res. *76*, 6471–6482.

Tsuboi, S., and Ohsumi, Y. (1992). Autophagy in Yeast Demonstrated with Proteinase-deficient Mutants and Conditions for its Induction. *119*, 3–8.

Ullrich, A., and Schlessinger, J. (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. Cell *61*, 203–212.

Vardiman JW, Thiele J, A.D.E.A. (2008). The 2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. Blood *114*, 937–952.

Vattem, K.M., and Wek, R.C. (2004). Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. Proc. Natl. Acad. Sci. *101*, 11269–11274.

Verstraete, K., and Savvides, S.N. (2012). Extracellular assembly and activation principles of oncogenic class III receptor tyrosine kinases. Nat. Rev. Cancer *12*, 753–766.

Verstraete, K., Vandriessche, G., Januar, M., Elegheert, J., Shkumatov, A. V., Desfosses, A., Van Craenenbroeck, K., Svergun, D.I., Gutsche, I., Vergauwen, B., et al. (2011). Structural insights into the extracellular assembly of the hematopoietic Flt3 signaling complex. Blood *118*, 60–68.

Vilimanovich, U., Bosnjak, M., Bogdanovic, A., Markovic, I., Isakovic, A., Kravic-Stevovic, T., Mircic, A., Trajkovic, V., and Bumbasirevic, V. (2015). Statin-mediated inhibition of cholesterol synthesis induces cytoprotective autophagy in human leukemic cells. Eur. J. Pharmacol. *765*, 415–428.

Virkamäki, A., Ueki, K., Kahn, C.R., and Margolis, B.L. (1999). Protein – protein interaction in insulin signaling and the

molecular mechanisms of insulin resistance. J. Clin. Endocrinol. Metab. 931–943.

van der Vos, K.E., Gomez-Puerto, C., and Coffer, P.J. (2012). Regulation of autophagy by Forkhead box (FOX) O transcription factors. Adv. Biol. Regul. *52*, 122–136.

Wang, C., Huang, Z., Du, Y., Cheng, Y., Chen, S., and Guo, F. (2010). ATF4 regulates lipid metabolism and thermogenesis. Cell Res. *20*, 174–184.

Wang, C., Xia, T., Du, Y., Meng, Q., Li, H., Liu, B., Chen, S., and Guo, F. (2013). Effects of ATF4 on PGC1α expression in brown adipose tissue and metabolic responses to cold stress. Metabolism. *62*, 282–289.

Wei, Y., Zou, Z., Becker, N., Anderson, M., Jr, R.S., Xiao, G., Kinch, L., Koduru, P., Christudass, C.S., Robert, W., et al. (2014). NIH Public Access. *154*, 1269–1284.

Weisberg, E., Ray, A., Nelson, E., Adamia, S., Barrett, R., Sattler, M., Zhang, C., Daley, J.F., Frank, D., Fox, E., et al. (2011). Reversible resistance induced by FLT3 inhibition: A novel resistance mechanism in mutant FLT3-Expressing cells. PLoS One *6*.

Weissman, I.L. (2000). Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. Cell *100*, 157–168.

Weissman, I.L., Anderson, D.J., and Gage, F. (2001). STEM AND P ROGENITOR C ELLS : Origins , and Transdifferentiations. Cell Develeopmental Biol. 387–403.

Welch, J., Ley, T., Link, D., and Miller, C. (2012). The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. Cell *150*, 264–278.

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

Williams, B.R. (1999). PKR; a sentinel kinase for cellular stress. Oncogene *18*, 6112–6120.

Wodnar-Filipowicz, A. (2003). Flt3 ligand: role in control of hematopoietic and immune functions of the bone marrow. News Physiol. Sci. *18*, 247–251.

Wolff, N.C., Vega-Rubin-de-Celis, S., Xie, X.-J., Castrillon, D.H., Kabbani, W., and Brugarolas, J. (2011). Cell-Type-Dependent Regulation of mTORC1 by REDD1 and the Tumor Suppressors TSC1/TSC2 and LKB1 in Response to Hypoxia. Mol. Cell. Biol. *31*, 1870–1884.

Wong, P.M., Puente, C., Ganley, I.G., and Jiang, X. (2013). The ULK1 complex sensing nutrient signals for autophagy activation. Autophagy *9*, 124–137.

Woods, B.A., and Levine, R.L. (2015). The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. Immunol. Rev. *263*, 22–35.

Wu, J.J., Quijano, C., Chen, E., Liu, H., Cao, L., Fergusson, M.M., Rovira, I.I., Gutkind, S., Daniels, M.P., Komatsu, M., et al. (2009). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress mediate the physiological impairment induced by the disruption of autophagy. Aging (Albany. NY). *1*, 425–437.

Xie, N., Zhong, L., Liu, L., Fang, Y., Qi, X., Cao, J., Yang, B., He, Q., and Ying, M. (2014). Autophagy contributes to dasatinib-induced myeloid differentiation of human acute myeloid leukemia cells. Biochem. Pharmacol. *89*, 74–85.

Xu, D., Xu, Z., Han, L., Liu, C., Zhou, Z., Qiu, Z., Lin, X., Tang, G., Shen, H., Aebi, J., et al. (2016). Identification of New ATG4B Inhibitors Based on a Novel High-Throughput Screening Platform. J. Biomol. Screen. 1087057116639202-.

Xu, F., Taki, T., Yang, H.W., Hanada, R., Hongo, T., Ohnishi, H., Kobayashi, M., Bessho, F., Yanagisawa, M., and Hayashi, Y. (1999). Tandem duplication of the FLT3 gene is found in acute lymphoblastic leukaemia as well as acute myeloid leukaemia but not in myelodysplastic syndrome or juvenile chronic myelogenous leukaemia in children. Br J Haematol *105*, 155–162.

Yang, M., Zeng, P., Kang, R., Yu, Y., Yang, L., Tang, D., and Cao, L. (2014). S100A8 Contributes to drug resistance by promoting autophagy in leukemia cells. PLoS One *9*.

Yang, X., Matsuda, K., Bialek, P., Jacquot, S., Masuoka, H.C., Schinke, T., Li, L., Brancorsini, S., Sassone-Corsi, P., Townes, T.M., et al. (2004). ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology: Implication for Coffin-Lowry syndrome. Cell *117*, 387–398.

Yang, X., Liu, L., Sternberg, D., Tang, L., Galinsky, I., DeAngelo, D., and Stone, R. (2005). The FLT3 internal tandem duplication mutation prevents apoptosis in interleukin-3-deprived BaF3 cells due to protein kinase A and ribosomal S6 kinase 1-mediated BAD phosphorylation at serine 112. Cancer Res. *65*, 7338–7347.

Yarden, Y., Escobedo, J. a, Kuang, W.J., Yang-Feng, T.L., Daniel, T.O., Tremble, P.M., Chen, E.Y., Ando, M.E., Harkins, R.N., and Francke, U. (1986). Structure of the receptor for platelet-derived growth factor helps define a family of closely related growth factor receptors. Nature *323*, 226–232.

Ye, J., Kumanova, M., Hart, L.S., Sloane, K., Zhang, H., De Panis, D.N., Bobrovnikova-Marjon, E., Diehl, J.A., Ron, D., and Koumenis, C. (2010). The GCN2-ATF4 pathway is critical for tumour cell survival and proliferation in response to nutrient deprivation. EMBO J. *29*, 2082–2096.

Yoshida, H., Oku, M., Suzuki, M., and Mori, K. (2006). pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. J. Cell Biol. *172*, 565–575.

Yoshimoto, G., Miyamoto, T., Jabbarzadeh-Tabrizi, S., Iino, T., Rocnik, J.L., Kikushige, Y., Mori, Y., Shima, T., Iwasaki, H., Takenaka, K., et al. (2009). FLT3-ITD up-regulates MCL-1 to promote survival of stem cells in acute myeloid leukemia via FLT3-ITD specific STAT5 activation. Blood *114*, 5034–5043.

Young, A.R.J., Narita, M., Ferreira, M., Kirschner, K., Sadaie, M., Darot, J.F.J., Tavaré, S., Arakawa, S., Shimizu, S., Watt, F.M., et al. (2009). Autophagy mediates the mitotic senescence transition. Genes Dev. *23*, 798–803.

Yuzawa, S., Opatowsky, Y., Zhang, Z., Mandiyan, V., Lax, I., and Schlessinger, J. (2007). Structural Basis for Activation of the Receptor Tyrosine Kinase KIT by Stem Cell Factor. Cell *130*, 323–334.

Zhang, H., Bosch-Marce, M., Shimoda, L.A., Yee, S.T., Jin, H.B., Wesley, J.B., Gonzalez, F.J., and Semenza, G.L. (2008). Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. J. Biol. Chem. *283*, 10892–10903.

Zhang, S., Fukuda, S., Lee, Y., Hangoc, G., Cooper, S., Spolski, R., Leonard, W.J., and Broxmeyer, H.E. (2000). Essential role of signal transducer and activator of transcription (Stat)5a but not Stat5b for Flt3-dependent signaling. J. Exp. Med. *192*, 719–728.

Zheng, R., Bailey, E., Nguyen, B., Yang, X., Piloto, O., Levis, M., and Small, D. (2011). Further activation of FLT3 mutants by FLT3 ligand. Oncogene *30*, 4004–4014.

Zhou, J., Bi, C., Janakakumara, J. V., Liu, S.C., Chng, W.J., Tay, K.G., Poon, L.F., Xie, Z., Palaniyandi, S., Yu, H., et al. (2009). Enhanced activation of STAT pathways and overexpression of survivin confer resistance to FLT3 inhibitors and could be therapeutic targets in AML. Blood *113*, 4052–4062.

Zhu, X., Zhang, J., Sun, H., Jiang, C., Dong, Y., Shan, Q., Su, S., Xie, Y., Xu, N., Lou, X., et al. (2014). Ubiquitination of inositol-requiring enzyme 1 (IRE1) by the E3 ligase CHIP mediates the IRE1/TRAF2/JNK pathway. J. Biol. Chem. *289*, 30567–30577.

# Annexes

## 1. Liste de protéines diminuées avec le siFLT3 (>30%)

| Gènes | Protéines | Pourcentage de diminution |
|---|---|---|
| AAMDC | Mth938 domain-containing protein | -31 |
| AAMP | Angio-associated migratory cell protein | -46 |
| ABCC1 | Multidrug resistance-associated protein 1 | -36 |
| ABCC4 | Multidrug resistance-associated protein 4 | -45 |
| ABHD14A-ACY1 | Aminoacylase-1 | -62 |
| ABHD17B | Alpha/beta hydrolase domain-containing protein 17B | -60 |
| ABHD3 | Phospholipase ABHD3 | -100 |
| ABL1 | Tyrosine-protein kinase ABL1 | -100 |
| ABR | Active breakpoint cluster region-related protein | -35 |
| ACAA2 | 3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial | -36 |
| ACAD10 | Acyl-CoA dehydrogenase family member 10 | -39 |
| ACOT11 | Acyl-coenzyme A thioesterase 11 | -100 |
| ACOT9 | Acyl-coenzyme A thioesterase 9, mitochondrial | -46 |
| ACSL5 | Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 5 | -44 |
| ACTR3B | Actin-related protein 3B | -100 |
| ACY1 | Aminoacylase-1 | -62 |
| ADAM10 | Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 | -35 |
| ADARB1 | Double-stranded RNA-specific editase 1 | -100 |
| ADAT3 | Probable inactive tRNA-specific adenosine deaminase-like protein 3 | -37 |
| ADPRH | [Protein ADP-ribosylarginine] hydrolase | -48 |
| AEBP2 | Zinc finger protein AEBP2 | -100 |
| AES | Amino-terminal enhancer of split | -100 |
| AFF1 | AF4/FMR2 family member 1 | -100 |
| AFF4 | AF4/FMR2 family member 4 | -100 |
| AFTPH | Aftiphilin | -31 |
| AGO1 | Protein argonaute-1;Protein argonaute | -100 |
| AGTRAP | Type-1 angiotensin II receptor-associated protein | -85 |
| AHCYL1 | Putative adenosylhomocysteinase 2 | -33 |
| AIDA | Axin interactor, dorsalization-associated protein | -41 |
| AKAP1 | A-kinase anchor protein 1, mitochondrial | -50 |
| AKAP10 | A-kinase anchor protein 10, mitochondrial | -100 |
| AKAP11 | A-kinase anchor protein 11 | -46 |
| AKAP2 | A-kinase anchor protein 2 | -45 |
| AKR1C1 | Aldo-keto reductase family 1 member C1 | -100 |
| AKT3 | RAC-gamma serine/threonine-protein kinase | -100 |
| ALAS1 | 5-aminolevulinate synthase, nonspecific, mitochondrial | -74 |
| ALDH1L1 | Cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase | -50 |
| ALG10 | Putative Dol-P-Glc:Glc(2)Man(9)GlcNAc(2)-PP-Dol alpha-1,2-glucosyltransferase;Dol-P-Glc:Glc(2)Man(9)GlcNAc(2)-PP-Dol alpha-1,2-glucosyltransferase | -100 |
| ALG10B | Putative Dol-P-Glc:Glc(2)Man(9)GlcNAc(2)-PP-Dol alpha-1,2-glucosyltransferase;Dol-P-Glc:Glc(2)Man(9)GlcNAc(2)-PP-Dol alpha-1,2-glucosyltransferase | -100 |
| ALG6 | Dolichyl pyrophosphate Man9GlcNAc2 alpha-1,3-glucosyltransferase | -57 |

| | | |
|---|---|---|
| ALKBH2 | Alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase alkB homolog 2 | -100 |
| ALKBH4 | Alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase alkB homolog 4 | -100 |
| ALKBH8 | Alkylated DNA repair protein alkB homolog 8 | -100 |
| ALYREF | THO complex subunit 4 | -31 |
| AMOTL1 | Angiomotin-like protein 1 | -100 |
| AMPD3 | AMP deaminase 3 | -77 |
| ANAPC2 | Anaphase-promoting complex subunit 2 | -33 |
| ANKLE1 | Ankyrin repeat and LEM domain-containing protein 1 | -100 |
| ANKLE2 | Ankyrin repeat and LEM domain-containing protein 2 | -48 |
| ANKMY2 | Ankyrin repeat and MYND domain-containing protein 2 | -53 |
| ANKRD10 | Ankyrin repeat domain-containing protein 10 | -100 |
| ANKRD17 | Ankyrin repeat domain-containing protein 17 | -40 |
| ANKRD49 | Ankyrin repeat domain-containing protein 49 | -100 |
| ANKS1A | Ankyrin repeat and SAM domain-containing protein 1A | -40 |
| ANKZF1 | Ankyrin repeat and zinc finger domain-containing protein 1 | -40 |
| ANLN | Actin-binding protein anillin | -100 |
| ANXA3 | Annexin;Annexin A3 | -100 |
| AP1G2 | AP-1 complex subunit gamma-like 2 | -100 |
| AP1S2 | AP-1 complex subunit sigma-2 | -99 |
| AP3B2 | AP-3 complex subunit beta-2 | -100 |
| AP4S1 | AP-4 complex subunit sigma-1 | -100 |
| AP5B1 | AP-5 complex subunit beta-1 | -96 |
| AP5S1 | AP-5 complex subunit sigma-1 | -100 |
| APBA2 | Amyloid beta A4 precursor protein-binding family A member 2 | -100 |
| APBB1IP | Amyloid beta A4 precursor protein-binding family B member 1-interacting protein | -32 |
| APLP2 | Amyloid-like protein 2 | -100 |
| APOB | Apolipoprotein B-100;Apolipoprotein B-48 | -100 |
| APOBEC3A | DNA dC->dU-editing enzyme APOBEC-3B;DNA dC->dU-editing enzyme APOBEC-3A | -100 |
| APOBEC3B | DNA dC->dU-editing enzyme APOBEC-3B | -52 |
| APOBEC3G | DNA dC->dU-editing enzyme APOBEC-3G | -58 |
| APOL2 | Apolipoprotein L2 | -97 |
| APP | Amyloid beta A4 protein;N-APP;Soluble APP-alpha;Soluble APP-beta;C99;Beta-amyloid protein 42;Beta-amyloid protein 40;C83;P3(42);P3(40);C80;Gamma-secretase C-terminal fragment 59;Gamma-secretase C-terminal fragment 57;Gamma-secretase C-terminal fragment 50;C31 | -100 |
| APTX | Aprataxin | -45 |
| ARF3 | ADP-ribosylation factor 3 | -31 |
| ARFIP2 | Arfaptin-2 | -37 |
| ARHGAP10 | Rho GTPase-activating protein 10 | -100 |
| ARHGAP19 | Rho GTPase-activating protein 19 | -100 |
| ARHGEF11 | Rho guanine nucleotide exchange factor 11 | -100 |
| ARHGEF12 | Rho guanine nucleotide exchange factor 12 | -100 |
| ARIH2 | E3 ubiquitin-protein ligase ARIH2 | -31 |
| ARKL1 | Uncharacterized protein C18orf25 | -100 |
| ARL13B | ADP-ribosylation factor-like protein 13B | -100 |
| ARL15 | ADP-ribosylation factor-like protein 15 | -100 |
| ARMC10 | Armadillo repeat-containing protein 10 | -62 |
| ARPP19 | cAMP-regulated phosphoprotein 19 | -63 |

| | | |
|---|---|---|
| ASPH | Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase | -100 |
| ASPM | Abnormal spindle-like microcephaly-associated protein | -100 |
| ASXH1 | Putative Polycomb group protein ASXL1 | -100 |
| ASXL1 | Putative Polycomb group protein ASXL1 | -100 |
| ATAD2 | ATPase family AAA domain-containing protein 2 | -48 |
| ATAD5 | ATPase family AAA domain-containing protein 5 | -100 |
| ATE1 | Arginyl-tRNA--protein transferase 1 | -38 |
| ATF6B | Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-6 beta;Processed cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-6 beta | -100 |
| ATF7 | Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-7 | -100 |
| ATG4C | Cysteine protease ATG4C | -100 |
| ATHL1 | Acid trehalase-like protein 1 | -100 |
| ATP11A | Phospholipid-transporting ATPase;Probable phospholipid-transporting ATPase IH | -100 |
| ATP11C | Phospholipid-transporting ATPase;Phospholipid-transporting ATPase IG | -100 |
| ATP12A | Potassium-transporting ATPase alpha chain 2 | -96 |
| ATP2C1 | Calcium-transporting ATPase;Calcium-transporting ATPase type 2C member 1 | -31 |
| ATP5E | ATP synthase subunit epsilon-like protein, mitochondrial;ATP synthase subunit epsilon, mitochondrial | -100 |
| ATP5EP2 | ATP synthase subunit epsilon-like protein, mitochondrial;ATP synthase subunit epsilon, mitochondrial | -100 |
| ATP5J | ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial | -39 |
| ATP6V1F | V-type proton ATPase subunit F | -51 |
| ATP8B4 | Probable phospholipid-transporting ATPase IM;Phospholipid-transporting ATPase | -100 |
| ATPIF1 | ATPase inhibitor, mitochondrial | -76 |
| ATRIP | ATR-interacting protein | -100 |
| ATRN | Attractin | -35 |
| AURKA | Aurora kinase A | -55 |
| AVEN | Cell death regulator Aven | -100 |
| AVL9 | Late secretory pathway protein AVL9 homolog | -58 |
| AZI2 | 5-azacytidine-induced protein 2 | -100 |
| B4GALT1 | Beta-1,4-galactosyltransferase 1;Lactose synthase A protein;N-acetyllactosamine synthase;Beta-N-acetylglucosaminylglycopeptide beta-1,4-galactosyltransferase;Beta-N-acetylglucosaminyl-glycolipid beta-1,4-galactosyltransferase;Processed beta-1,4-galactosyltransferase 1 | -100 |
| BACH1 | Transcription regulator protein BACH1 | -100 |
| BAK1 | Bcl-2 homologous antagonist/killer | -51 |
| BAP1 | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase BAP1;Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase | -36 |
| BARX1 | Homeobox protein BarH-like 1 | -100 |
| BATF3 | Basic leucine zipper transcriptional factor ATF-like 3 | -100 |
| BAZ1A | Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 1A | -44 |
| BAZ2A | Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 2A | -31 |
| BAZ2B | Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 2B | -94 |
| BCAP29 | B-cell receptor-associated protein 29 | -41 |
| BCAR2 | Transcriptional-regulating factor 1 | -100 |
| BCL10 | B-cell lymphoma/leukemia 10 | -89 |
| BCL11A | B-cell lymphoma/leukemia 11A | -55 |
| BCR | Breakpoint cluster region protein | -77 |
| BDH2 | 3-hydroxybutyrate dehydrogenase type 2 | -100 |
| BECN1 | Beclin-1 | -53 |
| BET1 | BET1 homolog | -60 |
| BET1L | BET1-like protein | -100 |

| | | |
|---|---|---|
| BICD2 | Protein bicaudal D homolog 2 | -35 |
| BIVM-ERCC5 | DNA repair protein complementing XP-G cells | -42 |
| BLOC1S4 | Biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 subunit 4 | -100 |
| BLOC1S5 | Biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 subunit 5 | -68 |
| BLOC1S5-TXNDC5 | Biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 subunit 5 | -68 |
| BLVRA | Biliverdin reductase A | -100 |
| BOLA2 | BolA-like protein 2 | -30 |
| BRAF | Serine/threonine-protein kinase B-raf | -80 |
| BRAP | BRCA1-associated protein | -47 |
| BRD3 | Bromodomain-containing protein 3 | -45 |
| BRD9 | Bromodomain-containing protein 9 | -44 |
| BRIX1 | Ribosome biogenesis protein BRX1 homolog | -38 |
| BRK1 | Protein BRICK1 | -68 |
| BRP44L | Mitochondrial pyruvate carrier 1 | -100 |
| BSG | Basigin | -31 |
| BST2 | Bone marrow stromal antigen 2 | -80 |
| BTRC | F-box/WD repeat-containing protein 1A | -100 |
| BUB1 | Mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase BUB1 | -100 |
| BUB1B | Mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase BUB1 beta | -58 |
| C10orf32 | UPF0693 protein C10orf32 | -44 |
| C10orf32-ASMT | UPF0693 protein C10orf32 | -44 |
| C10orf47 | Proline and serine-rich protein 2 | -35 |
| C11orf54 | Ester hydrolase C11orf54 | -41 |
| C15orf39 | Uncharacterized protein C15orf39 | -75 |
| C16orf58 | RUS1 family protein C16orf58 | -30 |
| C19orf25 | UPF0449 protein C19orf25 | -60 |
| C1D | Nuclear nucleic acid-binding protein C1D | -100 |
| C1orf112 | Uncharacterized protein C1orf112 | -100 |
| C1orf131 | Uncharacterized protein C1orf131 | -45 |
| C1orf186 | Uncharacterized protein C1orf186 | -100 |
| C1orf50 | Uncharacterized protein C1orf50 | -59 |
| C1orf52 | UPF0690 protein C1orf52 | -57 |
| C1QBP | Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial | -62 |
| C1QTNF3 | Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 3 | -100 |
| C1QTNF3-AMACR | Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 3 | -100 |
| C2orf44 | WD repeat and coiled-coil-containing protein C2orf44 | -100 |
| C3 | Complement C3;Complement C3 beta chain;C3-beta-c;Complement C3 alpha chain;C3a anaphylatoxin;Acylation stimulating protein;Complement C3b alpha chain;Complement C3c alpha chain fragment 1;Complement C3dg fragment;Complement C3g fragment;Complement C3d fragment;Complement C3f fragment;Complement C3c alpha chain fragment 2 | -70 |
| C3orf17 | Uncharacterized protein C3orf17 | -34 |
| C4A | Complement C4-A;Complement C4 beta chain;Complement C4-A alpha chain;C4a anaphylatoxin;C4b-A;C4d-A;Complement C4 gamma chain;Complement C4-B;Complement C4 beta chain;Complement C4-B alpha chain;C4a anaphylatoxin;C4b-B;C4d-B;Complement C4 gamma chain | -100 |
| C4B | Complement C4-A;Complement C4 beta chain;Complement C4-A alpha chain;C4a anaphylatoxin;C4b-A;C4d-A;Complement C4 gamma chain;Complement C4-B;Complement C4 beta chain;Complement C4-B alpha chain;C4a anaphylatoxin;C4b-B;C4d-B;Complement C4 gamma chain | -100 |
| C5orf51 | UPF0600 protein C5orf51 | -100 |
| C6orf120 | UPF0669 protein C6orf120 | -100 |

| | | |
|---|---|---|
| C6orf203 | Uncharacterized protein C6orf203 | -43 |
| C8orf59 | Uncharacterized protein C8orf59 | -94 |
| C9orf126 | Protein SCAI | -100 |
| CA8 | Carbonic anhydrase-related protein | -76 |
| CABIN1 | Calcineurin-binding protein cabin-1 | -100 |
| CACTIN | Cactin | -31 |
| CACUL1 | CDK2-associated and cullin domain-containing protein 1 | -41 |
| CAMLG | Calcium signal-modulating cyclophilin ligand | -100 |
| CARD8 | Caspase recruitment domain-containing protein 8 | -100 |
| CARD9 | Caspase recruitment domain-containing protein 9 | -34 |
| CARS2 | Probable cysteine--tRNA ligase, mitochondrial | -42 |
| CASP2 | Caspase-2;Caspase-2 subunit p18;Caspase-2 subunit p13;Caspase-2 subunit p12 | -35 |
| CASP6 | Caspase-6;Caspase-6 subunit p18;Caspase-6 subunit p11 | -65 |
| CASP8AP2 | CASP8-associated protein 2 | -100 |
| CAST | Calpastatin | -40 |
| CBFA2T3 | Protein CBFA2T3 | -100 |
| CBFB | Core-binding factor subunit beta;Core-binding factor subunit beta | -32 |
| CBR3 | Carbonyl reductase [NADPH] 3 | -100 |
| CBWD1 | COBW domain-containing protein 1;COBW domain-containing protein 3;COBW domain-containing protein 5;Putative COBW domain-containing protein 7;COBW domain-containing protein 6 | -52 |
| CBWD2 | COBW domain-containing protein 1;COBW domain-containing protein 2;COBW domain-containing protein 3;COBW domain-containing protein 5;Putative COBW domain-containing protein 7;COBW domain-containing protein 6 | -100 |
| CBWD3 | COBW domain-containing protein 1;COBW domain-containing protein 3;COBW domain-containing protein 5;Putative COBW domain-containing protein 7;COBW domain-containing protein 6 | -52 |
| CBWD5 | COBW domain-containing protein 1;COBW domain-containing protein 3;COBW domain-containing protein 5;Putative COBW domain-containing protein 7;COBW domain-containing protein 6 | -52 |
| CBWD6 | COBW domain-containing protein 1;COBW domain-containing protein 3;COBW domain-containing protein 5;Putative COBW domain-containing protein 7;COBW domain-containing protein 6 | -52 |
| CBWD7 | COBW domain-containing protein 1;COBW domain-containing protein 3;COBW domain-containing protein 5;Putative COBW domain-containing protein 7;COBW domain-containing protein 6 | -52 |
| CBX2 | Chromobox protein homolog 2 | -100 |
| CCDC101 | SAGA-associated factor 29 homolog | -100 |
| CCDC115 | Coiled-coil domain-containing protein 115 | -53 |
| CCDC127 | Coiled-coil domain-containing protein 127 | -100 |
| CCDC132 | Coiled-coil domain-containing protein 132 | -43 |
| CCDC174 | Coiled-coil domain-containing protein 174 | -100 |
| CCDC25 | Coiled-coil domain-containing protein 25 | -86 |
| CCDC50 | Coiled-coil domain-containing protein 50 | -34 |
| CCDC59 | Thyroid transcription factor 1-associated protein 26 | -100 |
| CCDC86 | Coiled-coil domain-containing protein 86 | -41 |
| CCDC91 | Coiled-coil domain-containing protein 91 | -100 |
| CCNA2 | Cyclin-A2 | -65 |
| CCNB2 | G2/mitotic-specific cyclin-B2 | -64 |
| CCNB2V | G2/mitotic-specific cyclin-B2 | -64 |
| CCNC | Cyclin-C | -100 |
| CCND3 | G1/S-specific cyclin-D3 | -97 |
| CCNDBP1 | Cyclin-D1-binding protein 1 | -100 |

| | | |
|---|---|---|
| CCP110 | Centriolar coiled-coil protein of 110 kDa | -98 |
| CCS | Copper chaperone for superoxide dismutase;Superoxide dismutase [Cu-Zn] | -74 |
| CCSMST1 | Protein CCSMST1 | -100 |
| CD109 | CD109 antigen | -70 |
| CD151 | CD151 antigen | -100 |
| CD300A | CMRF35-like molecule 8 | -100 |
| CD38 | ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase 1 | -60 |
| CD4 | T-cell surface glycoprotein CD4 | -31 |
| CD58 | Lymphocyte function-associated antigen 3 | -100 |
| CD63 | CD63 antigen | -100 |
| CD81 | Tetraspanin;CD81 antigen | -100 |
| CD93 | Complement component C1q receptor | -57 |
| CD97 | CD97 antigen;CD97 antigen subunit alpha;CD97 antigen subunit beta | -42 |
| CDC20 | Cell division cycle protein 20 homolog | -42 |
| CDC37L1 | Hsp90 co-chaperone Cdc37-like 1 | -100 |
| CDC42EP3 | Cdc42 effector protein 3 | -100 |
| CDC42SE2 | CDC42 small effector protein 2 | -100 |
| CDCA2 | Cell division cycle-associated protein 2 | -93 |
| CDCA3 | Cell division cycle-associated protein 3 | -100 |
| CDCA7 | Cell division cycle-associated protein 7 | -100 |
| CDCA7L | Cell division cycle-associated 7-like protein | -100 |
| CDH1 | Cadherin-1;E-Cad/CTF1;E-Cad/CTF2;E-Cad/CTF3 | -100 |
| CDK4 | Cyclin-dependent kinase 4 | -67 |
| CDK5RAP1 | CDK5 regulatory subunit-associated protein 1 | -100 |
| CDK5RAP2 | CDK5 regulatory subunit-associated protein 2 | -100 |
| CDKAL1 | Threonylcarbamoyladenosine tRNA methylthiotransferase | -49 |
| CDKN2AIPNL | CDKN2AIP N-terminal-like protein | -100 |
| CDO1 | Cysteine dioxygenase type 1 | -100 |
| CEBPA | CCAAT/enhancer-binding protein alpha | -48 |
| CEBPB | CCAAT/enhancer-binding protein beta | -52 |
| CELF2 | CUGBP Elav-like family member 2 | -49 |
| CENPF | Centromere protein F | -40 |
| CENPL | Centromere protein L | -100 |
| CENPQ | Centromere protein Q | -100 |
| CEP131 | Centrosomal protein of 131 kDa | -100 |
| CEP135 | Centrosomal protein of 135 kDa | -100 |
| CEP170 | Centrosomal protein of 170 kDa;Centrosomal protein of 170 kDa;Centrosomal protein of 170 kDa | -33 |
| CEP55 | Centrosomal protein of 55 kDa | -100 |
| CEP76 | Centrosomal protein of 76 kDa | -100 |
| CEP85 | Centrosomal protein of 85 kDa | -70 |
| CEP97 | Centrosomal protein of 97 kDa | -52 |
| CFAP20 | Cilia- and flagella-associated protein 20 | -41 |
| CFD | Complement factor D | -45 |
| CHCHD1 | Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 1 | -98 |
| CHCHD2 | Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 2;Putative coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein CHCHD2P9, mitochondrial | -45 |
| CHCHD2P9 | Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 2;Putative coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein CHCHD2P9, mitochondrial | -45 |

| | | |
|---|---|---|
| CHCHD5 | Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 5 | -100 |
| CHD7 | Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 7 | -75 |
| CHD8 | Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 8 | -68 |
| CHEK1 | Serine/threonine-protein kinase Chk1 | -36 |
| CHI3L1 | Chitinase-3-like protein 1 | -44 |
| CHKA | Choline kinase alpha | -100 |
| CHM | Rab proteins geranylgeranyltransferase component A 1 | -74 |
| CHMP1B | Charged multivesicular body protein 1b | -37 |
| CHMP5 | Charged multivesicular body protein 5 | -45 |
| CHN2 | Beta-chimaerin | -100 |
| CHPF2 | Chondroitin sulfate glucuronyltransferase | -80 |
| CHRAC1 | Chromatin accessibility complex protein 1 | -100 |
| CHST11 | Carbohydrate sulfotransferase 11 | -100 |
| CHST12 | Carbohydrate sulfotransferase 12 | -100 |
| CHST13 | Carbohydrate sulfotransferase 13 | -100 |
| CHTOP | Chromatin target of PRMT1 protein | -73 |
| CIB1 | Calcium and integrin-binding protein 1 | -100 |
| CIC | Protein capicua homolog | -47 |
| CKS1B | Cyclin-dependent kinases regulatory subunit 1;Cyclin-dependent kinases regulatory subunit | -30 |
| CKS2 | Cyclin-dependent kinases regulatory subunit 2 | -98 |
| CLCN5 | H(+)/Cl(-) exchange transporter 5 | -100 |
| CLDND1 | Claudin domain-containing protein 1 | -100 |
| CLIC2 | Chloride intracellular channel protein 2 | -100 |
| CLIP2 | CAP-Gly domain-containing linker protein 2 | -100 |
| CLSPN | Claspin | -100 |
| CMIP | C-Maf-inducing protein | -100 |
| CMPK2 | UMP-CMP kinase 2, mitochondrial | -40 |
| CMTR2 | Cap-specific mRNA (nucleoside-2-O-)-methyltransferase 2 | -100 |
| c-myb | Transcriptional activator Myb | -100 |
| CNOT3 | CCR4-NOT transcription complex subunit 3 | -65 |
| CNOT4 | CCR4-NOT transcription complex subunit 4 | -100 |
| CNOT7 | CCR4-NOT transcription complex subunit 7 | -32 |
| CNTRL | Centriolin | -100 |
| COA1 | Cytochrome c oxidase assembly factor 1 homolog | -100 |
| COL7A1 | Collagen alpha-1(VII) chain | -100 |
| COLGALT1 | Procollagen galactosyltransferase 1 | -30 |
| COMMD5 | COMM domain-containing protein 5 | -75 |
| COMMD7 | COMM domain-containing protein 7 | -63 |
| COMMD8 | COMM domain-containing protein 8 | -34 |
| COMMD9 | COMM domain-containing protein 9 | -43 |
| COPS6 | COP9 signalosome complex subunit 6 | -33 |
| COPS8 | COP9 signalosome complex subunit 8 | -46 |
| COPZ1 | Coatomer subunit zeta-1 | -49 |
| COQ3 | Ubiquinone biosynthesis O-methyltransferase, mitochondrial | -61 |
| COQ6 | Ubiquinone biosynthesis monooxygenase COQ6, mitochondrial | -46 |
| COQ7 | 5-demethoxyubiquinone hydroxylase, mitochondrial | -58 |

| | | |
|---|---|---|
| COX18 | Mitochondrial inner membrane protein COX18 | -100 |
| COX6A1 | Cytochrome c oxidase subunit 6A1, mitochondrial | -100 |
| COX6C | Cytochrome c oxidase subunit 6C | -34 |
| COX7A2L | Cytochrome c oxidase subunit 7A-related protein, mitochondrial | -100 |
| COX8A | Cytochrome c oxidase subunit 8A, mitochondrial | -36 |
| CPD | Carboxypeptidase D | -43 |
| CRACR2A | EF-hand calcium-binding domain-containing protein 4B | -74 |
| CRBN | Protein cereblon | -100 |
| CRCP | DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC9 | -100 |
| CRIPT | Cysteine-rich PDZ-binding protein | -100 |
| CRTAP | Cartilage-associated protein | -100 |
| CRYBG3 | Very large A-kinase anchor protein | -100 |
| CRYZL1 | Quinone oxidoreductase-like protein 1 | -41 |
| CSNK2B-LY6G5B-562 | Casein kinase II subunit beta | -39 |
| CSRP1 | Cysteine and glycine-rich protein 1 | -39 |
| CSRP3 | Cysteine and glycine-rich protein 3 | -100 |
| CSTF2T | Cleavage stimulation factor subunit 2 tau variant | -30 |
| CTDNEP1 | CTD nuclear envelope phosphatase 1 | -100 |
| CTNNA1 | Catenin alpha-1 | -31 |
| CTNNB1 | Catenin beta-1 | -100 |
| CTTN | Src substrate cortactin | -55 |
| CWC15 | Spliceosome-associated protein CWC15 homolog | -36 |
| CWC25 | Pre-mRNA-splicing factor CWC25 homolog | -48 |
| CWF19L2 | CWF19-like protein 2 | -100 |
| CYB5B | Cytochrome b5 type B | -37 |
| CYBA | Cytochrome b-245 light chain | -100 |
| DACH1 | Dachshund homolog 1 | -30 |
| DAG1 | Dystroglycan;Alpha-dystroglycan;Beta-dystroglycan | -100 |
| DAP | Death-associated protein 1 | -60 |
| DBR1 | Lariat debranching enzyme | -35 |
| DCAF11 | DDB1- and CUL4-associated factor 11 | -42 |
| DCAF16 | DDB1- and CUL4-associated factor 16 | -100 |
| DCAKD | Dephospho-CoA kinase domain-containing protein | -59 |
| DCP2 | m7GpppN-mRNA hydrolase | -100 |
| DCTD | Deoxycytidylate deaminase | -40 |
| DCTN6 | Dynactin subunit 6 | -61 |
| DCUN1D5 | DCN1-like protein 5;DCN1-like protein | -52 |
| DDB2 | DNA damage-binding protein 2 | -80 |
| DDX11L8 | Putative ATP-dependent RNA helicase DDX11-like protein 8;Putative ATP-dependent RNA helicase DDX12 | -100 |
| DDX12P | Putative ATP-dependent RNA helicase DDX11-like protein 8;Putative ATP-dependent RNA helicase DDX12 | -100 |
| DDX19B | ATP-dependent RNA helicase DDX19B | -32 |
| DDX60 | Probable ATP-dependent RNA helicase DDX60 | -53 |
| DEGS1 | Sphingolipid delta(4)-desaturase DES1 | -33 |
| DENND3 | DENN domain-containing protein 3 | -58 |
| DENND4B | DENN domain-containing protein 4B | -100 |
| DERL2 | Derlin-2 | -100 |

| | | |
|---|---|---|
| DGAT1 | Diacylglycerol O-acyltransferase 1 | -100 |
| DGCR8 | Microprocessor complex subunit DGCR8 | -100 |
| DGKA | Diacylglycerol kinase;Diacylglycerol kinase alpha | -100 |
| DHRS3 | Short-chain dehydrogenase/reductase 3 | -100 |
| DHRS4 | Dehydrogenase/reductase SDR family member 4 | -100 |
| DHX32 | Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX32 | -100 |
| DHX34 | Probable ATP-dependent RNA helicase DHX34 | -71 |
| DHX35 | Probable ATP-dependent RNA helicase DHX35 | -67 |
| DHX36 | ATP-dependent RNA helicase DHX36 | -41 |
| DIAPH3 | Protein diaphanous homolog 3 | -78 |
| DIS3L | DIS3-like exonuclease 1 | -42 |
| DKFZp566H1924 | Neuroplastin | -43 |
| DKFZp586F0420 | Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 | -34 |
| DKFZp686E14208 | MAP kinase-interacting serine/threonine-protein kinase 1 | -100 |
| DKFZp686H0575 | ETS-related transcription factor Elf-1 | -30 |
| DKFZp779K1237 | Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta isoform | -39 |
| DKFZp781C0425 | BET1 homolog | -60 |
| DLG1 | Disks large homolog 1 | -73 |
| DLGAP5 | Disks large-associated protein 5 | -55 |
| DNA2 | DNA replication ATP-dependent helicase/nuclease DNA2;DNA replication nuclease DNA2;DNA replication ATP-dependent helicase DNA2 | -100 |
| DNAAF2 | Protein kintoun | -59 |
| DNAJC10 | DnaJ homolog subfamily C member 10 | -45 |
| DNAJC12 | DnaJ homolog subfamily C member 12 | -100 |
| DNAJC16 | DnaJ homolog subfamily C member 16 | -100 |
| DNLZ | DNL-type zinc finger protein | -100 |
| DNTTIP1 | Deoxynucleotidyltransferase terminal-interacting protein 1 | -100 |
| DOCK5 | Dedicator of cytokinesis protein 5 | -49 |
| DOCK9 | Dedicator of cytokinesis protein 9 | -100 |
| DOK2 | Docking protein 2 | -32 |
| DOT1L | Histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-79 specific | -100 |
| DPH2 | Diphthamide biosynthesis protein 2 | -68 |
| DPYD | Dihydropyrimidine dehydrogenase [NADP(+)] | -100 |
| DROSHA | Ribonuclease 3 | -48 |
| DSCR3 | Down syndrome critical region protein 3 | -33 |
| DSG2 | Desmoglein-2 | -100 |
| DST | Dystonin | -100 |
| DTL | Denticleless protein homolog | -100 |
| DTX2 | Probable E3 ubiquitin-protein ligase DTX2 | -100 |
| DUS2 | tRNA-dihydrouridine(20) synthase [NAD(P)+]-like | -100 |
| DYM | Dymeclin | -100 |
| DYNC2H1 | Cytoplasmic dynein 2 heavy chain 1 | -100 |
| DYNLL2 | Dynein light chain 2, cytoplasmic;Dynein light chain 1, cytoplasmic | -30 |
| E2F4 | Transcription factor E2F4 | -41 |
| E2F5 | Transcription factor E2F4;Transcription factor E2F5 | -100 |
| EBF1 | Transcription factor COE3;Transcription factor COE1 | -63 |
| EBF3 | Transcription factor COE3 | -47 |

| | | |
|---|---|---|
| EBP | 3-beta-hydroxysteroid-Delta(8),Delta(7)-isomerase | -30 |
| ECD | Protein SGT1 | -39 |
| ECE2 | Endothelin-converting enzyme 2;Methyltransferase-like region;Endothelin-converting enzyme 2 region | -39 |
| ECI2 | Enoyl-CoA delta isomerase 2, mitochondrial | -100 |
| ECT2 | Protein ECT2 | -100 |
| EDF1 | Endothelial differentiation-related factor 1 | -59 |
| EDRF1 | Erythroid differentiation-related factor 1 | -100 |
| EHBP1 | EH domain-binding protein 1 | -100 |
| EHD4 | EH domain-containing protein 4 | -42 |
| EHMT1 | Histone-lysine N-methyltransferase EHMT1 | -52 |
| EIF1 | Eukaryotic translation initiation factor 1 | -41 |
| EIF1AD | Probable RNA-binding protein EIF1AD | -41 |
| EIF1B | Eukaryotic translation initiation factor 1;Eukaryotic translation initiation factor 1b | -45 |
| EIF2AK4 | Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 4 | -100 |
| EIF2D | Eukaryotic translation initiation factor 2D | -37 |
| EIF3I | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I | -30 |
| EIF4E2 | Eukaryotic translation initiation factor 4E type 2 | -37 |
| EIF4ENIF1 | Eukaryotic translation initiation factor 4E transporter | -41 |
| ELANE | Neutrophil elastase | -53 |
| ELF1 | ETS-related transcription factor Elf-1 | -30 |
| ELF2 | ETS-related transcription factor Elf-2 | -100 |
| ELMO1 | Engulfment and cell motility protein 1 | -62 |
| ELMSAN1 | ELM2 and SANT domain-containing protein 1 | -100 |
| ELOVL1 | Elongation of very long chain fatty acids protein 1 | -100 |
| EMC10 | ER membrane protein complex subunit 10 | -51 |
| EMC6 | ER membrane protein complex subunit 6 | -99 |
| EMILIN1 | EMILIN-1 | -100 |
| EMSY | Protein EMSY | -100 |
| ENDOG | Endonuclease G, mitochondrial | -42 |
| ENO2 | Gamma-enolase;Enolase | -52 |
| ENO3 | Beta-enolase;Enolase | -100 |
| ENSA | Alpha-endosulfine | -31 |
| ENY2 | Transcription and mRNA export factor ENY2 | -44 |
| EPB41L3 | Band 4.1-like protein 3;Band 4.1-like protein 3, N-terminally processed | -31 |
| EPC2 | Enhancer of polycomb homolog;Enhancer of polycomb homolog 2 | -100 |
| EPDR1 | Mammalian ependymin-related protein 1 | -61 |
| EPM2AIP1 | EPM2A-interacting protein 1 | -100 |
| EPN1 | Epsin-1 | -55 |
| EPN3 | Epsin-3;Epsin-1 | -100 |
| EPT1 | Ethanolaminephosphotransferase 1 | -100 |
| ERCC5 | DNA repair protein complementing XP-G cells | -42 |
| ERCC6L | DNA excision repair protein ERCC-6-like | -69 |
| ERGIC2 | Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein 2 | -36 |
| ERGIC3 | Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein 3 | -36 |
| ERH | Enhancer of rudimentary homolog | -47 |
| ERICH3 | Glutamate-rich protein 3 | -100 |

| | | |
|---|---|---|
| ERO1LB | ERO1-like protein beta | -100 |
| ESF1 | ESF1 homolog | -46 |
| ESPL1 | Separin | -100 |
| ETV3 | ETS translocation variant 3 | -100 |
| EVI2B | Protein EVI2B | -38 |
| EVL | Ena/VASP-like protein | -47 |
| EXO1 | Exonuclease 1 | -100 |
| EXOSC3 | Exosome complex component RRP40 | -44 |
| F11R | Junctional adhesion molecule A | -67 |
| FADS1 | Fatty acid desaturase 1 | -100 |
| FADS2 | Fatty acid desaturase 2 | -100 |
| FAF2 | FAS-associated factor 2 | -33 |
| FAM103A1 | RNMT-activating mini protein | -97 |
| FAM126A | Hyccin | -100 |
| FAM133A | Protein FAM133B;Protein FAM133A | -100 |
| FAM133B | Protein FAM133B;Protein FAM133A | -100 |
| FAM134C | Protein FAM134C | -100 |
| FAM172A | Protein FAM172A | -79 |
| FAM188A | Protein FAM188A | -100 |
| FAM195A | Protein FAM195A | -100 |
| FAM195B | Protein FAM195B | -38 |
| FAM204A | Protein FAM204A | -100 |
| FAM20B | Glycosaminoglycan xylosylkinase | -46 |
| FAM21C | WASH complex subunit FAM21C | -41 |
| FAM32A | Protein FAM32A | -88 |
| FAM45A | Protein FAM45A;Protein FAM45B | -43 |
| FAM45B | Protein FAM45A;Protein FAM45B | -43 |
| FAM49A | Protein FAM49A | -100 |
| FAM83D | Protein FAM83D | -100 |
| FAM96B | Mitotic spindle-associated MMXD complex subunit MIP18 | -44 |
| FAM98C | Protein FAM98C | -100 |
| FANCI | Fanconi anemia group I protein | -30 |
| FAR2 | Fatty acyl-CoA reductase 2 | -100 |
| FAS | Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6 | -57 |
| FASTKD3 | FAST kinase domain-containing protein 3 | -65 |
| FASTKD5 | FAST kinase domain-containing protein 5 | -76 |
| FAU | 40S ribosomal protein S30 | -100 |
| FBLL1 | rRNA/tRNA 2-O-methyltransferase fibrillarin-like protein 1 | -58 |
| FBXL19 | F-box/LRR-repeat protein 19 | -100 |
| FBXL6 | F-box/LRR-repeat protein 6 | -100 |
| FBXO3 | F-box only protein 3 | -100 |
| FBXO6 | F-box only protein 6 | -48 |
| FCGR2B | Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor II-b | -100 |
| FCHO1 | F-BAR domain only protein 1 | -33 |
| FCHSD2 | F-BAR and double SH3 domains protein 2 | -100 |
| FDX1L | Adrenodoxin-like protein, mitochondrial | -100 |

| | | |
|---|---|---|
| FEM1A | Protein fem-1 homolog A | -100 |
| FGD4 | FYVE, RhoGEF and PH domain-containing protein 4 | -100 |
| FGFR1 | Fibroblast growth factor receptor;Fibroblast growth factor receptor 1 | -100 |
| FGFR1OP | FGFR1 oncogene partner | -31 |
| FGFR1OP2 | FGFR1 oncogene partner 2 | -94 |
| FHL3 | Four and a half LIM domains protein 3 | -100 |
| FKBP14 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase;Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP14 | -100 |
| FLJ00186 | Ras association domain-containing protein 5 | -33 |
| FLT3 | Receptor-type tyrosine-protein kinase FLT3 | -100 |
| FLVCR1 | Feline leukemia virus subgroup C receptor-related protein 1 | -100 |
| FOXK2 | Forkhead box protein K2 | -100 |
| FOXP1 | Forkhead box protein P1 | -100 |
| FOXP4 | Forkhead box protein P4 | -100 |
| FPGS | Folylpolyglutamate synthase, mitochondrial | -100 |
| FRA10AC1 | Protein FRA10AC1 | -100 |
| FRY | Protein furry homolog | -100 |
| FUT7 | Alpha-(1,3)-fucosyltransferase 7 | -100 |
| FYB | FYN-binding protein | -100 |
| FYCO1 | FYVE and coiled-coil domain-containing protein 1 | -34 |
| FYTTD1 | UAP56-interacting factor | -100 |
| FZR1 | Fizzy-related protein homolog | -100 |
| GALNT7 | N-acetylgalactosaminyltransferase 7;Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase | -100 |
| GALT | Galactose-1-phosphate uridylyltransferase | -100 |
| GAS6 | Growth arrest-specific protein 6 | -100 |
| GAS7 | Growth arrest-specific protein 7 | -72 |
| GATC | Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit C, mitochondrial | -71 |
| GCLM | Glutamate--cysteine ligase regulatory subunit | -46 |
| GCOM1 | DNA-directed RNA polymerase II subunit GRINL1A;Putative GRINL1B complex locus protein 2 | -100 |
| GCOM2 | DNA-directed RNA polymerase II subunit GRINL1A;Putative GRINL1B complex locus protein 2 | -100 |
| GDPGP1 | GDP-D-glucose phosphorylase 1 | -100 |
| GET4 | Golgi to ER traffic protein 4 homolog | -45 |
| GFI1 | Zinc finger protein Gfi-1 | -100 |
| GFI1B | Zinc finger protein Gfi-1b | -100 |
| GGACT | Gamma-glutamylaminecyclotransferase | -100 |
| GGPS1 | Geranylgeranyl pyrophosphate synthase | -41 |
| GIGYF1 | PERQ amino acid-rich with GYF domain-containing protein 1 | -100 |
| GINS3 | DNA replication complex GINS protein PSF3 | -36 |
| GIPC1 | PDZ domain-containing protein GIPC1 | -48 |
| GIPC3 | PDZ domain-containing protein GIPC3 | -100 |
| GIT2 | ARF GTPase-activating protein GIT2 | -38 |
| GK2 | Glycerol kinase 2 | -100 |
| GLA | Alpha-galactosidase A | -49 |
| GLRX | Glutaredoxin-1 | -36 |
| GLT8D1 | Glycosyltransferase 8 domain-containing protein 1 | -100 |
| GLTSCR1L | GLTSCR1-like protein | -100 |
| GM2A | Ganglioside GM2 activator;Ganglioside GM2 activator isoform short | -99 |

| | | |
|---|---|---|
| GMEB2 | Glucocorticoid modulatory element-binding protein 2 | -50 |
| GMFB | Glia maturation factor beta | -70 |
| GMNN | Geminin | -67 |
| GMPR | GMP reductase 1 | -60 |
| GNA15 | Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-15 | -43 |
| GNB4 | Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-4 | -38 |
| GNE | Bifunctional UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase;UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase (hydrolyzing);N-acetylmannosamine kinase | -85 |
| GNL2 | Nucleolar GTP-binding protein 2 | -50 |
| GNL3L | Guanine nucleotide-binding protein-like 3-like protein | -36 |
| GOLGA4 | Golgin subfamily A member 4 | -57 |
| GOLGA8N | Golgin subfamily A member 8R;Golgin subfamily A member 8N;Golgin subfamily A member 8O | -100 |
| GOLGA8O | Golgin subfamily A member 8R;Golgin subfamily A member 8N;Golgin subfamily A member 8O | -100 |
| GOLGA8Q | Golgin subfamily A member 8R;Golgin subfamily A member 8N;Golgin subfamily A member 8O | -100 |
| GOLGA8R | Golgin subfamily A member 8R;Golgin subfamily A member 8N;Golgin subfamily A member 8O | -100 |
| GOLM1 | Golgi membrane protein 1 | -100 |
| GOLPH3L | Golgi phosphoprotein 3-like | -68 |
| GORAB | RAB6-interacting golgin | -100 |
| GPANK1 | G patch domain and ankyrin repeat-containing protein 1 | -100 |
| GPATCH11 | G patch domain-containing protein 11 | -32 |
| GPATCH4 | G patch domain-containing protein 4 | -40 |
| GPBP1 | Vasculin | -100 |
| GPR107 | Protein GPR107 | -100 |
| GPR180 | Integral membrane protein GPR180 | -100 |
| GPR89A | Putative Golgi pH regulator C;Golgi pH regulator A;Golgi pH regulator B | -39 |
| GPR89B | Putative Golgi pH regulator C;Golgi pH regulator A;Golgi pH regulator B | -39 |
| GPR89C | Putative Golgi pH regulator C;Golgi pH regulator A;Golgi pH regulator B | -39 |
| GPRC5C | G-protein coupled receptor family C group 5 member C | -41 |
| GPS2 | G protein pathway suppressor 2 | -100 |
| GPSM1 | G-protein-signaling modulator 1 | -100 |
| GPT2 | Alanine aminotransferase 2 | -39 |
| GPX7 | Glutathione peroxidase 7 | -48 |
| GRAMD4 | GRAM domain-containing protein 4 | -38 |
| GRAP2 | GRB2-related adapter protein 2 | -100 |
| GRN | Granulins;Acrogranin;Paragranulin;Granulin-1;Granulin-2;Granulin-3;Granulin-4;Granulin-5;Granulin-6;Granulin-7 | -100 |
| GSE1 | Genetic suppressor element 1 | -36 |
| GSPT2 | Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit ERF3A;Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit ERF3B | -33 |
| GTF2A1 | Transcription initiation factor IIA subunit 1;Transcription initiation factor IIA alpha chain;Transcription initiation factor IIA beta chain | -99 |
| GTF2B | Transcription initiation factor IIB | -37 |
| GTF3C1 | General transcription factor 3C polypeptide 1 | -46 |
| GTF3C2 | General transcription factor 3C polypeptide 2 | -41 |
| GTF3C3 | General transcription factor 3C polypeptide 3 | -41 |
| GTSE1 | G2 and S phase-expressed protein 1 | -94 |
| GYG1 | Glycogenin-1 | -33 |
| H2AFV | Histone H2A.V;Histone H2A.Z;Histone H2A | -50 |

| | | |
|---|---|---|
| H2AFZ | Histone H2A.V;Histone H2A.Z;Histone H2A | -50 |
| HAUS5 | HAUS augmin-like complex subunit 5 | -30 |
| HAUS7 | HAUS augmin-like complex subunit 7 | -100 |
| HAX1 | HCLS1-associated protein X-1 | -42 |
| HBE1 | Hemoglobin subunit epsilon | -100 |
| HBG1 | Hemoglobin subunit gamma-1 | -76 |
| HCFC1 | Host cell factor 1;HCF N-terminal chain 1;HCF N-terminal chain 2;HCF N-terminal chain 3;HCF N-terminal chain 4;HCF N-terminal chain 5;HCF N-terminal chain 6;HCF C-terminal chain 1;HCF C-terminal chain 2;HCF C-terminal chain 3;HCF C-terminal chain 4;HCF C-terminal chain 5;HCF C-terminal chain 6 | -35 |
| hCG_1984214 | 28S ribosomal protein S17, mitochondrial | -65 |
| hCG_1985580 | Programmed cell death protein 6 | -50 |
| hCG_27868 | E3 ubiquitin-protein ligase RNF220 | -100 |
| HDAC4 | Histone deacetylase 4 | -54 |
| HDAC7 | Histone deacetylase 7;Histone deacetylase | -60 |
| HDDC3 | Guanosine-3,5-bis(diphosphate) 3-pyrophosphohydrolase MESH1 | -48 |
| HEATR6 | HEAT repeat-containing protein 6 | -100 |
| HEBP1 | Heme-binding protein 1 | -32 |
| HELZ | Probable helicase with zinc finger domain | -60 |
| HELZ2 | Helicase with zinc finger domain 2 | -100 |
| HERC1 | Probable E3 ubiquitin-protein ligase HERC1 | -63 |
| HERC2 | E3 ubiquitin-protein ligase HERC2 | -50 |
| HERPUD1 | Homocysteine-responsive endoplasmic reticulum-resident ubiquitin-like domain member 1 protein | -100 |
| HIAT1 | Hippocampus abundant transcript 1 protein | -100 |
| HIP1 | Huntingtin-interacting protein 1 | -57 |
| HIP1R | Huntingtin-interacting protein 1-related protein | -50 |
| HLCS | Biotin--protein ligase;Biotin--[methylmalonyl-CoA-carboxytransferase] ligase;Biotin--[propionyl-CoA-carboxylase [ATP-hydrolyzing]] ligase;Biotin--[methylcrotonoyl-CoA-carboxylase] ligase;Biotin--[acetyl-CoA-carboxylase] ligase | -100 |
| HLTF | Helicase-like transcription factor | -72 |
| HMGB3 | High mobility group protein B3 | -34 |
| HMGN2 | Non-histone chromosomal protein HMG-17 | -66 |
| HMGN3 | High mobility group nucleosome-binding domain-containing protein 3 | -100 |
| HMX2 | Homeobox protein HMX2 | -100 |
| HNRNPH1 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H;Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H, N-terminally processed | -34 |
| HNRNPH2 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2 | -30 |
| HOXA11 | Homeobox protein Hox-A11 | -100 |
| HPDL | 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase-like protein | -100 |
| HPS1 | Hermansky-Pudlak syndrome 1 protein | -100 |
| HPS5 | Hermansky-Pudlak syndrome 5 protein | -100 |
| HPS6 | Hermansky-Pudlak syndrome 6 protein | -35 |
| HSCB | Iron-sulfur cluster co-chaperone protein HscB, mitochondrial | -100 |
| HSD17B7 | 3-keto-steroid reductase | -100 |
| HSDL1 | Inactive hydroxysteroid dehydrogenase-like protein 1 | -100 |
| HSF1 | Heat shock factor protein 1 | -100 |
| HSP90AB3P | Putative heat shock protein HSP 90-beta-3 | -100 |
| HSPA7 | Heat shock 70 kDa protein 6;Putative heat shock 70 kDa protein 7 | -47 |
| HSPB11 | Intraflagellar transport protein 25 homolog | -52 |

| | | |
|---|---|---|
| IAH1 | Isoamyl acetate-hydrolyzing esterase 1 homolog | -31 |
| IBTK | Inhibitor of Bruton tyrosine kinase | -100 |
| ICE1 | Little elongation complex subunit 1 | -100 |
| ICOSLG | ICOS ligand | -100 |
| IFIT1 | Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1 | -100 |
| IFITM1 | Interferon-induced transmembrane protein 1;Interferon-induced transmembrane protein 2;Interferon-induced transmembrane protein 3 | -100 |
| IFITM2 | Interferon-induced transmembrane protein 1;Interferon-induced transmembrane protein 2;Interferon-induced transmembrane protein 3 | -100 |
| IFITM3 | Interferon-induced transmembrane protein 1;Interferon-induced transmembrane protein 2;Interferon-induced transmembrane protein 3 | -100 |
| IFT122 | Intraflagellar transport protein 122 homolog | -100 |
| IGBP1 | Immunoglobulin-binding protein 1 | -38 |
| IGHMBP2 | DNA-binding protein SMUBP-2 | -100 |
| IL18 | Interleukin-18 | -100 |
| IL18R1 | Interleukin-18 receptor 1 | -100 |
| IL1RN | Interleukin-1 receptor antagonist protein | -100 |
| IL3RA | Interleukin-3 receptor subunit alpha | -45 |
| IL4I1 | L-amino-acid oxidase | -51 |
| ILK | Integrin-linked protein kinase | -35 |
| INCENP | Inner centromere protein | -95 |
| INIP | SOSS complex subunit C | -93 |
| INO80E | INO80 complex subunit E | -100 |
| INPP4A | Type I inositol 3,4-bisphosphate 4-phosphatase | -84 |
| INPP5A | Type I inositol 1,4,5-trisphosphate 5-phosphatase | -39 |
| IRAK1 | Interleukin-1 receptor-associated kinase 1 | -100 |
| IRAK3 | Interleukin-1 receptor-associated kinase 3 | -40 |
| IRAK4 | Interleukin-1 receptor-associated kinase 4 | -31 |
| IRF2BP2 | Interferon regulatory factor 2-binding protein 2;Interferon regulatory factor 2-binding protein 2 | -37 |
| IRF8 | Interferon regulatory factor 8 | -51 |
| IRS2 | Insulin receptor substrate 2 | -40 |
| ITIH1 | Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1 | -100 |
| ITIH2 | Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2 | -100 |
| ITPA | Inosine triphosphate pyrophosphatase | -40 |
| ITPK1 | Inositol-tetrakisphosphate 1-kinase | -100 |
| ITPKC | Inositol-trisphosphate 3-kinase C | -41 |
| ITPR1 | Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 | -35 |
| ITPR3 | Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3 | -75 |
| IXL | Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 29 | -50 |
| JAG1 | Protein jagged-1 | -82 |
| JAK2 | Tyrosine-protein kinase JAK2 | -100 |
| JARID2 | Protein Jumonji | -70 |
| JMY | Junction-mediating and -regulatory protein | -100 |
| JUNB | Transcription factor jun-B | -61 |
| JUND | Transcription factor jun-D | -58 |
| KATNB1 | Katanin p80 WD40 repeat-containing subunit B1 | -100 |
| KCNN4 | Intermediate conductance calcium-activated potassium channel protein 4 | -100 |
| KCTD5 | BTB/POZ domain-containing protein KCTD5 | -37 |
| KDELC1 | KDEL motif-containing protein 1 | -83 |

| | | |
|---|---|---|
| KDM1B | Lysine-specific histone demethylase 1B | -40 |
| KDM3A | Lysine-specific demethylase 3A | -100 |
| KDM4A | Lysine-specific demethylase 4A | -100 |
| KDM4B | Lysine-specific demethylase 4B | -100 |
| KDM5A | Lysine-specific demethylase 5A | -100 |
| KDM5B | Lysine-specific demethylase 5B | -100 |
| KDM5C | Lysine-specific demethylase 5C | -41 |
| KDM6A | Lysine-specific demethylase 6A;Histone demethylase UTY | -100 |
| KIAA0100 | Protein KIAA0100 | -45 |
| KIAA0101 | PCNA-associated factor | -45 |
| KIAA1143 | Uncharacterized protein KIAA1143 | -49 |
| KIF16B | Kinesin-like protein KIF16B | -100 |
| KIF1B | Kinesin-like protein;Kinesin-like protein KIF1B | -100 |
| KIF1Bbeta | Kinesin-like protein;Kinesin-like protein KIF1B | -100 |
| KIF20A | Kinesin-like protein KIF20A | -36 |
| KIF20B | Kinesin-like protein KIF20B | -60 |
| KIF21A | Kinesin-like protein KIF21A;Kinesin-like protein KIF21B | -100 |
| KIF21B | Kinesin-like protein KIF21A;Kinesin-like protein KIF21B | -100 |
| KIF22 | Kinesin-like protein KIF22;Kinesin-like protein | -39 |
| KIF23 | Kinesin-like protein KIF23;Kinesin-like protein | -66 |
| KIF3B | Kinesin-like protein KIF3B;Kinesin-like protein KIF3B, N-terminally processed | -100 |
| KLF13 | Krueppel-like factor 13 | -72 |
| KLHDC3 | Kelch domain-containing protein 3 | -100 |
| KLHDC4 | Kelch domain-containing protein 4 | -49 |
| KLHL11 | Kelch-like protein 11 | -100 |
| KLHL7 | Kelch-like protein 7 | -100 |
| KLK9 | Tubulin alpha-1C chain | -100 |
| KMT2A | Histone-lysine N-methyltransferase 2A;MLL cleavage product N320;MLL cleavage product C180 | -100 |
| KMT2B | Histone-lysine N-methyltransferase 2B | -42 |
| KMT2C | Histone-lysine N-methyltransferase 2C | -100 |
| KMT2D | Histone-lysine N-methyltransferase 2D | -57 |
| KNSTRN | Small kinetochore-associated protein | -62 |
| KRT18 | Keratin, type I cytoskeletal 18 | -100 |
| KRT6B | Keratin, type II cytoskeletal 6B | -39 |
| KRTCAP2 | Keratinocyte-associated protein 2 | -66 |
| KSR1 | Kinase suppressor of Ras 1 | -50 |
| L3HYPDH | Trans-3-hydroxy-L-proline dehydratase | -34 |
| L3MBTL3 | Lethal(3)malignant brain tumor-like protein 3 | -100 |
| LAIR1 | Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 1 | -72 |
| LARP4 | La-related protein 4 | -51 |
| LASP1 | LIM and SH3 domain protein 1 | -35 |
| LATS1 | Serine/threonine-protein kinase LATS1 | -100 |
| LCMT1 | Leucine carboxyl methyltransferase 1 | -100 |
| LENG8 | Leukocyte receptor cluster member 8 | -100 |
| LENG9 | Leukocyte receptor cluster member 9 | -70 |
| LETMD1 | LETM1 domain-containing protein 1 | -100 |

| | | |
|---|---|---|
| LGALS8 | Galectin-8;Galectin | -57 |
| LGALS9 | Galectin-9 | -45 |
| LIAS | Lipoyl synthase, mitochondrial | -100 |
| LIMA1 | LIM domain and actin-binding protein 1 | -31 |
| LIMD1 | LIM domain-containing protein 1 | -45 |
| LIMS1 | LIM and senescent cell antigen-like-containing domain protein 1 | -35 |
| LIMS2 | LIM and senescent cell antigen-like-containing domain protein 1;LIM and senescent cell antigen-like-containing domain protein 2 | -100 |
| LIN37 | Protein lin-37 homolog | -100 |
| LIN7C | Protein lin-7 homolog C | -51 |
| LIN9 | Protein lin-9 homolog | -100 |
| LINC00493 | | -100 |
| LIPA | Lysosomal acid lipase/cholesteryl ester hydrolase | -48 |
| LLPH | Protein LLP homolog | -38 |
| LMBR1 | Limb region 1 protein homolog | -100 |
| LMBRD2 | LMBR1 domain-containing protein 2 | -100 |
| LNP | Protein lunapark | -43 |
| LOC728763 | Putative ciliary rootlet coiled-coil protein-like 3 protein | -100 |
| LPCAT4 | Lysophospholipid acyltransferase LPCAT4 | -98 |
| LRRC14 | Leucine-rich repeat-containing protein 14 | -100 |
| LRRC8D | Volume-regulated anion channel subunit LRRC8D | -100 |
| LRRCC1 | Leucine-rich repeat and coiled-coil domain-containing protein 1 | -100 |
| LRSAM1 | E3 ubiquitin-protein ligase LRSAM1 | -43 |
| LSM5 | U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm5 | -100 |
| LSM7 | U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm7 | -74 |
| LUZP1 | Leucine zipper protein 1 | -30 |
| LY75 | Lymphocyte antigen 75 | -49 |
| LYRM4 | LYR motif-containing protein 4 | -74 |
| LYSMD2 | LysM and putative peptidoglycan-binding domain-containing protein 2 | -38 |
| LZTR1 | Leucine-zipper-like transcriptional regulator 1 | -100 |
| MAD2L1BP | MAD2L1-binding protein | -84 |
| MAD2L2 | Mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD2B | -100 |
| MAK16 | Protein MAK16 homolog | -32 |
| MAML1 | Mastermind-like protein 1 | -100 |
| MAN1A2 | Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IB | -71 |
| MAN1B1 | Endoplasmic reticulum mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase;alpha-1,2-Mannosidase | -34 |
| MANF | Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor | -55 |
| MAP1A | Microtubule-associated protein 1A;MAP1A heavy chain;MAP1 light chain LC2 | -100 |
| MAP1LC3A | Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B;Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3 beta 2;Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A | -100 |
| MAP1S | Microtubule-associated protein 1S;MAP1S heavy chain;MAP1S light chain | -35 |
| MAP2K4 | Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 4 | -53 |
| MAP3K1 | Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 | -61 |
| MAP3K7 | Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 | -34 |
| MAP4K5 | Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase;Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 5 | -100 |
| MAP7D1 | MAP7 domain-containing protein 1 | -32 |
| MAP7D3 | MAP7 domain-containing protein 3 | -53 |
| MAPK1IP1L | MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein-like | -98 |

| | | |
|---|---|---|
| MAPK9 | Mitogen-activated protein kinase 9 | -100 |
| MAPKAPK3 | MAP kinase-activated protein kinase 3 | -77 |
| MARK3 | MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3 | -100 |
| MAST3 | Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 3 | -55 |
| MASTL | Serine/threonine-protein kinase greatwall | -100 |
| MATK | Non-specific protein-tyrosine kinase;Megakaryocyte-associated tyrosine-protein kinase | -71 |
| MAZ | Myc-associated zinc finger protein | -32 |
| MBD2 | Methyl-CpG-binding domain protein 2 | -60 |
| MBLL | Muscleblind-like protein 1;Muscleblind-like protein 2 | -32 |
| MBNL2 | Muscleblind-like protein 1;Muscleblind-like protein 2 | -32 |
| MBP | Myelin basic protein | -100 |
| MCEMP1 | Mast cell-expressed membrane protein 1 | -63 |
| MCFD2 | Multiple coagulation factor deficiency protein 2 | -35 |
| MCRS1 | Microspherule protein 1 | -100 |
| MCU | Calcium uniporter protein, mitochondrial | -48 |
| MCUR1 | Mitochondrial calcium uniporter regulator 1 | -100 |
| MDC1 | Mediator of DNA damage checkpoint protein 1 | -35 |
| ME1 | NADP-dependent malic enzyme | -32 |
| MECP2 | Methyl-CpG-binding protein 2 | -33 |
| MECR | Trans-2-enoyl-CoA reductase, mitochondrial | -63 |
| MED18 | Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 18 | -49 |
| MED25 | Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 25 | -59 |
| MED28 | Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 28 | -100 |
| MED29 | Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 29 | -50 |
| MED7 | Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 7 | -100 |
| MED9 | Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 9 | -100 |
| MEF2D | Myocyte-specific enhancer factor 2D | -49 |
| MEFV | Pyrin | -31 |
| METTL10 | Protein-lysine N-methyltransferase METTL10 | -62 |
| METTL14 | N6-adenosine-methyltransferase subunit METTL14 | -100 |
| METTL2B | Methyltransferase-like protein 2B | -100 |
| METTL5 | Methyltransferase-like protein 5 | -48 |
| METTL7B | Methyltransferase-like protein 7B | -100 |
| MFF | Mitochondrial fission factor | -97 |
| MFNG | Beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase manic fringe | -100 |
| MFSD1 | Major facilitator superfamily domain-containing protein 1 | -63 |
| MGA | MAX gene-associated protein | -66 |
| MIB1 | E3 ubiquitin-protein ligase MIB1 | -100 |
| MICAL1 | Protein-methionine sulfoxide oxidase MICAL1 | -36 |
| MICAL3 | Protein-methionine sulfoxide oxidase MICAL3 | -100 |
| MICU2 | Calcium uptake protein 2, mitochondrial | -30 |
| MID1IP1 | Mid1-interacting protein 1 | -100 |
| MIEF1 | Mitochondrial dynamics protein MID51 | -100 |
| MIEN1 | Migration and invasion enhancer 1 | -100 |
| MINA | Bifunctional lysine-specific demethylase and histidyl-hydroxylase MINA | -42 |
| MINOS1 | MICOS complex subunit MIC10 | -100 |

| | | |
|---|---|---|
| MINOS1-NBL1 | MICOS complex subunit MIC10 | -100 |
| MIOS | WD repeat-containing protein mio | -35 |
| MIS18BP1 | Mis18-binding protein 1 | -100 |
| MKL1 | MKL/myocardin-like protein 1 | -53 |
| MLF2 | Myeloid leukemia factor 2 | -59 |
| MLH1 | DNA mismatch repair protein Mlh1 | -32 |
| MLKL | Mixed lineage kinase domain-like protein | -68 |
| MLLT1 | Protein ENL | -46 |
| MLLT10 | Protein AF-10 | -100 |
| MLLT6 | Protein AF-17 | -100 |
| MLST8 | Target of rapamycin complex subunit LST8 | -65 |
| MLXIP | MLX-interacting protein | -100 |
| MMGT1 | Membrane magnesium transporter 1 | -100 |
| MMP20 | Matrix metalloproteinase-20 | -100 |
| MOB3A | MOB kinase activator 3A | -62 |
| MORF4L1 | Mortality factor 4-like protein 1 | -39 |
| MOSPD2 | Motile sperm domain-containing protein 2 | -100 |
| MPC1 | Mitochondrial pyruvate carrier 1 | -100 |
| MPHOSPH8 | M-phase phosphoprotein 8 | -31 |
| MPP6 | MAGUK p55 subfamily member 6 | -41 |
| MRGBP | MRG/MORF4L-binding protein | -100 |
| MRM1 | rRNA methyltransferase 1, mitochondrial | -71 |
| MROH1 | Maestro heat-like repeat-containing protein family member 1 | -100 |
| MRPL1 | 39S ribosomal protein L1, mitochondrial | -46 |
| MRPL14 | 39S ribosomal protein L14, mitochondrial | -54 |
| MRPL15 | 39S ribosomal protein L15, mitochondrial | -37 |
| MRPL16 | 39S ribosomal protein L16, mitochondrial | -39 |
| MRPL20 | 39S ribosomal protein L20, mitochondrial | -32 |
| MRPL33 | 39S ribosomal protein L33, mitochondrial | -66 |
| MRPL38 | 39S ribosomal protein L38, mitochondrial | -36 |
| MRPL41 | 39S ribosomal protein L41, mitochondrial | -33 |
| MRPL42 | 39S ribosomal protein L42, mitochondrial | -62 |
| MRPL51 | 39S ribosomal protein L51, mitochondrial | -91 |
| MRPL54 | 39S ribosomal protein L54, mitochondrial | -37 |
| MRPL57 | Ribosomal protein 63, mitochondrial | -50 |
| MRPS12 | 28S ribosomal protein S12, mitochondrial | -100 |
| MRPS14 | 28S ribosomal protein S14, mitochondrial | -43 |
| MRPS16 | 28S ribosomal protein S16, mitochondrial | -81 |
| MRPS17 | 28S ribosomal protein S17, mitochondrial | -65 |
| MRPS18A | 28S ribosomal protein S18a, mitochondrial | -31 |
| MRPS26 | 28S ribosomal protein S26, mitochondrial | -45 |
| MRPS34 | 28S ribosomal protein S34, mitochondrial | -36 |
| MRS2 | Magnesium transporter MRS2 homolog, mitochondrial | -100 |
| MSH3 | DNA mismatch repair protein Msh3 | -60 |
| MSL1 | Male-specific lethal 1 homolog | -75 |
| MSMO1 | Methylsterol monooxygenase 1 | -100 |

| | | |
|---|---|---|
| MT1E | Metallothionein-1M;Metallothionein-1X;Metallothionein-1G;Metallothionein-1E;Metallothionein-2 | -100 |
| MT1G | Metallothionein-1M;Metallothionein-1X;Metallothionein-1G;Metallothionein-1E;Metallothionein-2 | -100 |
| MT1M | Metallothionein-1M;Metallothionein-1X;Metallothionein-1G;Metallothionein-1E;Metallothionein-2 | -100 |
| MT1X | Metallothionein-1M;Metallothionein-1X;Metallothionein-1G;Metallothionein-1E;Metallothionein-2 | -100 |
| MT2A | Metallothionein-1M;Metallothionein-1X;Metallothionein-1G;Metallothionein-1E;Metallothionein-2 | -100 |
| MTA3 | Metastasis-associated protein MTA3 | -100 |
| MTCH1 | Mitochondrial carrier homolog 1 | -45 |
| MTERF3 | Transcription termination factor 3, mitochondrial | -100 |
| MTERF4 | Transcription termination factor 4, mitochondrial;mTERF domain-containing protein 2 processed | -100 |
| MTFR1L | Mitochondrial fission regulator 1-like | -100 |
| MTFR2 | Mitochondrial fission regulator 2 | -46 |
| MTG1 | Mitochondrial GTPase 1;Mitochondrial ribosome-associated GTPase 1 | -72 |
| MTHFD2 | Bifunctional methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase, mitochondrial;NAD-dependent methylenetetrahydrofolate dehydrogenase;Methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase | -42 |
| MTIF2 | Translation initiation factor IF-2, mitochondrial | -72 |
| MTIF3 | Translation initiation factor IF-3, mitochondrial | -49 |
| MTMR12 | Myotubularin-related protein 12 | -57 |
| MTMR9 | Myotubularin-related protein 9 | -100 |
| MT-ND3 | NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 3 | -100 |
| MTR | Methionine synthase | -69 |
| MTRF1L | Peptide chain release factor 1-like, mitochondrial | -38 |
| MTRR | Methionine synthase reductase | -47 |
| MUC1 | Mucin-1;Mucin-1 subunit alpha;Mucin-1 subunit beta | -100 |
| MVD | Diphosphomevalonate decarboxylase | -62 |
| MYADM | Myeloid-associated differentiation marker | -72 |
| MYB | Transcriptional activator Myb | -100 |
| MYH10 | Myosin-10 | -33 |
| MYL3 | Myosin light chain 3 | -62 |
| MYL4 | Myosin light chain 4 | -100 |
| MYLK | Myosin light chain kinase, smooth muscle;Myosin light chain kinase, smooth muscle, deglutamylated form | -85 |
| MYO19 | Unconventional myosin-XIX | -100 |
| MYO1E | Unconventional myosin-Ie | -100 |
| MYPOP | Myb-related transcription factor, partner of profilin | -100 |
| N4BP2 | NEDD4-binding protein 2 | -100 |
| N4BP2L2 | NEDD4-binding protein 2-like 2 | -100 |
| NABP2 | SOSS complex subunit B1 | -100 |
| NAF1 | H/ACA ribonucleoprotein complex non-core subunit NAF1 | -68 |
| NAGA | Alpha-N-acetylgalactosaminidase | -41 |
| NAGPA | N-acetylglucosamine-1-phosphodiester alpha-N-acetylglucosaminidase | -88 |
| NANP | N-acylneuraminate-9-phosphatase | -100 |
| NAP1L1 | Nucleosome assembly protein 1-like 1;Nucleosome assembly protein 1-like 1 | -32 |
| NARFL | Cytosolic Fe-S cluster assembly factor NARFL | -100 |
| NAT1 | Arylamine N-acetyltransferase 1 | -64 |
| NAT14 | N-acetyltransferase 14 | -36 |
| NCF1 | Neutrophil cytosol factor 1;Putative neutrophil cytosol factor 1B;Putative neutrophil cytosol factor 1C | -45 |

| | | |
|---|---|---|
| NCF1B | Neutrophil cytosol factor 1;Putative neutrophil cytosol factor 1B;Putative neutrophil cytosol factor 1C | -45 |
| NCF1C | Neutrophil cytosol factor 1;Putative neutrophil cytosol factor 1B;Putative neutrophil cytosol factor 1C | -45 |
| NCF2 | Neutrophil cytosol factor 2 | -100 |
| NCK2 | Cytoplasmic protein NCK2 | -47 |
| NCOA1 | Nuclear receptor coactivator 1 | -100 |
| NCOA6 | Nuclear receptor coactivator 6 | -100 |
| NCOA7 | Nuclear receptor coactivator 7 | -65 |
| NCOR2 | Nuclear receptor corepressor 2 | -67 |
| NCR3LG1 | Natural cytotoxicity triggering receptor 3 ligand 1 | -100 |
| NDFIP2 | NEDD4 family-interacting protein 2 | -100 |
| NDUFB1 | NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 1 | -99 |
| NDUFB11 | NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 11, mitochondrial | -37 |
| NDUFB4 | NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 4 | -52 |
| NDUFS7 | NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 7, mitochondrial | -48 |
| NDUFV3 | NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 3, mitochondrial | -40 |
| NEDD1 | Protein NEDD1 | -45 |
| NET1 | Neuroepithelial cell-transforming gene 1 protein | -100 |
| NEU1 | Sialidase-1 | -76 |
| NFATC2IP | NFATC2-interacting protein | -41 |
| NFIC | Nuclear factor 1 C-type | -46 |
| NFIX | Nuclear factor 1 X-type;Nuclear factor 1 | -100 |
| NHSL2 | NHS-like protein 2 | -100 |
| NIF3L1BP1 | THO complex subunit 7 homolog | -49 |
| NIN | Ninein | -100 |
| NIP7 | 60S ribosome subunit biogenesis protein NIP7 homolog | -32 |
| NIPA2 | Magnesium transporter NIPA2 | -100 |
| NIPSNAP1 | Protein NipSnap homolog 1 | -41 |
| NLRP2 | NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 2 | -100 |
| NOL7 | Nucleolar protein 7 | -49 |
| NOP10 | H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 3 | -41 |
| NOP14 | Nucleolar protein 14 | -32 |
| NPRL3 | Nitrogen permease regulator 3-like protein | -42 |
| NPTN | Neuroplastin | -43 |
| NQO1 | NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1 | -49 |
| NRD1 | Nardilysin | -46 |
| NRDE2 | Protein NRDE2 homolog | -100 |
| NRGN | Neurogranin;NEUG(55-78) | -100 |
| NRP1 | Neuropilin-1 | -100 |
| NSA2 | Ribosome biogenesis protein NSA2 homolog | -44 |
| NSMCE2 | E3 SUMO-protein ligase NSE2 | -100 |
| NSUN6 | Putative methyltransferase NSUN6 | -53 |
| NT5C3A | 5-nucleotidase;Cytosolic 5-nucleotidase 3A | -62 |
| NTHL1 | Endonuclease III-like protein 1 | -100 |
| NUDCD2 | NudC domain-containing protein 2 | -59 |
| NUDCD3 | NudC domain-containing protein 3 | -50 |
| NUDT12 | Peroxisomal NADH pyrophosphatase NUDT12 | -100 |

| | | |
|---|---|---|
| NUDT16 | U8 snoRNA-decapping enzyme | -100 |
| NUFIP1 | Nuclear fragile X mental retardation-interacting protein 1 | -100 |
| NUFIP2 | Nuclear fragile X mental retardation-interacting protein 2 | -48 |
| NUMB | Protein numb homolog | -56 |
| NUPL2 | Nucleoporin-like protein 2 | -47 |
| NXF3 | Nuclear RNA export factor 3 | -76 |
| NXN | Nucleoredoxin | -100 |
| NXT2 | NTF2-related export protein 2 | -44 |
| OAS2 | 2-5-oligoadenylate synthase 2 | -100 |
| OAT | Ornithine aminotransferase, mitochondrial;Ornithine aminotransferase, hepatic form;Ornithine aminotransferase, renal form | -42 |
| OGFOD3 | 2-oxoglutarate and iron-dependent oxygenase domain-containing protein 3 | -100 |
| OIP5 | Protein Mis18-beta;Protein yippee-like | -100 |
| OMA1 | Metalloendopeptidase OMA1, mitochondrial | -100 |
| ORC1 | Origin recognition complex subunit 1 | -99 |
| OSBPL3 | Oxysterol-binding protein-related protein 3 | -56 |
| OTUD5 | OTU domain-containing protein 5 | -100 |
| OXNAD1 | Oxidoreductase NAD-binding domain-containing protein 1 | -100 |
| P2RX4 | P2X purinoceptor;P2X purinoceptor 4 | -100 |
| PABPC1 | Polyadenylate-binding protein 1;Polyadenylate-binding protein | -34 |
| PACS1 | Phosphofurin acidic cluster sorting protein 1 | -100 |
| PACSIN3 | Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 3 | -100 |
| PAF1 | RNA polymerase II-associated factor 1 homolog | -33 |
| PAFAH1B1 | Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit alpha | -40 |
| PAGR1 | PAXIP1-associated glutamate-rich protein 1 | -100 |
| PAK1 | Serine/threonine-protein kinase PAK 1;Non-specific serine/threonine protein kinase | -40 |
| PAK4 | Serine/threonine-protein kinase PAK 4 | -100 |
| PAN3 | PAB-dependent poly(A)-specific ribonuclease subunit PAN3 | -42 |
| PANK2 | Pantothenate kinase 2, mitochondrial | -100 |
| PANX1 | Pannexin-1 | -100 |
| PAPD5 | Non-canonical poly(A) RNA polymerase PAPD5 | -44 |
| PAPOLG | Poly(A) polymerase gamma | -100 |
| PARP12 | Poly [ADP-ribose] polymerase 12 | -100 |
| PARVB | Beta-parvin | -75 |
| PASK | PAS domain-containing serine/threonine-protein kinase | -100 |
| PAX5 | Paired box protein Pax-5 | -100 |
| PBX1 | Pre-B-cell leukemia transcription factor 2;Pre-B-cell leukemia transcription factor 1 | -100 |
| PBX3 | Pre-B-cell leukemia transcription factor 3 | -100 |
| PCBD1 | Pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase | -66 |
| PCGF2 | Polycomb complex protein BMI-1;Polycomb group RING finger protein 2 | -100 |
| PCGF6 | Polycomb group RING finger protein 6 | -100 |
| PCIF1 | Phosphorylated CTD-interacting factor 1 | -52 |
| PCYOX1L | Prenylcysteine oxidase-like | -100 |
| PCYT1B | Choline-phosphate cytidylyltransferase A;Choline-phosphate cytidylyltransferase B | -50 |
| PDCD2 | Programmed cell death protein 2 | -32 |
| PDCD7 | Programmed cell death protein 7 | -100 |
| PDGFRB | Platelet-derived growth factor receptor beta | -100 |

| | | |
|---|---|---|
| PDPK1 | 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1;Putative 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 2 | -51 |
| PDPK2 | Putative 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 2;3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 | -100 |
| PDPK2P | 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1;Putative 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 2 | -50 |
| PDRG1 | p53 and DNA damage-regulated protein 1 | -43 |
| PDZD8 | PDZ domain-containing protein 8 | -42 |
| PEBP1 | Phosphatidylethanolamine-binding protein 1;Hippocampal cholinergic neurostimulating peptide | -32 |
| PECAM1 | Platelet endothelial cell adhesion molecule | -33 |
| PEO1 | Twinkle protein, mitochondrial | -48 |
| PER2 | Period circadian protein homolog 2 | -100 |
| PEX1 | Peroxisome biogenesis factor 1 | -99 |
| PEX12 | Peroxisome assembly protein 12 | -100 |
| PEX14 | Peroxisomal membrane protein PEX14 | -40 |
| PEX5 | Peroxisomal targeting signal 1 receptor | -100 |
| PFKM | ATP-dependent 6-phosphofructokinase, muscle type | -100 |
| PFN2 | Profilin;Profilin-2 | -100 |
| PGRMC1 | Membrane-associated progesterone receptor component 1 | -34 |
| PGS1 | CDP-diacylglycerol--glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase, mitochondrial | -80 |
| PHACTR2 | Phosphatase and actin regulator;Phosphatase and actin regulator 2 | -100 |
| PHF21A | PHD finger protein 21A | -100 |
| PHF23 | PHD finger protein 23 | -100 |
| PHF8 | Histone lysine demethylase PHF8 | -48 |
| PHKA1 | Phosphorylase b kinase regulatory subunit alpha, skeletal muscle isoform | -100 |
| PHKA2 | Phosphorylase b kinase regulatory subunit alpha, liver isoform | -100 |
| PHRF1 | PHD and RING finger domain-containing protein 1 | -57 |
| PIAS1 | E3 SUMO-protein ligase PIAS1 | -51 |
| PIAS4 | E3 SUMO-protein ligase PIAS4 | -100 |
| PICALM | Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein | -44 |
| PIEZO1 | Piezo-type mechanosensitive ion channel component 1 | -100 |
| PIGG | GPI ethanolamine phosphate transferase 2 | -100 |
| PIGN | GPI ethanolamine phosphate transferase 1 | -100 |
| PIGO | GPI ethanolamine phosphate transferase 3 | -100 |
| PIK3C2A | Phosphatidylinositol 4-phosphate 3-kinase C2 domain-containing subunit alpha | -100 |
| PIK3CA | Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform | -100 |
| PIK3CB | Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta isoform | -39 |
| PIK3R2 | Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit beta | -60 |
| PIKFYVE | 1-phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase | -100 |
| PIP5K1A | Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type-1 alpha | -100 |
| PIP5K1C | Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type-1 gamma | -32 |
| PIPSL | Putative PIP5K1A and PSMD4-like protein | -100 |
| PIR | Pirin | -44 |
| PISD | Phosphatidylserine decarboxylase proenzyme;Phosphatidylserine decarboxylase alpha chain;Phosphatidylserine decarboxylase beta chain | -100 |
| PITPNM2 | Membrane-associated phosphatidylinositol transfer protein 2 | -100 |
| PKD1L1 | Polycystic kidney disease protein 1-like 1 | -100 |
| PKLR | Pyruvate kinase PKLR | -89 |
| PKN3 | Serine/threonine-protein kinase N3 | -100 |

| | | |
|---|---|---|
| PKP3 | Plakophilin-3 | -100 |
| PLAU | Urokinase-type plasminogen activator;Urokinase-type plasminogen activator long chain A;Urokinase-type plasminogen activator short chain A;Urokinase-type plasminogen activator chain B | -100 |
| PLAUR | Urokinase plasminogen activator surface receptor | -47 |
| PLBD2 | Putative phospholipase B-like 2;Putative phospholipase B-like 2 32 kDa form;Putative phospholipase B-like 2 45 kDa form | -66 |
| PLEKHA5 | Pleckstrin homology domain-containing family A member 5 | -53 |
| PLEKHD1 | Pleckstrin homology domain-containing family D member 1 | -100 |
| PLEKHF2 | Pleckstrin homology domain-containing family F member 2 | -34 |
| PLEKHO2 | Pleckstrin homology domain-containing family O member 2 | -59 |
| PLS1 | Plastin-1 | -100 |
| PLSCR1 | Phospholipid scramblase 1 | -100 |
| PLXDC2 | Plexin domain-containing protein 2 | -100 |
| PLXNA1 | Plexin-A1 | -100 |
| PLXNB2 | Plexin-B2 | -54 |
| PMAIP1 | Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 | -100 |
| PNPLA2 | Patatin-like phospholipase domain-containing protein 2 | -63 |
| PNPLA6 | Neuropathy target esterase | -99 |
| PODXL | Podocalyxin | -100 |
| PODXL2 | Podocalyxin-like protein 2 | -100 |
| POGK | Pogo transposable element with KRAB domain | -100 |
| POGLUT1 | Protein O-glucosyltransferase 1 | -96 |
| POLG | DNA polymerase subunit gamma-1 | -34 |
| POLR2I | DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB9 | -100 |
| POLR3E | DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC5 | -41 |
| POLR3H | DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC8 | -100 |
| POLR3K | DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC10 | -100 |
| POM121 | Nuclear envelope pore membrane protein POM 121 | -31 |
| POMP | Proteasome maturation protein | -46 |
| POT1 | Protection of telomeres protein 1 | -100 |
| POTEE | POTE ankyrin domain family member E;POTE ankyrin domain family member I;Putative beta-actin-like protein 3;Putative beta-actin-like protein 3, N-terminally processed;POTE ankyrin domain family member J | -100 |
| POTEI | POTE ankyrin domain family member E;POTE ankyrin domain family member I;Putative beta-actin-like protein 3;Putative beta-actin-like protein 3, N-terminally processed;POTE ankyrin domain family member J | -100 |
| POTEJ | POTE ankyrin domain family member E;POTE ankyrin domain family member I;Putative beta-actin-like protein 3;Putative beta-actin-like protein 3, N-terminally processed;POTE ankyrin domain family member J | -100 |
| POTEKP | POTE ankyrin domain family member E;POTE ankyrin domain family member I;Putative beta-actin-like protein 3;Putative beta-actin-like protein 3, N-terminally processed;POTE ankyrin domain family member J | -100 |
| POU2F2 | POU domain, class 2, transcription factor 2;POU domain, class 2, transcription factor 3 | -32 |
| POU2F3 | POU domain, class 2, transcription factor 2;POU domain, class 2, transcription factor 3 | -32 |
| PPCDC | Phosphopantothenoylcysteine decarboxylase | -100 |
| PPFIBP2 | Liprin-beta-2 | -100 |
| PPHLN1 | Periphilin-1;Periphilin-1 | -52 |
| PPIAL4A | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A-like 4A/B/C;Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase;Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A-like 4D;Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A-like 4G | -100 |
| PPIAL4C | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A-like 4A/B/C;Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase;Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A-like 4D;Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A-like 4G | -100 |
| PPIAL4D | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A-like 4A/B/C;Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase;Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A-like 4D;Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A-like 4G | -100 |
| PPIAL4E | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A-like 4A/B/C;Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase;Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A-like 4D;Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A-like 4G | -100 |

| | | |
|---|---|---|
| PPIAL4G | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A-like 4A/B/C;Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase;Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A-like 4D;Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A-like 4G | -100 |
| PPM1E | Protein phosphatase 1E | -100 |
| PPP1R11 | Protein phosphatase 1 regulatory subunit 11 | -100 |
| PPP1R12C | Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12C | -35 |
| PPP1R13L | RelA-associated inhibitor | -100 |
| PPP1R14B | Protein phosphatase 1 regulatory subunit 14B | -40 |
| PPP1R27 | Protein phosphatase 1 regulatory subunit 27 | -81 |
| PPP1R35 | Protein phosphatase 1 regulatory subunit 35 | -100 |
| PPP2CA | Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform | -74 |
| PPP2R5C | Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit gamma isoform | -37 |
| PPP3CC | Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit gamma isoform;Serine/threonine-protein phosphatase | -44 |
| PQBP1 | Polyglutamine-binding protein 1 | -33 |
| PRC1 | Protein regulator of cytokinesis 1 | -100 |
| PRKAR2B | cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit | -77 |
| PRKCA | Protein kinase C alpha type | -73 |
| PRKCI | Protein kinase C iota type | -40 |
| PRKD3 | Serine/threonine-protein kinase D3 | -100 |
| PRKRIR | 52 kDa repressor of the inhibitor of the protein kinase | -100 |
| PROSER2 | Proline and serine-rich protein 2 | -35 |
| PRPF39 | Pre-mRNA-processing factor 39 | -61 |
| PRR12 | Proline-rich protein 12 | -100 |
| PRR3 | Proline-rich protein 3 | -100 |
| PRSS3 | Trypsin-3 | -100 |
| PSD4 | PH and SEC7 domain-containing protein 4 | -100 |
| PSEN1 | Presenilin;Presenilin-1;Presenilin-1 NTF subunit;Presenilin-1 CTF subunit;Presenilin-1 CTF12 | -100 |
| PSMG4 | Proteasome assembly chaperone 4 | -55 |
| PSTPIP2 | Proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 2 | -33 |
| PTAR1 | Protein prenyltransferase alpha subunit repeat-containing protein 1 | -100 |
| PTEN | Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase PTEN | -43 |
| PTGR2 | Prostaglandin reductase 2 | -100 |
| PTPN13 | Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 13 | -100 |
| PTPN18 | Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 18 | -100 |
| PTPN23 | Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 23 | -32 |
| PTPRC | Protein-tyrosine-phosphatase;Receptor-type tyrosine-protein phosphatase C | -40 |
| PTPRJ | Protein-tyrosine-phosphatase;Receptor-type tyrosine-protein phosphatase eta | -58 |
| PTRH1 | Probable peptidyl-tRNA hydrolase | -100 |
| PUS3 | tRNA pseudouridine(38/39) synthase;tRNA pseudouridine synthase | -100 |
| PUS7L | Pseudouridylate synthase 7 homolog-like protein | -59 |
| PWP2 | Periodic tryptophan protein 2 homolog | -33 |
| PWWP2A | PWWP domain-containing protein 2A | -100 |
| PXN | Paxillin | -100 |
| QSER1 | Glutamine and serine-rich protein 1 | -100 |
| QTRTD1 | Queuine tRNA-ribosyltransferase subunit QTRTD1 | -56 |
| R3HCC1 | R3H and coiled-coil domain-containing protein 1 | -100 |
| R3HCC1L | Coiled-coil domain-containing protein R3HCC1L | -53 |
| R3HDM1 | R3H domain-containing protein 1 | -100 |

| | | |
|---|---|---|
| RAB11FIP3 | Rab11 family-interacting protein 3 | -100 |
| RAB13 | Ras-related protein Rab-13 | -33 |
| RAB20 | Ras-related protein Rab-20 | -100 |
| RAB31 | Ras-related protein Rab-31 | -65 |
| RAB32 | Ras-related protein Rab-32 | -100 |
| RAB3A | Ras-related protein Rab-3A | -100 |
| RABEPK | Rab9 effector protein with kelch motifs | -34 |
| RABGEF1 | Rab5 GDP/GTP exchange factor | -39 |
| RABIF | Guanine nucleotide exchange factor MSS4 | -40 |
| RAD51 | DNA repair protein RAD51 homolog 1 | -100 |
| RAD51AP1 | RAD51-associated protein 1 | -100 |
| RAD51C | DNA repair protein RAD51 homolog 3 | -33 |
| RAD9A | Cell cycle checkpoint control protein RAD9A | -100 |
| RAF1 | RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase | -57 |
| RALA | Ras-related protein Ral-A | -39 |
| RALGAPA2 | Ral GTPase-activating protein subunit alpha-2 | -95 |
| RALGAPB | Ral GTPase-activating protein subunit beta | -38 |
| RANBP6 | Ran-binding protein 6 | -37 |
| RANGRF | Ran guanine nucleotide release factor | -47 |
| RAPGEF1 | Rap guanine nucleotide exchange factor 1 | -41 |
| RASA2 | Ras GTPase-activating protein 2 | -100 |
| RASA3 | Ras GTPase-activating protein 3 | -41 |
| RASSF5 | Ras association domain-containing protein 5 | -33 |
| RBM19 | Probable RNA-binding protein 19 | -34 |
| RBM24 | RNA-binding protein 38;RNA-binding protein 24 | -100 |
| RBM38 | RNA-binding protein 38;RNA-binding protein 24 | -100 |
| RBMS3 | RNA-binding motif, single-stranded-interacting protein 1;RNA-binding motif, single-stranded-interacting protein 3 | -56 |
| RCE1 | CAAX prenyl protease 2 | -100 |
| RCOR2 | REST corepressor 2 | -100 |
| RDH10 | Retinol dehydrogenase 10 | -100 |
| RECQL4 | ATP-dependent DNA helicase Q4 | -100 |
| REEP6 | Receptor expression-enhancing protein 6 | -51 |
| REPIN1 | Replication initiator 1 | -39 |
| RET | Proto-oncogene tyrosine-protein kinase receptor Ret;Soluble RET kinase fragment;Extracellular cell-membrane anchored RET cadherin 120 kDa fragment | -65 |
| REXO2 | Oligoribonuclease, mitochondrial;Oligoribonuclease, mitochondrial | -49 |
| REXO4 | RNA exonuclease 4 | -57 |
| RFK | Riboflavin kinase | -41 |
| RFX3 | Transcription factor RFX3 | -100 |
| RGS10 | Regulator of G-protein signaling 10 | -45 |
| RGS14 | Regulator of G-protein signaling 14;Regulator of G-protein signaling 14 | -55 |
| RHBDD1 | Rhomboid-related protein 4 | -100 |
| RHOXF2 | Rhox homeobox family member 2;Rhox homeobox family member 2B | -100 |
| RHOXF2B | Rhox homeobox family member 2;Rhox homeobox family member 2B | -100 |
| RILP | Rab-interacting lysosomal protein | -100 |
| RILPL2 | RILP-like protein 2 | -44 |
| RIN1 | Ras and Rab interactor 1 | -100 |

| | | |
|---|---|---|
| RIOK1 | Serine/threonine-protein kinase RIO1 | -34 |
| RIOK3 | Serine/threonine-protein kinase RIO3 | -62 |
| RIPK2 | Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2 | -39 |
| RLN3 | Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein 2 | -100 |
| RMI1 | RecQ-mediated genome instability protein 1 | -100 |
| RNASE2 | Non-secretory ribonuclease | -33 |
| RNASE7 | Ribonuclease 7 | -100 |
| RNASEH1 | Ribonuclease H1 | -100 |
| RNASET2 | Ribonuclease T2 | -31 |
| RNF113A | RING finger protein 113A | -56 |
| RNF13 | E3 ubiquitin-protein ligase RNF13 | -100 |
| RNF168 | E3 ubiquitin-protein ligase RNF168 | -100 |
| RNF181 | E3 ubiquitin-protein ligase RNF181 | -100 |
| RNF20 | E3 ubiquitin-protein ligase BRE1A | -34 |
| RNF219 | RING finger protein 219 | -100 |
| RNF220 | E3 ubiquitin-protein ligase RNF220 | -100 |
| RNF31 | E3 ubiquitin-protein ligase RNF31 | -59 |
| RNF34 | E3 ubiquitin-protein ligase RNF34 | -100 |
| RNF6 | E3 ubiquitin-protein ligase RNF6 | -100 |
| RNPC3 | RNA-binding protein 40 | -100 |
| RPE | Ribulose-phosphate 3-epimerase | -100 |
| RPL22L1 | 60S ribosomal protein L22-like 1 | -100 |
| RPL27 | 60S ribosomal protein L27 | -40 |
| RPL36A | 60S ribosomal protein L36a | -35 |
| RPL36A-HNRNPH2 | 60S ribosomal protein L36a | -35 |
| RPL37A | 60S ribosomal protein L37a | -33 |
| RPL4 | 60S ribosomal protein L4 | -32 |
| RPL7L1 | 60S ribosomal protein L7-like 1 | -33 |
| RPP21 | Ribonuclease P protein subunit p21 | -100 |
| RPP25 | Ribonuclease P protein subunit p25 | -75 |
| RPS14 | 40S ribosomal protein S14 | -37 |
| RPS29 | 40S ribosomal protein S29 | -70 |
| RPS6KB2 | Ribosomal protein S6 kinase beta-2 | -100 |
| RPUSD4 | RNA pseudouridylate synthase domain-containing protein 4 | -100 |
| RRAGA | Ras-related GTP-binding protein A | -45 |
| RRAGC | Ras-related GTP-binding protein C;Ras-related GTP-binding protein D | -64 |
| RRAGD | Ras-related GTP-binding protein C;Ras-related GTP-binding protein D | -64 |
| RRM2 | Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2 | -40 |
| RSBN1 | Round spermatid basic protein 1 | -40 |
| RSBN1L | Round spermatid basic protein 1-like protein | -66 |
| RSF1 | Remodeling and spacing factor 1 | -71 |
| RSL24D1 | Probable ribosome biogenesis protein RLP24 | -100 |
| RSRC2 | Arginine/serine-rich coiled-coil protein 2 | -100 |
| RTFDC1 | Protein RTF2 homolog | -35 |
| RTN2 | Reticulon;Reticulon-2 | -100 |
| RTTN | Rotatin | -68 |

| | | |
|---|---|---|
| RUNX1 | Runt-related transcription factor 1 | -31 |
| RUNX2 | Runt-related transcription factor 2 | -100 |
| RWDD1 | RWD domain-containing protein 1 | -100 |
| RWDD2B | RWD domain-containing protein 2B | -100 |
| RXRB | Retinoic acid receptor RXR-beta | -30 |
| S100A10 | Protein S100-A10 | -46 |
| S100A8 | Protein S100-A8;Protein S100-A8, N-terminally processed | -68 |
| S100A9 | Protein S100-A9 | -40 |
| S100P | Protein S100-P | -60 |
| SACS | Sacsin | -38 |
| SAMSN1 | SAM domain-containing protein SAMSN-1 | -57 |
| SAP30 | Histone deacetylase complex subunit SAP30 | -100 |
| SASH1 | SAM and SH3 domain-containing protein 1 | -100 |
| SASS6 | Spindle assembly abnormal protein 6 homolog | -100 |
| SATB2 | DNA-binding protein SATB2;DNA-binding protein SATB | -37 |
| SBDS | Ribosome maturation protein SBDS | -33 |
| SBF1 | Myotubularin-related protein 5 | -100 |
| SCAI | Protein SCAI | -100 |
| SCAMP1 | Secretory carrier-associated membrane protein 1 | -46 |
| SCARB1 | Scavenger receptor class B member 1 | -44 |
| SCD | Acyl-CoA desaturase | -89 |
| SCLY | Selenocysteine lyase | -36 |
| SCML2 | Sex comb on midleg-like protein 2 | -100 |
| SCO1 | Protein SCO1 homolog, mitochondrial | -36 |
| SDC2 | Syndecan;Syndecan-2 | -35 |
| SDCCAG8 | Serologically defined colon cancer antigen 8 | -100 |
| SDF2 | Stromal cell-derived factor 2 | -100 |
| SDF4 | 45 kDa calcium-binding protein | -60 |
| SDHAF2 | Succinate dehydrogenase assembly factor 2, mitochondrial | -100 |
| SDHC | Succinate dehydrogenase cytochrome b560 subunit, mitochondrial | -67 |
| SDSL | Serine dehydratase-like | -100 |
| SEC31B | Protein transport protein Sec31B | -100 |
| SEMA4D | Semaphorin-4D | -100 |
| SENP6 | Sentrin-specific protease 6 | -31 |
| SERGEF | Secretion-regulating guanine nucleotide exchange factor | -100 |
| SERPINA1 | Alpha-1-antitrypsin;Short peptide from AAT | -94 |
| SERPINA3 | Alpha-1-antichymotrypsin;Alpha-1-antichymotrypsin His-Pro-less | -100 |
| SETD7 | Histone-lysine N-methyltransferase SETD7 | -78 |
| SETX | Probable helicase senataxin | -100 |
| SFMBT2 | Scm-like with four MBT domains protein 2 | -46 |
| SFT2D2 | Vesicle transport protein SFT2B | -48 |
| SFXN2 | Sideroflexin-2 | -100 |
| SFXN5 | Sideroflexin-5 | -100 |
| SGMS1 | Phosphatidylcholine:ceramide cholinephosphotransferase 1 | -100 |
| SGOL2 | Shugoshin-like 2 | -100 |
| SHARPIN | Sharpin | -100 |

| | | |
|---|---|---|
| SHQ1 | Protein SHQ1 homolog | -69 |
| SIK3 | Serine/threonine-protein kinase SIK3 | -100 |
| SIKE1 | Suppressor of IKBKE 1 | -100 |
| SIL1 | Nucleotide exchange factor SIL1 | -100 |
| SIMC1 | SUMO-interacting motif-containing protein 1 | -100 |
| SIN3B | Paired amphipathic helix protein Sin3b | -100 |
| SIRPB1 | Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type substrate 1;Signal-regulatory protein beta-1 isoform 3 | -62 |
| SKA2 | Spindle and kinetochore-associated protein 2 | -100 |
| SKAP2 | Src kinase-associated phosphoprotein 2 | -50 |
| SKI | Ski oncogene | -100 |
| SKP2 | S-phase kinase-associated protein 2 | -100 |
| SLAIN2 | SLAIN motif-containing protein 2 | -86 |
| SLBP | Histone RNA hairpin-binding protein | -100 |
| SLC12A2 | Solute carrier family 12 member 2 | -100 |
| SLC12A6 | Solute carrier family 12 member 6 | -84 |
| SLC12A9 | Solute carrier family 12 member 9 | -52 |
| SLC19A1 | Folate transporter 1 | -69 |
| SLC20A2 | Sodium-dependent phosphate transporter 2 | -100 |
| SLC25A17 | Peroxisomal membrane protein PMP34 | -100 |
| SLC25A20 | Mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier protein | -90 |
| SLC25A46 | Solute carrier family 25 member 46 | -100 |
| SLC29A2 | Equilibrative nucleoside transporter 2 | -100 |
| SLC31A1 | High affinity copper uptake protein 1 | -100 |
| SLC33A1 | Acetyl-coenzyme A transporter 1 | -42 |
| SLC35A1 | CMP-sialic acid transporter | -100 |
| SLC35A2 | UDP-galactose translocator | -100 |
| SLC35B3 | Adenosine 3-phospho 5-phosphosulfate transporter 2 | -59 |
| SLC35B4 | UDP-xylose and UDP-N-acetylglucosamine transporter | -100 |
| SLC35F2 | Solute carrier family 35 member F2 | -100 |
| SLC37A4 | Glucose-6-phosphate translocase | -100 |
| SLC38A1 | Sodium-coupled neutral amino acid transporter 1 | -79 |
| SLC38A2 | Sodium-coupled neutral amino acid transporter 2 | -100 |
| SLC38A5 | Sodium-coupled neutral amino acid transporter 5 | -36 |
| SLC39A10 | Zinc transporter ZIP10 | -88 |
| SLC39A14 | Zinc transporter ZIP14 | -44 |
| SLC39A9 | Zinc transporter ZIP9 | -100 |
| SLC43A1 | Large neutral amino acids transporter small subunit 3 | -100 |
| SLC43A3 | Solute carrier family 43 member 3 | -100 |
| SLC4A1 | Band 3 anion transport protein | -100 |
| SLC4A2 | Anion exchange protein 2;Anion exchange protein | -100 |
| SLC7A1 | High affinity cationic amino acid transporter 1 | -49 |
| SLC7A11 | Cystine/glutamate transporter | -100 |
| SLC7A2 | Cationic amino acid transporter 2 | -100 |
| SLC9A3R2 | Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF2 | -100 |
| SLC9B2 | 3-hydroxybutyrate dehydrogenase type 2 | -100 |
| SLITRK5 | SLIT and NTRK-like protein 5;SLIT and NTRK-like protein 6 | -100 |

| | | |
|---|---|---|
| SLITRK6 | SLIT and NTRK-like protein 5;SLIT and NTRK-like protein 6 | -100 |
| SLMAP | Sarcolemmal membrane-associated protein | -31 |
| SLMO2 | Protein slowmo homolog 2 | -100 |
| SMAD4 | Mothers against decapentaplegic homolog;Mothers against decapentaplegic homolog 4 | -100 |
| SMARCA2 | Probable global transcription activator SNF2L2 | -44 |
| SMARCB1 | SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily B member 1 | -39 |
| SMARCD1 | SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily D member 1 | -41 |
| SMC6 | Structural maintenance of chromosomes protein 6 | -34 |
| SMDT1 | Essential MCU regulator, mitochondrial | -100 |
| SMEK2 | Serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 3B | -38 |
| SMG7 | Protein SMG7 | -77 |
| SMG9 | Protein SMG9 | -32 |
| SMIM8 | Small integral membrane protein 8 | -84 |
| SNAPC1 | snRNA-activating protein complex subunit 1 | -100 |
| SNAPIN | SNARE-associated protein Snapin | -41 |
| SNCA | Alpha-synuclein | -100 |
| SNIP1 | Smad nuclear-interacting protein 1 | -50 |
| SNRPB2 | U2 small nuclear ribonucleoprotein B | -40 |
| SNRPC | U1 small nuclear ribonucleoprotein C | -31 |
| SNRPD1 | Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1 | -54 |
| SNX12 | Sorting nexin-12 | -57 |
| SNX15 | Sorting nexin-15 | -100 |
| SNX18 | Sorting nexin-18 | -45 |
| SNX4 | Sorting nexin-4 | -100 |
| SON | Protein SON | -43 |
| SOS1 | Son of sevenless homolog 1 | -100 |
| SOX4 | Transcription factor SOX-4 | -100 |
| SP1 | Transcription factor Sp1 | -100 |
| SP110 | Sp110 nuclear body protein | -94 |
| SPAG5 | Sperm-associated antigen 5 | -47 |
| SPATS2 | Spermatogenesis-associated serine-rich protein 2 | -100 |
| SPC24 | Kinetochore protein Spc24 | -55 |
| SPCS1 | Signal peptidase complex subunit 1 | -38 |
| SPECC1L | Cytospin-A | -100 |
| SPECC1L-ADORA2A | Cytospin-A | -100 |
| SPIDR | DNA repair-scaffolding protein | -100 |
| SPN | Leukosialin | -52 |
| SPRYD3 | SPRY domain-containing protein 3 | -100 |
| SQLE | Squalene monooxygenase | -100 |
| SRC | Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src | -100 |
| SRGN | Serglycin | -97 |
| SS18L2 | SS18-like protein 2 | -100 |
| SSBP3 | Single-stranded DNA-binding protein 3 | -100 |
| SSR3 | Translocon-associated protein subunit gamma | -55 |
| ST3GAL4 | CMP-N-acetylneuraminate-beta-galactosamide-alpha-2,3-sialyltransferase 4 | -100 |
| STARD3 | StAR-related lipid transfer protein 3 | -100 |

| | | |
|---|---|---|
| STAT1 | Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta;Signal transducer and activator of transcription | -33 |
| STK11 | Serine/threonine-protein kinase STK11 | -100 |
| STK3 | Serine/threonine-protein kinase 3;Serine/threonine-protein kinase 3 36kDa subunit;Serine/threonine-protein kinase 3 20kDa subunit | -47 |
| STRA13 | Centromere protein X | -100 |
| STRIP1 | Striatin-interacting protein 1 | -34 |
| STRN4 | Striatin-4 | -57 |
| STX17 | Syntaxin-17 | -64 |
| STX8 | Syntaxin-8 | -77 |
| SUDS3 | Sin3 histone deacetylase corepressor complex component SDS3 | -30 |
| SUMO2 | Small ubiquitin-related modifier 2 | -47 |
| SUPT3H | Transcription initiation protein SPT3 homolog | -100 |
| SYF2 | Pre-mRNA-splicing factor SYF2 | -43 |
| SYNE3 | Nesprin-3 | -58 |
| SYNPO2 | Synaptopodin-2 | -41 |
| SYNRG | Synergin gamma | -32 |
| SZT2 | Protein SZT2 | -100 |
| TACC2 | Transforming acidic coiled-coil-containing protein 2 | -100 |
| TACC3 | Transforming acidic coiled-coil-containing protein 3 | -34 |
| TADA1 | Transcriptional adapter 1 | -100 |
| TADA2A | Transcriptional adapter 2-alpha | -100 |
| TADA2B | Transcriptional adapter 2-beta | -100 |
| TADA2L | Transcriptional adapter 2-alpha | -100 |
| TADA3 | Transcriptional adapter 3 | -100 |
| TAF1 | Transcription initiation factor TFIID subunit 1;Transcription initiation factor TFIID subunit 1-like | -100 |
| TAF1L | Transcription initiation factor TFIID subunit 1;Transcription initiation factor TFIID subunit 1-like | -100 |
| TAF2 | Transcription initiation factor TFIID subunit 2 | -43 |
| TAF7 | Transcription initiation factor TFIID subunit 7 | -62 |
| TAF8 | Transcription initiation factor TFIID subunit 8 | -60 |
| TAF9B | Transcription initiation factor TFIID subunit 9B | -64 |
| TANC1 | Protein TANC1 | -100 |
| TANGO6 | Transport and Golgi organization protein 6 homolog | -100 |
| TANK | TRAF family member-associated NF-kappa-B activator | -39 |
| TAPBPL | Tapasin-related protein | -100 |
| TAPT1 | Transmembrane anterior posterior transformation protein 1 homolog | -100 |
| TARBP2 | RISC-loading complex subunit TARBP2 | -100 |
| TARSL2 | Probable threonine--tRNA ligase 2, cytoplasmic | -100 |
| TAX1BP1 | Tax1-binding protein 1 | -56 |
| TAX1BP3 | Tax1-binding protein 3 | -100 |
| TBC1D20 | TBC1 domain family member 20 | -100 |
| TBC1D22A | TBC1 domain family member 22A | -35 |
| TBC1D24 | TBC1 domain family member 24 | -77 |
| TBL1X | F-box-like/WD repeat-containing protein TBL1X;F-box-like/WD repeat-containing protein TBL1Y | -100 |
| TBL1Y | F-box-like/WD repeat-containing protein TBL1X;F-box-like/WD repeat-containing protein TBL1Y | -100 |
| TBP | TATA-box-binding protein;TATA box-binding protein-like protein 2 | -100 |
| TBPL1 | TATA box-binding protein-like protein 1 | -100 |

| | | |
|---|---|---|
| TBPL2 | TATA-box-binding protein;TATA box-binding protein-like protein 2 | -100 |
| TCEAL1 | Transcription elongation factor A protein-like 1 | -100 |
| TCEB1 | Transcription elongation factor B polypeptide 1 | -38 |
| TCF12 | Transcription factor 12 | -51 |
| TCF20 | Transcription factor 20 | -39 |
| TCF25 | Transcription factor 25 | -64 |
| TCF3 | Transcription factor E2-alpha | -41 |
| TCHH | Trichohyalin | -100 |
| TDP1 | Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 | -40 |
| TEFM | Transcription elongation factor, mitochondrial | -100 |
| TEP1 | Telomerase protein component 1 | -100 |
| TERF1 | Telomeric repeat-binding factor 1 | -100 |
| TESC | Calcineurin B homologous protein 3 | -60 |
| TEX30 | Testis-expressed sequence 30 protein | -100 |
| TFAM | Transcription factor A, mitochondrial | -39 |
| TFAP4 | Transcription factor AP-4 | -100 |
| TFB2M | Dimethyladenosine transferase 2, mitochondrial | -35 |
| TFEB | Transcription factor EB | -44 |
| TGFB1 | Transforming growth factor beta-1;Latency-associated peptide | -42 |
| TGFBR1 | Receptor protein serine/threonine kinase;TGF-beta receptor type-1 | -100 |
| TGFBRAP1 | Transforming growth factor-beta receptor-associated protein 1 | -72 |
| TGM2 | Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2 | -100 |
| THEMIS2 | Protein THEMIS2 | -63 |
| THG1L | Probable tRNA(His) guanylyltransferase | -39 |
| THOC7 | THO complex subunit 7 homolog | -49 |
| THTPA | Thiamine-triphosphatase | -100 |
| TIMM10 | Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim10 | -65 |
| TIMM21 | Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim21 | -84 |
| TIMM23 | Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim23;Putative mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim23B | -69 |
| TIMM23B | Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim23;Putative mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim23B | -69 |
| TIMM8B | Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim8 B | -57 |
| TIPIN | TIMELESS-interacting protein | -98 |
| TJAP1 | Tight junction-associated protein 1 | -69 |
| TK2 | Thymidine kinase 2, mitochondrial | -100 |
| TLE1 | Transducin-like enhancer protein 4;Transducin-like enhancer protein 1 | -61 |
| TLE4 | Transducin-like enhancer protein 4;Transducin-like enhancer protein 1 | -61 |
| TMBIM6 | Bax inhibitor 1 | -59 |
| TMED1 | Transmembrane emp24 domain-containing protein 1 | -42 |
| TMED10 | Transmembrane emp24 domain-containing protein 10 | -31 |
| TMEM102 | Transmembrane protein 102 | -100 |
| TMEM106B | Transmembrane protein 106B | -86 |
| TMEM128 | Transmembrane protein 128 | -41 |
| TMEM165 | Transmembrane protein 165 | -50 |
| TMEM167A | Protein kish-A | -100 |
| TMEM175 | Transmembrane protein 175 | -100 |
| TMEM179B | Transmembrane protein 179B | -100 |

| | | |
|---|---|---|
| TMEM192 | Transmembrane protein 192 | -48 |
| TMEM194A | Transmembrane protein 194A | -100 |
| TMEM201 | Transmembrane protein 201 | -80 |
| TMEM205 | Transmembrane protein 205 | -43 |
| TMEM222 | Transmembrane protein 222 | -52 |
| TMEM223 | Transmembrane protein 223 | -57 |
| TMEM23 | Phosphatidylcholine:ceramide cholinephosphotransferase 1 | -100 |
| TMEM261 | Transmembrane protein 261 | -87 |
| TMEM263 | Transmembrane protein 263 | -100 |
| TMEM30A | Cell cycle control protein 50A | -37 |
| TMEM38B | Trimeric intracellular cation channel type B | -48 |
| TMEM41A | Transmembrane protein 41A | -62 |
| TMEM49 | Vacuole membrane protein 1 | -64 |
| TMEM55B | Type 1 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 4-phosphatase | -100 |
| TMEM68 | Transmembrane protein 68 | -100 |
| TMEM91 | Mitochondrial Rho GTPase;Mitochondrial Rho GTPase 1 | -100 |
| TMF1 | TATA element modulatory factor | -54 |
| TMSB4X | Thymosin beta-4;Hematopoietic system regulatory peptide | -59 |
| TMUB1 | Transmembrane and ubiquitin-like domain-containing protein 1 | -100 |
| TNFRSF10A | Tumor necrosis factor receptor superfamily member 10A | -100 |
| TNKS1BP1 | 182 kDa tankyrase-1-binding protein | -55 |
| TNRC6A | Trinucleotide repeat-containing gene 6A protein | -100 |
| TNRC6C | Trinucleotide repeat-containing gene 6C protein | -100 |
| TOMM6 | Mitochondrial import receptor subunit TOM6 homolog | -100 |
| TOPORS | E3 ubiquitin-protein ligase Topors | -100 |
| TOR1B | Torsin-1B | -61 |
| TOR4A | Torsin-4A | -100 |
| TOX | TOX high mobility group box family member 4;Thymocyte selection-associated high mobility group box protein TOX;TOX high mobility group box family member 3 | -57 |
| TOX3 | TOX high mobility group box family member 4;Thymocyte selection-associated high mobility group box protein TOX;TOX high mobility group box family member 3 | -57 |
| TP53I11 | Tumor protein p53-inducible protein 11 | -100 |
| TPM1 | Tropomyosin alpha-1 chain | -98 |
| TPM2 | Tropomyosin beta chain | -99 |
| TPM4 | Tropomyosin alpha-4 chain | -37 |
| TPST2 | Protein-tyrosine sulfotransferase 2 | -100 |
| TPT1 | Translationally-controlled tumor protein | -37 |
| TPX2 | Targeting protein for Xklp2 | -37 |
| TRA2B | Transformer-2 protein homolog beta | -39 |
| TRAF3IP1 | TRAF3-interacting protein 1 | -100 |
| TRAFD1 | TRAF-type zinc finger domain-containing protein 1 | -42 |
| TRAPPC11 | Trafficking protein particle complex subunit 11 | -41 |
| TRAPPC2 | Trafficking protein particle complex subunit 2B;Trafficking protein particle complex subunit 2 | -32 |
| TRAPPC2B | Trafficking protein particle complex subunit 2B;Trafficking protein particle complex subunit 2 | -32 |
| TRAPPC2L | Trafficking protein particle complex subunit 2-like protein | -100 |
| TRDMT1 | tRNA (cytosine(38)-C(5))-methyltransferase | -100 |
| TRERF1 | Transcriptional-regulating factor 1 | -100 |
| TRIAP1 | TP53-regulated inhibitor of apoptosis 1 | -100 |

| | | |
|---|---|---|
| TRIM13 | E3 ubiquitin-protein ligase TRIM13 | -100 |
| TRIM26 | Tripartite motif-containing protein 26 | -44 |
| TRIM39-RPP21 | Ribonuclease P protein subunit p21 | -100 |
| TRIM5 | Tripartite motif-containing protein 5 | -100 |
| TRIP4 | Activating signal cointegrator 1 | -43 |
| TRIP6 | Thyroid receptor-interacting protein 6 | -41 |
| TRIT1 | tRNA dimethylallyltransferase, mitochondrial | -100 |
| TRMT10C | Mitochondrial ribonuclease P protein 1 | -36 |
| TRNAU1AP | tRNA selenocysteine 1-associated protein 1 | -100 |
| TRPM2 | Transient receptor potential cation channel subfamily M member 2 | -100 |
| TRUB2 | Probable tRNA pseudouridine synthase 2 | -100 |
| TSC1 | Hamartin | -100 |
| TSEN15 | tRNA-splicing endonuclease subunit Sen15 | -59 |
| TSEN2 | tRNA-splicing endonuclease subunit Sen2 | -100 |
| TSFM | Elongation factor Ts, mitochondrial;Elongation factor Ts | -38 |
| TSKS | Testis-specific serine kinase substrate | -87 |
| TSPAN31 | Tetraspanin-31 | -100 |
| TTC13 | Tetratricopeptide repeat protein 13 | -100 |
| TTC17 | Tetratricopeptide repeat protein 17 | -71 |
| TTC28 | Tetratricopeptide repeat protein 28 | -100 |
| TTC39C | Tetratricopeptide repeat protein 39C | -67 |
| TTC4 | Tetratricopeptide repeat protein 4 | -75 |
| TTK | Dual specificity protein kinase TTK | -44 |
| TTYH3 | Protein tweety homolog 3;Protein tweety homolog | -100 |
| TUBA3C | Tubulin alpha-3C/D chain | -60 |
| TUBA4A | Tubulin alpha-4A chain | -32 |
| TUBB1 | Tubulin beta-1 chain | -100 |
| TUBB3 | Tubulin beta-3 chain | -86 |
| TUBGCP4 | Gamma-tubulin complex component 4 | -34 |
| TUBGCP6 | Gamma-tubulin complex component 6 | -67 |
| TUT1 | Speckle targeted PIP5K1A-regulated poly(A) polymerase | -100 |
| TVP23B | Golgi apparatus membrane protein TVP23 homolog;Golgi apparatus membrane protein TVP23 homolog C;Golgi apparatus membrane protein TVP23 homolog B | -100 |
| TVP23C | Golgi apparatus membrane protein TVP23 homolog;Golgi apparatus membrane protein TVP23 homolog C;Golgi apparatus membrane protein TVP23 homolog B | -100 |
| TVP23C-CDRT4 | Golgi apparatus membrane protein TVP23 homolog;Golgi apparatus membrane protein TVP23 homolog C;Golgi apparatus membrane protein TVP23 homolog B | -100 |
| TWISTNB | DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA43 | -30 |
| TXLNG | Gamma-taxilin | -56 |
| TXNRD2 | Thioredoxin reductase 2, mitochondrial | -56 |
| TYK2 | Tyrosine-protein kinase;Non-receptor tyrosine-protein kinase TYK2 | -36 |
| TYMS | Thymidylate synthase | -37 |
| TYROBP | TYRO protein tyrosine kinase-binding protein | -100 |
| TYW1 | S-adenosyl-L-methionine-dependent tRNA 4-demethylwyosine synthase | -46 |
| U2AF2 | Splicing factor U2AF 65 kDa subunit | -33 |
| UACA | Uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats | -71 |
| UBAC1 | Ubiquitin-associated domain-containing protein 1 | -52 |
| UBAC2 | Ubiquitin-associated domain-containing protein 2 | -35 |
| UBAP1 | Ubiquitin-associated protein 1 | -100 |

| | | |
|---|---|---|
| UBE2A | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 A | -43 |
| UBE2C | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 C | -36 |
| UBE2D3 | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D3 | -48 |
| UBE2G2 | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 G2 | -100 |
| UBE2J1 | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 J1 | -97 |
| UBE2J2 | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 J2 | -100 |
| UBE2Q1 | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 Q1 | -32 |
| UBE2Q2 | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 Q2 | -100 |
| UBE2S | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 S | -44 |
| UBE2T | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 T | -38 |
| UBE3B | Ubiquitin-protein ligase E3B | -43 |
| UBL5 | Ubiquitin-like protein 5 | -100 |
| UBL7 | Ubiquitin-like protein 7 | -73 |
| UBN2 | Ubinuclein-2 | -100 |
| UBR2 | E3 ubiquitin-protein ligase UBR2 | -68 |
| UBR3 | E3 ubiquitin-protein ligase UBR3 | -100 |
| UBXN8 | UBX domain-containing protein 8 | -100 |
| UCK2 | Uridine-cytidine kinase 2 | -31 |
| UCKL1 | Uridine-cytidine kinase-like 1 | -100 |
| UEVLD | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 3 | -100 |
| UFC1 | Ubiquitin-fold modifier-conjugating enzyme 1 | -34 |
| UGDH | UDP-glucose 6-dehydrogenase | -30 |
| UHRF1BP1 | UHRF1-binding protein 1 | -100 |
| UHRF1BP1L | UHRF1-binding protein 1-like | -35 |
| UIMC1 | BRCA1-A complex subunit RAP80 | -100 |
| ULK3 | Serine/threonine-protein kinase ULK3 | -100 |
| UNC93B1 | Protein unc-93 homolog B1 | -58 |
| UQCC1 | Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex assembly factor 1 | -31 |
| UQCR11 | Cytochrome b-c1 complex subunit 10 | -100 |
| UQCRH | Cytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial | -47 |
| URM1 | Ubiquitin-related modifier 1 | -100 |
| USMG5 | Up-regulated during skeletal muscle growth protein 5 | -33 |
| USP1 | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1 | -30 |
| USP22 | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 22;Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 27 | -48 |
| USP25 | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 25 | -100 |
| USP27X | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 22;Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 27 | -48 |
| USP28 | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 28;Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase | -100 |
| USP3 | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase;Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 3 | -51 |
| USP32 | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 32;Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase | -35 |
| USP34 | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 34 | -76 |
| USP4 | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 4;Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase | -42 |
| UTP23 | rRNA-processing protein UTP23 homolog | -53 |
| UTY | Lysine-specific demethylase 6A;Histone demethylase UTY | -100 |
| VAMP3 | Vesicle-associated membrane protein 3 | -40 |
| VAPA | Vesicle-associated membrane protein-associated protein A;Vesicle-associated membrane protein-associated protein A | -31 |
| VCPIP1 | Deubiquitinating protein VCIP135 | -34 |

| | | |
|---|---|---|
| VCPKMT | Protein-lysine methyltransferase METTL21D | -100 |
| VHL | Von Hippel-Lindau disease tumor suppressor | -100 |
| VIM | Vimentin | -31 |
| VLDLR | Very low-density lipoprotein receptor | -100 |
| VMP1 | Vacuole membrane protein 1 | -64 |
| VPS13A | Vacuolar protein sorting-associated protein 13A;Vacuolar protein sorting-associated protein 13A | -65 |
| VPS13D | Vacuolar protein sorting-associated protein 13D | -100 |
| VPS37A | Vacuolar protein sorting-associated protein 37A | -39 |
| VPS37B | Vacuolar protein sorting-associated protein 37B | -37 |
| VPS41 | Vacuolar protein sorting-associated protein 41 homolog | -100 |
| VPS52 | Vacuolar protein sorting-associated protein 52 homolog | -31 |
| VRK3 | Inactive serine/threonine-protein kinase VRK3 | -53 |
| WARS2 | Tryptophan--tRNA ligase, mitochondrial | -84 |
| WBP4 | WW domain-binding protein 4 | -100 |
| WDR13 | WD repeat-containing protein 13 | -100 |
| WDR24 | WD repeat-containing protein 24 | -100 |
| WDR41 | WD repeat-containing protein 41 | -39 |
| WDR62 | WD repeat-containing protein 62 | -100 |
| WDR73 | WD repeat-containing protein 73 | -100 |
| WDR83 | WD repeat domain-containing protein 83 | -100 |
| WDSUB1 | WD repeat, SAM and U-box domain-containing protein 1 | -43 |
| WEE1 | Wee1-like protein kinase | -100 |
| WIPI2 | WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 2 | -30 |
| WNK4 | Serine/threonine-protein kinase WNK4 | -100 |
| WWP2 | NEDD4-like E3 ubiquitin-protein ligase WWP2 | -31 |
| XAGE1A | X antigen family member 1 | -100 |
| XIAP | E3 ubiquitin-protein ligase XIAP | -100 |
| XPR1 | Xenotropic and polytropic retrovirus receptor 1 | -100 |
| XYLB | Xylulose kinase | -100 |
| YTHDF1 | YTH domain-containing family protein 1 | -80 |
| YTHDF3 | YTH domain-containing family protein 3 | -34 |
| YY1AP1 | YY1-associated protein 1 | -100 |
| ZBTB2 | Zinc finger and BTB domain-containing protein 2 | -77 |
| ZBTB40 | Zinc finger and BTB domain-containing protein 40 | -100 |
| ZBTB7A | Zinc finger and BTB domain-containing protein 7A | -65 |
| ZC2HC1B | Protein LTV1 homolog | -52 |
| ZC3H7B | Zinc finger CCCH domain-containing protein 7B | -69 |
| ZC3H8 | Zinc finger CCCH domain-containing protein 8 | -93 |
| ZCCHC11 | Terminal uridylyltransferase 4 | -100 |
| ZCCHC6 | Terminal uridylyltransferase 7 | -67 |
| ZCCHC7 | Zinc finger CCHC domain-containing protein 7 | -63 |
| ZDHHC5 | Palmitoyltransferase ZDHHC5 | -68 |
| ZEB2 | Zinc finger E-box-binding homeobox 2 | -30 |
| ZFAND6 | AN1-type zinc finger protein 6 | -100 |
| ZFP14 | Zinc finger protein 30;Zinc finger protein 461;Zinc finger protein 30 homolog;Zinc finger protein 82 homolog;Zinc finger protein 14 homolog | -100 |
| ZFP3 | Zinc finger protein 3 homolog | -100 |

| | | |
|---|---|---|
| ZFP30 | Zinc finger protein 30;Zinc finger protein 461;Zinc finger protein 30 homolog;Zinc finger protein 82 homolog;Zinc finger protein 14 homolog | -100 |
| ZFP36L2 | Zinc finger protein 36, C3H1 type-like 2 | -49 |
| ZFP82 | Zinc finger protein 30;Zinc finger protein 461;Zinc finger protein 30 homolog;Zinc finger protein 82 homolog;Zinc finger protein 14 homolog | -100 |
| ZFPL1 | Zinc finger protein-like 1 | -69 |
| ZHX1 | Zinc fingers and homeoboxes protein 1 | -100 |
| ZHX2 | Zinc fingers and homeoboxes protein 2 | -100 |
| ZHX3 | Zinc fingers and homeoboxes protein 3 | -100 |
| ZMYM6NB | Uncharacterized protein ZMYM6NB | -100 |
| ZMYND11 | Zinc finger MYND domain-containing protein 11 | -100 |
| ZNF121 | Zinc finger protein 121 | -44 |
| ZNF146 | Zinc finger protein OZF | -100 |
| ZNF217 | Zinc finger protein 217 | -100 |
| ZNF22 | Zinc finger protein 22 | -31 |
| ZNF24 | Zinc finger protein 24 | -100 |
| ZNF28 | Zinc finger protein 28;Zinc finger protein 468;Zinc finger protein 888 | -66 |
| ZNF280C | Zinc finger protein 280C | -31 |
| ZNF281 | Zinc finger protein 281 | -51 |
| ZNF30 | Zinc finger protein 30;Zinc finger protein 461;Zinc finger protein 30 homolog;Zinc finger protein 82 homolog;Zinc finger protein 14 homolog | -100 |
| ZNF330 | Zinc finger protein 330 | -70 |
| ZNF35 | Zinc finger protein 35 | -100 |
| ZNF384 | Zinc finger protein 384 | -35 |
| ZNF407 | Zinc finger protein 407 | -100 |
| ZNF428 | Zinc finger protein 428 | -48 |
| ZNF461 | Zinc finger protein 30;Zinc finger protein 461;Zinc finger protein 30 homolog;Zinc finger protein 82 homolog;Zinc finger protein 14 homolog | -100 |
| ZNF468 | Zinc finger protein 28;Zinc finger protein 468;Zinc finger protein 888 | -66 |
| ZNF521 | Zinc finger protein 521 | -100 |
| ZNF524 | Zinc finger protein 524 | -100 |
| ZNF556 | Zinc finger protein 556 | -100 |
| ZNF600 | Zinc finger protein 28;Zinc finger protein 468;Zinc finger protein 888 | -66 |
| ZNF609 | Zinc finger protein 609 | -100 |
| ZNF629 | Zinc finger protein 629 | -100 |
| ZNF638 | Zinc finger protein 638 | -35 |
| ZNF687 | Zinc finger protein 687 | -50 |
| ZNF787 | | -100 |
| ZNF800 | Zinc finger protein 800 | -56 |
| ZNF888 | Zinc finger protein 28;Zinc finger protein 468;Zinc finger protein 888 | -66 |
| ZNFX1 | NFX1-type zinc finger-containing protein 1 | -90 |
| ZNHIT3 | Zinc finger HIT domain-containing protein 3 | -100 |
| ZNHIT6 | Box C/D snoRNA protein 1 | -44 |
| ZNRF2 | E3 ubiquitin-protein ligase ZNRF2 | -100 |
| ZWINT | ZW10 interactor | -55 |
| ZYG11B | Protein zyg-11 homolog B | -61 |
| ZZEF1 | Zinc finger ZZ-type and EF-hand domain-containing protein 1 | -51 |

## 2. Liste de protéines augmentées avec le siFLT3 (>30%)

| Gènes | Protéines | Pourcentage d'augmentation |
|---|---|---|
| AARS2 | Alanine--tRNA ligase, mitochondrial | 37 |
| ABCB7 | ATP-binding cassette sub-family B member 7, mitochondrial | 51 |
| ABCD1 | ATP-binding cassette sub-family D member 1 | 115 |
| ABHD11 | Alpha/beta hydrolase domain-containing protein 11 | 67 |
| ABRACL | Costars family protein ABRACL | 53 |
| ACAD9 | Acyl-CoA dehydrogenase family member 9, mitochondrial | 45 |
| ACADM | Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial | 37 |
| ACADS | Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial | 96 |
| ACBD6 | Acyl-CoA-binding domain-containing protein 6 | 97 |
| ACO1 | Cytoplasmic aconitate hydratase | 39 |
| ACOT1 | Acyl-coenzyme A thioesterase 1;Acyl-coenzyme A thioesterase 2, mitochondrial | 84 |
| ACOT2 | Acyl-coenzyme A thioesterase 1;Acyl-coenzyme A thioesterase 2, mitochondrial | 84 |
| ACSS1 | Acetyl-coenzyme A synthetase 2-like, mitochondrial | 82 |
| ACSS2 | Acetyl-coenzyme A synthetase, cytoplasmic | 49 |
| ACTBL2 | Beta-actin-like protein 2 | 1669 |
| ADA | Adenosine deaminase | 82 |
| ADAM17 | Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17 | 76 |
| ADD3 | Gamma-adducin | 48 |
| ADRM1 | Proteasomal ubiquitin receptor ADRM1 | 55 |
| AGAP3 | Arf-GAP with GTPase, ANK repeat and PH domain-containing protein 3 | 106 |
| AGGF1 | Angiogenic factor with G patch and FHA domains 1 | 1062 |
| AGPAT1 | 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase alpha | 55 |
| AGPAT6 | Glycerol-3-phosphate acyltransferase 4 | 34 |
| AIF1 | Allograft inflammatory factor 1 | 30 |
| ALAD | Delta-aminolevulinic acid dehydratase | 41 |
| ALCAM | CD166 antigen | 93 |
| ALDH1A3 | Aldehyde dehydrogenase family 1 member A3 | 63 |
| ALDH1L2 | Mitochondrial 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase | 53 |
| ALG11 | GDP-Man:Man(3)GlcNAc(2)-PP-Dol alpha-1,2-mannosyltransferase | 201 |
| ALG5 | Dolichyl-phosphate beta-glucosyltransferase | 52 |
| ALG8 | Probable dolichyl pyrophosphate Glc1Man9GlcNAc2 alpha-1,3-glucosyltransferase | 277 |
| ALKBH5 | RNA demethylase ALKBH5 | 52 |
| ANK1 | Ankyrin-1 | 191 |
| ANKRD13A | Ankyrin repeat domain-containing protein 13A | 41 |
| ANXA5 | Annexin A5;Annexin | 42 |
| AP1G1 | AP-1 complex subunit gamma-1 | 31 |
| AP2A2 | AP-2 complex subunit alpha-2 | 34 |
| AP2M1 | AP-2 complex subunit mu | 43 |
| AP2S1 | AP-2 complex subunit sigma | 59 |
| AP4E1 | AP-4 complex subunit epsilon-1 | 139 |
| APOC3 | Apolipoprotein C-III | 77 |
| APOOL | MICOS complex subunit MIC27 | 80 |

| | | |
|---|---|---|
| ARF4 | ADP-ribosylation factor 4 | 79 |
| ARFGAP3 | ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 3 | 64 |
| ARG1 | Arginase-1 | 176 |
| ARGLU1 | Arginine and glutamate-rich protein 1 | 56 |
| ARHGAP1 | Rho GTPase-activating protein 1 | 37 |
| ARHGAP18 | Rho GTPase-activating protein 18 | 67 |
| ARHGAP27 | Rho GTPase-activating protein 27 | 65 |
| ARHGAP9 | Rho GTPase-activating protein 9 | 40 |
| ARID1B | AT-rich interactive domain-containing protein 1B | 34 |
| ARID3A | AT-rich interactive domain-containing protein 3A | 50 |
| ARID4B | AT-rich interactive domain-containing protein 4B | 108 |
| ARL8B | ADP-ribosylation factor-like protein 8B | 148 |
| ARMT1 | Protein-glutamate O-methyltransferase | 69 |
| ASL | Argininosuccinate lyase | 118 |
| ASUN | Protein asunder homolog | 69 |
| ATG13 | Autophagy-related protein 13 | 48 |
| ATG4B | Cysteine protease ATG4B | 62 |
| ATP5J2-PTCD1 | Pentatricopeptide repeat-containing protein 1, mitochondrial | 64 |
| ATP6AP2 | Renin receptor | 50 |
| ATP6V0A1 | V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 1;V-type proton ATPase subunit a | 524 |
| ATP6V0A2 | V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 2;V-type proton ATPase subunit a | 50 |
| ATP6V0C | V-type proton ATPase 16 kDa proteolipid subunit | 89 |
| ATP6V1A | V-type proton ATPase catalytic subunit A | 37 |
| AUP1 | Ancient ubiquitous protein 1 | 94 |
| AZGP1 | Zinc-alpha-2-glycoprotein | 298 |
| BAG3 | BAG family molecular chaperone regulator 3 | 40 |
| BAG4 | BAG family molecular chaperone regulator 4 | 34 |
| BBX | HMG box transcription factor BBX | 544 |
| BCKDHB | 2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta, mitochondrial | 52 |
| BCL2L13 | Bcl-2-like protein 13 | 32 |
| BCS1L | Mitochondrial chaperone BCS1 | 37 |
| BMP2K | BMP-2-inducible protein kinase | 358 |
| BPTF | Nucleosome-remodeling factor subunit BPTF | 35 |
| BRD1 | Bromodomain-containing protein 1 | 54 |
| BRI3BP | BRI3-binding protein | 86 |
| BSDC1 | BSD domain-containing protein 1 | 34 |
| CALCOCO1 | Calcium-binding and coiled-coil domain-containing protein 1 | 49 |
| CALCOCO2 | Calcium-binding and coiled-coil domain-containing protein 2 | 90 |
| CAMK2D | Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit delta | 195 |
| CAMSAP1 | Calmodulin-regulated spectrin-associated protein 1 | 99 |
| CARD6 | Caspase recruitment domain-containing protein 6 | 146 |
| CASP14 | Caspase-14;Caspase-14 subunit p17, mature form;Caspase-14 subunit p10, mature form;Caspase-14 subunit p20, intermediate form;Caspase-14 subunit p8, intermediate form | 145 |
| CAT | Catalase | 32 |
| CBR4 | Carbonyl reductase family member 4 | 35 |
| CBX1 | Chromobox protein homolog 1 | 57 |
| CBX3 | Chromobox protein homolog 3 | 45 |

| | | |
|---|---|---|
| CBX8 | Chromobox protein homolog 8 | 33 |
| CCDC134 | Coiled-coil domain-containing protein 134 | 33 |
| CCDC55 | Nuclear speckle splicing regulatory protein 1 | 41 |
| CCDC88B | Coiled-coil domain-containing protein 88B | 55 |
| CCNL2 | Cyclin-L2 | 52 |
| CCNYL1 | Cyclin-Y-like protein 1 | 168 |
| CD2AP | CD2-associated protein | 35 |
| CD36 | Platelet glycoprotein 4 | 191 |
| CD99 | CD99 antigen | 101 |
| CD99L2 | CD99 antigen-like protein 2 | 36 |
| CDC27 | Cell division cycle protein 27 homolog | 94 |
| CDC42BPA | Non-specific serine/threonine protein kinase;Serine/threonine-protein kinase MRCK alpha | 39 |
| CDCA5 | Sororin | 114 |
| CDIPT | CDP-diacylglycerol--inositol 3-phosphatidyltransferase | 51 |
| CDKN2C | Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor C | 36 |
| CDS2 | Phosphatidate cytidylyltransferase 2 | 36 |
| CDYL | Chromodomain Y-like protein | 39 |
| CENPB | Major centromere autoantigen B | 76 |
| CENPC | Centromere protein C | 59 |
| CEP41 | Centrosomal protein of 41 kDa | 179 |
| CEPT1 | Choline/ethanolaminephosphotransferase 1 | 651 |
| CHAF1B | Chromatin assembly factor 1 subunit B | 44 |
| CHCHD4 | Mitochondrial intermembrane space import and assembly protein 40 | 37 |
| CHID1 | Chitinase domain-containing protein 1 | 39 |
| CHMP2A | Charged multivesicular body protein 2a | 51 |
| CHMP2B | Charged multivesicular body protein 2b | 132 |
| CLK2 | Dual specificity protein kinase CLK2 | 607 |
| CLP1 | Polyribonucleotide 5-hydroxyl-kinase Clp1 | 67 |
| CMBL | Carboxymethylenebutenolidase homolog | 95 |
| CMC1 | COX assembly mitochondrial protein homolog | 34 |
| CMSS1 | Protein CMSS1 | 55 |
| CNDP2 | Cytosolic non-specific dipeptidase | 54 |
| CNNM3 | Metal transporter CNNM3 | 2072 |
| COASY | Bifunctional coenzyme A synthase;Phosphopantetheine adenylyltransferase;Dephospho-CoA kinase | 42 |
| COG2 | Conserved oligomeric Golgi complex subunit 2 | 70 |
| COG8 | Conserved oligomeric Golgi complex subunit 8 | 37 |
| COMMD10 | COMM domain-containing protein 10 | 78 |
| COMMD2 | COMM domain-containing protein 2 | 46 |
| COMMD6 | COMM domain-containing protein 6 | 35 |
| COMT | Catechol O-methyltransferase | 52 |
| COPG1 | Coatomer subunit gamma-1 | 41 |
| COX20 | Cytochrome c oxidase protein 20 homolog | 30 |
| COX7C | Cytochrome c oxidase subunit 7C, mitochondrial | 257 |
| CPNE4 | Copine-2;Copine-8;Copine-5;Copine-3;Copine-9;Copine-4;Copine-6;Copine-7 | 52 |
| CPNE5 | Copine-2;Copine-8;Copine-5;Copine-3;Copine-9;Copine-4;Copine-6;Copine-7 | 52 |
| CPNE6 | Copine-2;Copine-8;Copine-5;Copine-3;Copine-9;Copine-4;Copine-6;Copine-7 | 52 |

| | | |
|---|---|---|
| CPNE7 | Copine-2;Copine-8;Copine-5;Copine-3;Copine-9;Copine-4;Copine-6;Copine-7 | 52 |
| CPNE8 | Copine-8 | 156 |
| CPNE9 | Copine-2;Copine-8;Copine-5;Copine-3;Copine-9;Copine-4;Copine-6;Copine-7 | 52 |
| CPQ | Carboxypeptidase Q | 60 |
| CPSF1 | Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 1 | 38 |
| CPSF3L | Integrator complex subunit 11 | 36 |
| CRADD | Death domain-containing protein CRADD | 30 |
| CREG1 | Protein CREG1 | 154 |
| CRIP1 | Cysteine-rich protein 1 | 75 |
| CROCC | Rootletin | 34 |
| CRYZ | Quinone oxidoreductase | 46 |
| CSTA | Cystatin-A;Cystatin-A, N-terminally processed | 102 |
| CTAGE1 | cTAGE family member 5;cTAGE family member 6;cTAGE family member 15;Putative cTAGE family member 3;cTAGE family member 2;cTAGE family member 4;cTAGE family member 8;cTAGE family member 9 | 48 |
| CTAGE15 | cTAGE family member 5;cTAGE family member 6;cTAGE family member 15;Putative cTAGE family member 3;cTAGE family member 2;cTAGE family member 4;cTAGE family member 8;cTAGE family member 9 | 48 |
| CTAGE3P | cTAGE family member 5;cTAGE family member 6;cTAGE family member 15;Putative cTAGE family member 3;cTAGE family member 2;cTAGE family member 4;cTAGE family member 8;cTAGE family member 9 | 48 |
| CTAGE4 | cTAGE family member 5;cTAGE family member 6;cTAGE family member 15;Putative cTAGE family member 3;cTAGE family member 2;cTAGE family member 4;cTAGE family member 8;cTAGE family member 9 | 48 |
| CTAGE6 | cTAGE family member 5;cTAGE family member 6;cTAGE family member 15;Putative cTAGE family member 3;cTAGE family member 2;cTAGE family member 4;cTAGE family member 8;cTAGE family member 9 | 48 |
| CTAGE8 | cTAGE family member 5;cTAGE family member 6;cTAGE family member 15;Putative cTAGE family member 3;cTAGE family member 2;cTAGE family member 4;cTAGE family member 8;cTAGE family member 9 | 48 |
| CTAGE9 | cTAGE family member 5;cTAGE family member 6;cTAGE family member 15;Putative cTAGE family member 3;cTAGE family member 2;cTAGE family member 4;cTAGE family member 8;cTAGE family member 9 | 48 |
| CTPS2 | CTP synthase 2 | 32 |
| CTSH | Pro-cathepsin H;Cathepsin H mini chain;Cathepsin H;Cathepsin H heavy chain;Cathepsin H light chain | 165 |
| CUX1 | Homeobox protein cut-like 1 | 90 |
| CXCR4 | C-X-C chemokine receptor type 4 | 60 |
| CYFIP2 | Cytoplasmic FMR1-interacting protein 2 | 42 |
| CYP51A1 | Lanosterol 14-alpha demethylase | 36 |
| DAK | Bifunctional ATP-dependent dihydroxyacetone kinase/FAD-AMP lyase (cyclizing);ATP-dependent dihydroxyacetone kinase;FAD-AMP lyase (cyclizing) | 44 |
| DAZAP1 | DAZ-associated protein 1 | 52 |
| DBT | Lipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex, mitochondrial | 64 |
| DCAF5 | Nucleobindin-2;Nesfatin-1 | 30 |
| DCD | Dermcidin;Survival-promoting peptide;DCD-1 | 81 |
| DCP1B | mRNA-decapping enzyme 1B | 36 |
| DCTN2 | Dynactin subunit 2 | 42 |
| DCTN3 | Dynactin subunit 3 | 37 |
| DDAH2 | N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 | 49 |
| DECR2 | Peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase | 35 |
| DENND4C | DENN domain-containing protein 4C | 116 |
| DERL1 | Derlin-1 | 36 |
| DHCR7 | 7-dehydrocholesterol reductase | 31 |
| DHDDS | Dehydrodolichyl diphosphate syntase complex subunit DHDDS | 981 |
| DHRS1 | Dehydrogenase/reductase SDR family member 1 | 35 |

| | | |
|---|---|---|
| DHRS7B | Dehydrogenase/reductase SDR family member 7B | 48 |
| DHTKD1 | Probable 2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component DHKTD1, mitochondrial | 31 |
| DHX57 | Putative ATP-dependent RNA helicase DHX57 | 33 |
| DIS3L2 | DIS3-like exonuclease 2 | 78 |
| DLGAP4 | Disks large-associated protein 4 | 112 |
| DNAAF5 | Dynein assembly factor 5, axonemal | 35 |
| DNAJB14 | DnaJ homolog subfamily B member 14 | 144 |
| DNM1 | Dynamin-1 | 36 |
| DOCK11 | Dedicator of cytokinesis protein 11 | 42 |
| DOCK7 | Dedicator of cytokinesis protein 7 | 32 |
| DOK1 | Docking protein 1 | 46 |
| DPH5 | Diphthine synthase | 143 |
| DPY30 | Protein dpy-30 homolog | 84 |
| DR1 | Protein Dr1 | 131 |
| DSC1 | Desmocollin-1 | 365 |
| DSP | Desmoplakin | 299 |
| DTD1 | D-tyrosyl-tRNA(Tyr) deacylase 1 | 33 |
| DYNLT1 | Dynein light chain Tctex-type 1 | 32 |
| ECM1 | Extracellular matrix protein 1 | 54 |
| EIF1AX | Eukaryotic translation initiation factor 1A, X-chromosomal | 102 |
| EIF4EBP2 | Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 2 | 143 |
| ELMOD2 | ELMO domain-containing protein 2 | 81 |
| ELP4 | Elongator complex protein 4 | 34 |
| ELP6 | Elongator complex protein 6 | 30 |
| ELSPBP1 | PML-RARA-regulated adapter molecule 1 | 38 |
| EMC3 | ER membrane protein complex subunit 3 | 31 |
| EP300 | Histone acetyltransferase p300 | 36 |
| EPHX1 | Epoxide hydrolase 1 | 47 |
| ERAL1 | GTPase Era, mitochondrial | 73 |
| ERAP1 | Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 | 31 |
| ERAP2 | Endoplasmic reticulum aminopeptidase 2 | 40 |
| ERCC1 | DNA excision repair protein ERCC-1 | 51 |
| ERF | ETS domain-containing transcription factor ERF | 56 |
| EXOC4 | Exocyst complex component 4 | 33 |
| EXOC8 | Exocyst complex component 8 | 48 |
| EXOSC1 | Exosome complex component CSL4 | 36 |
| EYA3 | Eyes absent homolog 3;Eyes absent homolog | 61 |
| FAHD2B | Fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing protein 2B | 159 |
| FAM111A | Protein FAM111A | 237 |
| FAM120B | Constitutive coactivator of peroxisome proliferator-activated receptor gamma | 32 |
| FAM160B1 | Protein FAM160B1 | 33 |
| FAM3C | Protein FAM3C | 42 |
| FBXL15 | F-box/LRR-repeat protein 15 | 43 |
| FBXL18 | F-box/LRR-repeat protein 18 | 30 |
| FBXO22 | F-box only protein 22 | 71 |
| FBXO30 | F-box only protein 30 | 79 |

| | | |
|---|---|---|
| FBXO45 | F-box/SPRY domain-containing protein 1 | 106 |
| FCF1 | rRNA-processing protein FCF1 homolog | 94 |
| FIS1 | Mitochondrial fission 1 protein | 35 |
| FMR1 | Fragile X mental retardation protein 1 | 33 |
| FRG1 | Protein FRG1;Protein FRG1B | 31 |
| FRG1B | Protein FRG1;Protein FRG1B | 31 |
| FTO | Alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase FTO | 63 |
| FUK | L-fucose kinase | 95 |
| GABARAPL2 | Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 2 | 112 |
| GAN | Gigaxonin | 47 |
| GAR1 | H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 1 | 34 |
| GBAS | Protein NipSnap homolog 2 | 56 |
| GBP2 | Interferon-induced guanylate-binding protein 2 | 54 |
| GCA | Grancalcin | 35 |
| GCAT | 2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase, mitochondrial | 40 |
| GCC1 | GRIP and coiled-coil domain-containing protein 1 | 265 |
| GFM2 | Ribosome-releasing factor 2, mitochondrial | 69 |
| GGA2 | ADP-ribosylation factor-binding protein GGA2 | 57 |
| GGCT | Gamma-glutamylcyclotransferase | 39 |
| GGH | Gamma-glutamyl hydrolase | 54 |
| GGT1 | Inactive gamma-glutamyltranspeptidase 2;Gamma-glutamyltranspeptidase 1;Gamma-glutamyltranspeptidase 1 heavy chain;Gamma-glutamyltranspeptidase 1 light chain;Putative gamma-glutamyltranspeptidase 3;Putative gamma-glutamyltranspeptidase 3 heavy chain;Putative gamma-glutamyltranspeptidase 3 light chain | 32 |
| GGT2 | Inactive gamma-glutamyltranspeptidase 2;Gamma-glutamyltranspeptidase 1;Gamma-glutamyltranspeptidase 1 heavy chain;Gamma-glutamyltranspeptidase 1 light chain;Putative gamma-glutamyltranspeptidase 3;Putative gamma-glutamyltranspeptidase 3 heavy chain;Putative gamma-glutamyltranspeptidase 3 light chain | 32 |
| GGT3P | Inactive gamma-glutamyltranspeptidase 2;Gamma-glutamyltranspeptidase 1;Gamma-glutamyltranspeptidase 1 heavy chain;Gamma-glutamyltranspeptidase 1 light chain;Putative gamma-glutamyltranspeptidase 3;Putative gamma-glutamyltranspeptidase 3 heavy chain;Putative gamma-glutamyltranspeptidase 3 light chain | 32 |
| GIMAP1 | GTPase IMAP family member 1 | 68 |
| GIMAP2 | GTPase IMAP family member 2 | 99 |
| GLIPR2 | Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1 | 36 |
| GLTP | Glycolipid transfer protein | 52 |
| GMPPB | Mannose-1-phosphate guanyltransferase beta | 38 |
| GNAI1 | Guanine nucleotide-binding protein G(k) subunit alpha;Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-1 | 76 |
| GNB1L | Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein 1 | 39 |
| GNB2 | Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2 | 39 |
| GOLGA7 | Golgin subfamily A member 7 | 63 |
| GOLT1B | Vesicle transport protein GOT1B | 115 |
| GPD2 | Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial | 84 |
| GPN3 | GPN-loop GTPase 3 | 49 |
| GPX1 | Glutathione peroxidase;Glutathione peroxidase 1 | 58 |
| GRPEL1 | GrpE protein homolog 1, mitochondrial | 58 |
| GSN | Gelsolin | 34 |
| GTF2H2 | General transcription factor IIH subunit 2 | 38 |
| GTSF1 | Gametocyte-specific factor 1 | 39 |
| GUF1 | Translation factor GUF1, mitochondrial | 59 |
| H2AFJ | Histone H2A type 1-J;Histone H2A type 1-H;Histone H2A.J;Histone H2A type 1-D;Histone H2A | 71 |

| | | |
|---|---|---|
| | type 1;Histone H2A | |
| H2AFX | Histone H2AX;Histone H2A type 1-A | 1503 |
| H2BFS | Histone H2B type 1-C/E/F/G/I;Histone H2B type F-S;Histone H2B type 1-K;Histone H2B;Histone H2B type 1-M;Histone H2B type 1-N;Histone H2B type 1-H;Histone H2B type 2-F;Histone H2B type 1-D | 117 |
| H6PD | GDH/6PGL endoplasmic bifunctional protein;Glucose 1-dehydrogenase;6-phosphogluconolactonase | 61 |
| HACL1 | 2-hydroxyacyl-CoA lyase 1 | 65 |
| HAGH | Hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial | 55 |
| HAL | Histidine ammonia-lyase | 189 |
| HAUS1 | HAUS augmin-like complex subunit 1 | 40 |
| HAUS2 | HAUS augmin-like complex subunit 2 | 220 |
| HAUS6 | HAUS augmin-like complex subunit 6 | 59 |
| HAUS8 | HAUS augmin-like complex subunit 8 | 62 |
| HBA1 | Hemoglobin subunit alpha | 75 |
| HBA2 | Hemoglobin subunit alpha | 75 |
| HBEBP2BPA | Mannose-P-dolichol utilization defect 1 protein | 99 |
| HBZ | Hemoglobin subunit zeta | 129 |
| hCG_1789329 | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3 | 46 |
| HDAC6 | Histone deacetylase 6 | 32 |
| HDHD1 | Pseudouridine-5-phosphatase | 152 |
| HDHD2 | Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein 2 | 79 |
| HEATR2 | HEAT repeat-containing protein 2 | 32 |
| HGS | Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate | 47 |
| HIBCH | 3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial | 42 |
| HIST1H2AA | Histone H2AX;Histone H2A type 1-A | 2359 |
| HIST1H2AB | Histone H2A type 1-C;Histone H2A type 3;Histone H2A type 1-B/E | 68 |
| HIST1H2AC | Histone H2A type 1-C;Histone H2A type 3;Histone H2A type 1-B/E | 68 |
| HIST1H2AD | Histone H2A type 1-J;Histone H2A type 1-H;Histone H2A.J;Histone H2A type 1-D;Histone H2A type 1;Histone H2A | 71 |
| HIST1H2AG | Histone H2A type 1-J;Histone H2A type 1-H;Histone H2A.J;Histone H2A type 1-D;Histone H2A type 1;Histone H2A | 71 |
| HIST1H2AH | Histone H2A type 1-J;Histone H2A type 1-H;Histone H2A.J;Histone H2A type 1-D;Histone H2A type 1;Histone H2A | 71 |
| HIST1H2AJ | Histone H2A type 1-J;Histone H2A type 1-H;Histone H2A.J;Histone H2A type 1-D;Histone H2A type 1;Histone H2A | 71 |
| HIST1H2BC | Histone H2B type 1-C/E/F/G/I;Histone H2B type F-S;Histone H2B type 1-K;Histone H2B;Histone H2B type 1-M;Histone H2B type 1-N;Histone H2B type 1-H;Histone H2B type 2-F;Histone H2B type 1-D | 117 |
| HIST1H2BD | Histone H2B type 1-C/E/F/G/I;Histone H2B type F-S;Histone H2B type 1-K;Histone H2B;Histone H2B type 1-M;Histone H2B type 1-N;Histone H2B type 1-H;Histone H2B type 2-F;Histone H2B type 1-D | 117 |
| HIST1H2BH | Histone H2B type 1-C/E/F/G/I;Histone H2B type F-S;Histone H2B type 1-K;Histone H2B;Histone H2B type 1-M;Histone H2B type 1-N;Histone H2B type 1-H;Histone H2B type 2-F;Histone H2B type 1-D | 117 |
| HIST1H2BK | Histone H2B type 1-C/E/F/G/I;Histone H2B type F-S;Histone H2B type 1-K;Histone H2B;Histone H2B type 1-M;Histone H2B type 1-N;Histone H2B type 1-H;Histone H2B type 2-F;Histone H2B type 1-D | 117 |
| HIST1H2BM | Histone H2B type 1-C/E/F/G/I;Histone H2B type F-S;Histone H2B type 1-K;Histone H2B;Histone H2B type 1-M;Histone H2B type 1-N;Histone H2B type 1-H;Histone H2B type 2-F;Histone H2B type 1-D | 117 |
| HIST1H2BN | Histone H2B type 1-C/E/F/G/I;Histone H2B type F-S;Histone H2B type 1-K;Histone H2B;Histone H2B type 1-M;Histone H2B type 1-N;Histone H2B type 1-H;Histone H2B type 2-F;Histone H2B type 1-D | 117 |
| HIST1H4A | Histone H4 | 46 |
| HIST2H2AA3 | Histone H2A type 2-C;Histone H2A type 2-A | 41 |
| HIST2H2AC | Histone H2A type 2-C;Histone H2A type 2-A | 41 |
| HIST2H2BF | Histone H2B type 1-C/E/F/G/I;Histone H2B type F-S;Histone H2B type 1-K;Histone H2B;Histone H2B type 1-M;Histone H2B type 1-N;Histone H2B type 1-H;Histone H2B type 2-F;Histone H2B type 1-D | 117 |

| | | |
|---|---|---|
| HIST3H2A | Histone H2A type 1-C;Histone H2A type 3;Histone H2A type 1-B/E | 68 |
| HMGA1 | High mobility group protein HMG-I/HMG-Y;High mobility group protein HMG-I/HMG-Y | 58 |
| HPCA | Hippocalcin-like protein 1;Neuron-specific calcium-binding protein hippocalcin;Neurocalcin-delta | 56 |
| HPCAL1 | Hippocalcin-like protein 1 | 91 |
| HRSP12 | Ribonuclease UK114 | 73 |
| HS2ST1 | Heparan sulfate 2-O-sulfotransferase 1 | 2111 |
| HSP90AB2P | Putative heat shock protein HSP 90-beta 2 | 34 |
| HSP90AB4P | Putative heat shock protein HSP 90-beta 4 | 231 |
| HSPA13 | Heat shock 70 kDa protein 13 | 33 |
| HTATSF1 | HIV Tat-specific factor 1 | 35 |
| HTRA2 | Serine protease HTRA2, mitochondrial | 50 |
| HUS1 | Checkpoint protein HUS1 | 1007 |
| HYPK | Huntingtin-interacting protein K | 60 |
| IDH1 | Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic | 33 |
| IFIH1 | Interferon-induced helicase C domain-containing protein 1 | 30 |
| IGF2BP2 | Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2 | 110 |
| IKBKB | Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta | 31 |
| IL16 | Pro-interleukin-16;Interleukin-16 | 34 |
| IL1RAP | Interleukin-1 receptor accessory protein | 37 |
| ILKAP | Integrin-linked kinase-associated serine/threonine phosphatase 2C | 45 |
| ILKAP3 | Integrin-linked kinase-associated serine/threonine phosphatase 2C | 45 |
| ING1 | Inhibitor of growth protein 1 | 995 |
| INPP5D | Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 1 | 49 |
| INPPL1 | Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 2 | 41 |
| INTS10 | Integrator complex subunit 10 | 60 |
| INTS4 | Integrator complex subunit 4 | 30 |
| INTS5 | Integrator complex subunit 5 | 52 |
| IPO11 | Importin-11 | 34 |
| IPO13 | Importin-13 | 74 |
| IQGAP3 | Ras GTPase-activating-like protein IQGAP3 | 160 |
| IQSEC1 | IQ motif and SEC7 domain-containing protein 1 | 65 |
| IREB2 | Iron-responsive element-binding protein 2 | 85 |
| IRF5 | Interferon regulatory factor 5 | 108 |
| ITFG3 | Protein ITFG3 | 31 |
| ITGAM | Integrin alpha-M | 34 |
| ITPRIP | Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-interacting protein | 362 |
| JUP | Junction plakoglobin | 73 |
| KATNAL2 | Katanin p60 ATPase-containing subunit A-like 2 | 119 |
| KBTBD8 | Kelch repeat and BTB domain-containing protein 8 | 32 |
| KCTD15 | BTB/POZ domain-containing protein KCTD15 | 43 |
| KDELR1 | ER lumen protein-retaining receptor 1;ER lumen protein-retaining receptor;ER lumen protein-retaining receptor 2 | 74 |
| KDELR2 | ER lumen protein-retaining receptor 1;ER lumen protein-retaining receptor;ER lumen protein-retaining receptor 2 | 74 |
| KDM2B | Lysine-specific demethylase 2B | 146 |
| KDM5D | Lysine-specific demethylase 5D | 774 |
| KIAA0415 | | 812 |
| KIAA2013 | Uncharacterized protein KIAA2013 | 62 |

| | | |
|---|---|---|
| KIF3A | Kinesin-like protein;Kinesin-like protein KIF3A | 47 |
| KIN27 | cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha | 45 |
| KNOP1 | Lysine-rich nucleolar protein 1 | 32 |
| KYNU | Kynureninase | 32 |
| LACE1 | Lactation elevated protein 1 | 163 |
| LAMP1 | Lysosome-associated membrane glycoprotein 1 | 45 |
| LAMP2 | Lysosome-associated membrane glycoprotein 2 | 74 |
| LAMTOR2 | Ragulator complex protein LAMTOR2 | 66 |
| LAMTOR3 | Ragulator complex protein LAMTOR3 | 2009 |
| LANCL2 | LanC-like protein 2 | 34 |
| LIG4 | DNA ligase 4 | 46 |
| LIX1L | LIX1-like protein | 54 |
| LMO7 | LIM domain only protein 7 | 39 |
| LONP2 | Lon protease homolog 2, peroxisomal | 88 |
| LPCAT1 | Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 | 69 |
| LPCAT2 | Lysophosphatidylcholine acyltransferase 2 | 35 |
| LPCAT3 | Lysophospholipid acyltransferase 5 | 37 |
| LPGAT1 | Acyl-CoA:lysophosphatidylglycerol acyltransferase 1 | 47 |
| LRCH4 | Leucine-rich repeat and calponin homology domain-containing protein 4 | 36 |
| LRMP | Lymphoid-restricted membrane protein;Processed lymphoid-restricted membrane protein | 40 |
| LRRC40 | Leucine-rich repeat-containing protein 40 | 41 |
| LRWD1 | Leucine-rich repeat and WD repeat-containing protein 1 | 53 |
| LSM2 | U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm2 | 34 |
| LSM8 | U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm8 | 38 |
| LSS | Lanosterol synthase | 41 |
| LUC7L | Putative RNA-binding protein Luc7-like 1 | 49 |
| M6PR | Cation-dependent mannose-6-phosphate receptor | 47 |
| MADD | MAP kinase-activating death domain protein | 206 |
| MAFF | Transcription factor MafG;Transcription factor MafK | 959 |
| MAFG | Transcription factor MafG | 40 |
| MAFK | Transcription factor MafG;Transcription factor MafK | 959 |
| MAGED2 | Melanoma-associated antigen D2 | 37 |
| MAN2A1 | Alpha-mannosidase 2 | 64 |
| MAN2C1 | Alpha-mannosidase 2C1 | 87 |
| MAP1B | Microtubule-associated protein 1B;MAP1B heavy chain;MAP1 light chain LC1 | 142 |
| MAP2K1 | Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1 | 67 |
| MAPRE2 | Microtubule-associated protein RP/EB family member 2 | 43 |
| MARCKSL1 | MARCKS-related protein | 63 |
| MAT2B | Methionine adenosyltransferase 2 subunit beta;Methionine adenosyltransferase 2 subunit beta | 37 |
| MBOAT7 | Lysophospholipid acyltransferase 7 | 60 |
| MCTS1 | Malignant T-cell-amplified sequence 1 | 45 |
| MED1 | Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 1 | 32 |
| MED16 | Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 16 | 42 |
| MED20 | Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 20 | 31 |
| MED22 | Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 22 | 78 |
| MED30 | Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 30 | 34 |

| | | |
|---|---|---|
| MESDC2 | LDLR chaperone MESD | 30 |
| MGST2 | Microsomal glutathione S-transferase 2 | 32 |
| MICU1 | Calcium uptake protein 1, mitochondrial | 176 |
| MIS12 | Protein MIS12 homolog | 349 |
| MLLT4 | Afadin | 38 |
| MMAA | Methylmalonic aciduria type A protein, mitochondrial | 243 |
| MNAT1 | CDK-activating kinase assembly factor MAT1 | 42 |
| MNDA | Myeloid cell nuclear differentiation antigen | 53 |
| MON1B | Vacuolar fusion protein MON1 homolog B | 52 |
| MP68 | 6.8 kDa mitochondrial proteolipid | 118 |
| MPC2 | Mitochondrial pyruvate carrier 2 | 49 |
| MPDU1 | Mannose-P-dolichol utilization defect 1 protein | 99 |
| MPHOSPH6 | M-phase phosphoprotein 6 | 84 |
| MPV17 | Protein Mpv17 | 142 |
| MRPL21 | 39S ribosomal protein L21, mitochondrial | 72 |
| MRPL30 | 39S ribosomal protein L30, mitochondrial | 47 |
| MRPL47 | 39S ribosomal protein L47, mitochondrial | 43 |
| MRPL52 | 39S ribosomal protein L52, mitochondrial | 69 |
| MRPS24 | 28S ribosomal protein S24, mitochondrial | 156 |
| MRPS31 | 28S ribosomal protein S31, mitochondrial | 33 |
| MST4 | Serine/threonine-protein kinase MST4 | 177 |
| MT-CYB | Cytochrome b | 77 |
| MTHFR | Methylenetetrahydrofolate reductase | 252 |
| MTHFS | 5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase | 197 |
| MTMR1 | Myotubularin-related protein 1 | 304 |
| MTX2 | Metaxin-2 | 42 |
| MYH14 | Myosin-14 | 78 |
| MYO1C | Unconventional myosin-Ic | 72 |
| MYOF | Myoferlin | 155 |
| MZT2A | Mitotic-spindle organizing protein 2A;Mitotic-spindle organizing protein 2B | 34 |
| MZT2B | Mitotic-spindle organizing protein 2A;Mitotic-spindle organizing protein 2B | 34 |
| N4BP1 | NEDD4-binding protein 1 | 58 |
| NACAD | NAC-alpha domain-containing protein 1 | 785 |
| NARS2 | Probable asparagine--tRNA ligase, mitochondrial | 34 |
| NBEAL2 | Neurobeachin-like protein 2 | 162 |
| NCALD | Hippocalcin-like protein 1;Neuron-specific calcium-binding protein hippocalcin;Neurocalcin-delta | 56 |
| NCAM2 | Neural cell adhesion molecule 2 | 45 |
| NCAPG2 | Condensin-2 complex subunit G2 | 39 |
| NCKIPSD | NCK-interacting protein with SH3 domain | 46 |
| NDUFA11 | NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 11 | 102 |
| NDUFA6 | NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 6 | 59 |
| NDUFAF1 | Complex I intermediate-associated protein 30, mitochondrial | 57 |
| NDUFAF3 | NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex assembly factor 3 | 117 |
| NDUFS8 | NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mitochondrial | 40 |
| NEB | Nebulin | 163 |
| NEDD8-MDP1 | NEDD8 | 37 |

| | | |
|---|---|---|
| NFKBIE | NF-kappa-B inhibitor epsilon | 133 |
| NFRKB | Nuclear factor related to kappa-B-binding protein | 31 |
| NGLY1 | Peptide-N(4)-(N-acetyl-beta-glucosaminyl)asparagine amidase | 94 |
| NME2P1 | Putative nucleoside diphosphate kinase | 44 |
| NOA1 | Nitric oxide-associated protein 1 | 97 |
| NOC2L | Nucleolar complex protein 2 homolog | 35 |
| NOL12 | Nucleolar protein 12 | 108 |
| NPC1 | Niemann-Pick C1 protein | 107 |
| NSRP1 | Nuclear speckle splicing regulatory protein 1 | 41 |
| NSUN4 | 5-methylcytosine rRNA methyltransferase NSUN4 | 1388 |
| NT5C | 5(3)-deoxyribonucleotidase, cytosolic type | 65 |
| NT5C2 | Cytosolic purine 5-nucleotidase | 37 |
| NT5DC3 | 5-nucleotidase domain-containing protein 3 | 71 |
| NUCKS1 | Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinase substrate 1 | 71 |
| NUDT18 | 8-oxo-dGDP phosphatase NUDT18 | 99 |
| NUP62 | Nuclear pore glycoprotein p62 | 39 |
| NUPL1 | Nucleoporin p58/p45 | 42 |
| NVL | Nuclear valosin-containing protein-like | 37 |
| OFD1 | Oral-facial-digital syndrome 1 protein | 126 |
| OSBPL10 | Oxysterol-binding protein-related protein 11;Oxysterol-binding protein;Oxysterol-binding protein-related protein 10 | 81 |
| OSBPL9 | Oxysterol-binding protein-related protein 9 | 96 |
| OSTC | Oligosaccharyltransferase complex subunit OSTC | 277 |
| OTULIN | Ubiquitin thioesterase otulin | 47 |
| OXR1 | Oxidation resistance protein 1 | 47 |
| OXSM | 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase, mitochondrial | 38 |
| PAFAH1B2 | Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta | 71 |
| PARG | Poly(ADP-ribose) glycohydrolase | 46 |
| PARP9 | Poly [ADP-ribose] polymerase 9 | 33 |
| PBXIP1 | Pre-B-cell leukemia transcription factor-interacting protein 1 | 72 |
| PC | Pyruvate carboxylase, mitochondrial | 38 |
| PCCA | Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial | 42 |
| PCID2 | PCI domain-containing protein 2 | 32 |
| PDK3 | [Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)] kinase isozyme 3, mitochondrial | 115 |
| PDP1 | [Pyruvate dehydrogenase [acetyl-transferring]]-phosphatase 1, mitochondrial | 89 |
| PDSS1 | Decaprenyl-diphosphate synthase subunit 1 | 84 |
| PELO | Protein pelota homolog | 50 |
| PELP1 | Proline-, glutamic acid- and leucine-rich protein 1 | 41 |
| PEX13 | Peroxisomal membrane protein PEX13 | 47 |
| PEX16 | Peroxisomal membrane protein PEX16 | 107 |
| PEX3 | Peroxisomal biogenesis factor 3 | 34 |
| PFKFB3 | 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3;6-phosphofructo-2-kinase;Fructose-2,6-bisphosphatase | 57 |
| PGP | Phosphoglycolate phosphatase | 40 |
| PHC3 | Polyhomeotic-like protein 3 | 112 |
| PHF14 | PHD finger protein 14 | 46 |
| PHF5A | PHD finger-like domain-containing protein 5A | 30 |
| PI4K2A | Phosphatidylinositol 4-kinase type 2-alpha | 68 |

| | | |
|---|---|---|
| PIBF1 | Progesterone-induced-blocking factor 1 | 33 |
| PIGK | GPI-anchor transamidase | 59 |
| PIP | Prolactin-inducible protein | 653 |
| PIP4K2B | Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase type-2 beta | 37 |
| PKP1 | Plakophilin-1 | 59 |
| PLA2G4A | Cytosolic phospholipase A2;Phospholipase A2;Lysophospholipase | 45 |
| PLCB2 | 1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-2 | 150 |
| PLEK | Pleckstrin | 30 |
| PLEKHM1 | Pleckstrin homology domain-containing family M member 1;Putative pleckstrin homology domain-containing family M member 1P | 518 |
| PLEKHM1P | Pleckstrin homology domain-containing family M member 1;Putative pleckstrin homology domain-containing family M member 1P | 518 |
| PLGRKT | Plasminogen receptor (KT) | 121 |
| PML | Protein PML | 31 |
| PNISR | Arginine/serine-rich protein PNISR | 134 |
| PNKP | Bifunctional polynucleotide phosphatase/kinase;Polynucleotide 3-phosphatase;Polynucleotide 5-hydroxyl-kinase | 51 |
| POLDIP3 | Polymerase delta-interacting protein 3 | 33 |
| PON2 | Serum paraoxonase/arylesterase 2 | 35 |
| POU2F1 | POU domain, class 2, transcription factor 1;POU domain protein | 35 |
| PPIE | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase E;Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase | 53 |
| PPOX | Protoporphyrinogen oxidase | 92 |
| PPP1CB | Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit;Serine/threonine-protein phosphatase | 147 |
| PPP2R2D | Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B delta isoform | 75 |
| PPP2R5A | Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit alpha isoform | 44 |
| PPP6R2 | Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory subunit 2 | 81 |
| PRCP | Lysosomal Pro-X carboxypeptidase | 85 |
| PREPL | Prolyl endopeptidase-like | 269 |
| PRKACA | cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha | 45 |
| PRKACB | cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit beta | 169 |
| PRMT3 | Protein arginine N-methyltransferase 3 | 37 |
| PRPSAP2 | Phosphoribosyl pyrophosphate synthase-associated protein 2 | 31 |
| PRSS57 | Serine protease 57 | 163 |
| PSMB3 | Proteasome subunit beta type-3 | 52 |
| PSMB6 | Proteasome subunit beta type-6;Proteasome subunit beta type | 36 |
| PSMB9 | Proteasome subunit beta type-9;Proteasome subunit beta type | 99 |
| PSMG1 | Proteasome assembly chaperone 1 | 42 |
| PSMG3 | Proteasome assembly chaperone 3 | 77 |
| PTCD1 | Pentatricopeptide repeat-containing protein 1, mitochondrial | 64 |
| PTDSS1 | Phosphatidylserine synthase 1 | 54 |
| PTMS | Parathymosin | 31 |
| PTP4A2 | Protein tyrosine phosphatase type IVA 2 | 39 |
| PTPN12 | Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 12 | 103 |
| PTPN7 | Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 7 | 46 |
| PTPRCAP | Protein tyrosine phosphatase receptor type C-associated protein | 96 |
| PUS10 | Putative tRNA pseudouridine synthase Pus10 | 133 |
| PXMP2 | Peroxisomal membrane protein 2 | 166 |
| PYCRL | Pyrroline-5-carboxylate reductase 3;Pyrroline-5-carboxylate reductase | 83 |

| | | |
|---|---|---|
| QDPR | Dihydropteridine reductase | 37 |
| QIL1 | Protein QIL1 | 239 |
| QKI | Protein quaking | 31 |
| QPRT | Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase [carboxylating] | 32 |
| QSOX1 | Sulfhydryl oxidase 1 | 36 |
| RAB11B | Ras-related protein Rab-11B | 33 |
| RAB35 | Ras-related protein Rab-35 | 52 |
| RAB4A | Ras-related protein Rab-4A | 87 |
| RAB5A | Ras-related protein Rab-5A | 36 |
| RAB5B | Ras-related protein Rab-5B | 44 |
| RABGAP1 | Rab GTPase-activating protein 1 | 51 |
| RAC1 | Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 | 37 |
| RAC3 | Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1;Ras-related C3 botulinum toxin substrate 3 | 92 |
| RANBP10 | Ran-binding protein 10 | 45 |
| RAP1B | Ras-related protein Rap-1b;Ras-related protein Rap-1b-like protein | 31 |
| RAP2B | Ras-related protein Rap-2b | 31 |
| RAP2C | Ras-related protein Rap-2c | 48 |
| RASAL3 | RAS protein activator like-3 | 57 |
| RBM42 | RNA-binding protein 42 | 40 |
| RBM4B | RNA-binding protein 4B | 41 |
| RBMS1 | RNA-binding motif, single-stranded-interacting protein 1 | 178 |
| RCN2 | Reticulocalbin-2 | 34 |
| RFC1 | Replication factor C subunit 1 | 57 |
| RFC5 | Replication factor C subunit 5 | 41 |
| RIN3 | Ras and Rab interactor 3 | 10872 |
| RIPK1 | Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1 | 92 |
| RMDN1 | Regulator of microtubule dynamics protein 1 | 52 |
| RMND5A | Protein RMD5 homolog A | 35 |
| RNASEH2A | Ribonuclease H2 subunit A | 43 |
| RNMT | mRNA cap guanine-N7 methyltransferase | 50 |
| ROCK1 | Rho-associated protein kinase 1 | 57 |
| ROMO1 | Reactive oxygen species modulator 1 | 109 |
| RPA2 | Replication protein A 32 kDa subunit | 32 |
| RPL35A | 60S ribosomal protein L35a | 30 |
| RPRD1A | Regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein 1A | 30 |
| RPRD1B | Regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein 1B | 53 |
| RPS19 | 40S ribosomal protein S19 | 34 |
| RPS27L | 40S ribosomal protein S27;40S ribosomal protein S27-like | 61 |
| RPS6KA4 | Ribosomal protein S6 kinase;Ribosomal protein S6 kinase alpha-4 | 78 |
| RPUSD3 | RNA pseudouridylate synthase domain-containing protein 3 | 46 |
| RRP8 | Ribosomal RNA-processing protein 8 | 39 |
| RUNX3 | Runt-related transcription factor 3 | 112 |
| S100A6 | Protein S100-A6;Protein S100 | 44 |
| S100A7 | Protein S100-A7 | 66 |
| SAMD1 | Atherin | 30 |
| SAMD9 | Sterile alpha motif domain-containing protein 9 | 57 |

| | | |
|---|---|---|
| SBSN | Suprabasin | 181 |
| SCD5 | Stearoyl-CoA desaturase 5 | 107 |
| SCFD2 | Sec1 family domain-containing protein 2 | 45 |
| SCO2 | Protein SCO2 homolog, mitochondrial | 31 |
| SCRN3 | Secernin-3 | 60 |
| SDCBP | Syntenin-1 | 56 |
| SEC22B | Vesicle-trafficking protein SEC22b | 43 |
| SEC61B | Protein transport protein Sec61 subunit beta | 40 |
| SEC61G | Protein transport protein Sec61 subunit gamma | 35 |
| SELO | Selenoprotein O | 47 |
| SEPHS2 | Selenide, water dikinase 2 | 86 |
| SERINC1 | Serine incorporator 1 | 524 |
| SERPINB1 | Leukocyte elastase inhibitor | 51 |
| SERPINB3 | Serpin B3 | 42 |
| SERPINB6 | Serpin B6 | 49 |
| SERPINB9 | Serpin B9 | 339 |
| SGPL1 | Sphingosine-1-phosphate lyase 1 | 48 |
| SH3BGRL3 | SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3 | 31 |
| SH3BP5L | SH3 domain-binding protein 5-like | 312 |
| SH3GLB1 | Endophilin-B1 | 41 |
| SH3GLB2 | Endophilin-B2 | 39 |
| SHKBP1 | SH3KBP1-binding protein 1 | 30 |
| SIAE | Sialate O-acetylesterase | 82 |
| SIN3A | Paired amphipathic helix protein Sin3a | 33 |
| SIRT5 | NAD-dependent protein deacylase sirtuin-5, mitochondrial | 99 |
| SKIV2L | Helicase SKI2W | 67 |
| SLC25A24 | Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-1 | 49 |
| SLC25A4 | ADP/ATP translocase 1 | 31 |
| SLC25A40 | Solute carrier family 25 member 40 | 104 |
| SLC27A3 | Long-chain fatty acid transport protein 3 | 120 |
| SLC2A14 | Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 14;Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3 | 77 |
| SLC30A9 | Zinc transporter 9 | 299 |
| SLC35F6 | Solute carrier family 35 member F6 | 55 |
| SLC38A9 | Sodium-coupled neutral amino acid transporter 9 | 159 |
| SLC39A11 | Zinc transporter ZIP11 | 30 |
| SLC39A7 | Zinc transporter SLC39A7 | 34 |
| SLC41A3 | Solute carrier family 41 member 3 | 58 |
| SLC4A7 | Sodium bicarbonate cotransporter 3 | 111 |
| SLU7 | Pre-mRNA-splicing factor SLU7 | 57 |
| SMARCAL1 | SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A-like protein 1 | 82 |
| SMG6 | Telomerase-binding protein EST1A | 787 |
| SMG8 | Protein SMG8 | 121 |
| SMYD2 | N-lysine methyltransferase SMYD2 | 38 |
| SMYD3 | Histone-lysine N-methyltransferase SMYD3 | 99 |
| SNRPF | Small nuclear ribonucleoprotein F | 35 |
| SNRPG | Small nuclear ribonucleoprotein G;Putative small nuclear ribonucleoprotein G-like protein 15 | 52 |

| | | |
|---|---|---|
| SNRPGP15 | Small nuclear ribonucleoprotein G;Putative small nuclear ribonucleoprotein G-like protein 15 | 52 |
| SOAT1 | Sterol O-acyltransferase 1 | 54 |
| SOCS2 | Suppressor of cytokine signaling 2 | 45 |
| SOD2 | Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial | 38 |
| SP3 | Transcription factor Sp3 | 49 |
| SPAST | Spastin | 56 |
| SPATS2L | SPATS2-like protein | 88 |
| SPECC1 | Cytospin-B | 88 |
| SPG7 | Paraplegin | 32 |
| SPRYD4 | SPRY domain-containing protein 4 | 3585 |
| SPTA1 | Spectrin alpha chain, erythrocytic 1 | 96 |
| SRBD1 | S1 RNA-binding domain-containing protein 1 | 39 |
| SRP14 | Signal recognition particle 14 kDa protein | 42 |
| SRP68 | Signal recognition particle subunit SRP68 | 33 |
| SRPK2 | SRSF protein kinase 2;SRSF protein kinase 2 N-terminal;SRSF protein kinase 2 C-terminal | 43 |
| SRSF10 | Serine/arginine-rich splicing factor 10 | 38 |
| SRSF5 | Serine/arginine-rich splicing factor 5 | 39 |
| SRSF6 | Serine/arginine-rich splicing factor 6 | 32 |
| SRXN1 | Sulfiredoxin-1 | 135 |
| SSSCA1 | Sjoegren syndrome/scleroderma autoantigen 1 | 90 |
| STBD1 | Starch-binding domain-containing protein 1 | 32 |
| STK26 | Serine/threonine-protein kinase 26 | 33 |
| STK39 | STE20/SPS1-related proline-alanine-rich protein kinase | 284 |
| STX18 | Syntaxin-18 | 150 |
| STX3 | Syntaxin-3 | 3217 |
| STX4 | Syntaxin-4 | 40 |
| STX5 | Syntaxin-5 | 71 |
| STX6 | Syntaxin-6 | 43 |
| STXBP3 | Syntaxin-binding protein 3 | 82 |
| SUCLA2 | Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial | 42 |
| SUCLG2 | Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta, mitochondrial | 36 |
| SUMO4 | Small ubiquitin-related modifier 2;Small ubiquitin-related modifier 4 | 32 |
| SYNGR1 | Synaptogyrin-1 | 53 |
| SYNGR2 | Synaptogyrin-2 | 34 |
| SYPL1 | Synaptophysin-like protein 1 | 32 |
| SYTL1 | Synaptotagmin-like protein 1 | 191 |
| SZRD1 | SUZ domain-containing protein 1 | 117 |
| TAF10 | Transcription initiation factor TFIID subunit 10 | 89 |
| TAF1C | TATA box-binding protein-associated factor RNA polymerase I subunit C | 30 |
| TAGLN3 | Transgelin-3 | 332 |
| TARBP1 | Probable methyltransferase TARBP1 | 106 |
| TATDN1 | Putative deoxyribonuclease TATDN1 | 34 |
| TBC1D13 | TBC1 domain family member 13 | 30 |
| TBC1D17 | TBC1 domain family member 17 | 117 |
| TBC1D23 | TBC1 domain family member 23 | 59 |
| TBC1D8 | TBC1 domain family member 8 | 177 |

| | | |
|---|---|---|
| TBCC | Tubulin-specific chaperone C | 70 |
| TCEB2 | Transcription elongation factor B polypeptide 2 | 51 |
| TEX2 | Testis-expressed sequence 2 protein | 33 |
| TGM1 | Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase K | 183 |
| TGM3 | Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E;Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E 50 kDa catalytic chain;Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E 27 kDa non-catalytic chain | 44 |
| THEM4 | Acyl-coenzyme A thioesterase THEM4 | 39 |
| THOC6 | THO complex subunit 6 homolog | 35 |
| THYN1 | Thymocyte nuclear protein 1 | 40 |
| TICAM2 | Transmembrane emp24 domain-containing protein 7;TIR domain-containing adapter molecule 2 | 101 |
| TIFA | TRAF-interacting protein with FHA domain-containing protein A | 43 |
| TIMM10B | Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim10 B | 65 |
| TIMM8A | Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim8 A | 43 |
| TJP1 | Tight junction protein ZO-1 | 42 |
| TKFC | Bifunctional ATP-dependent dihydroxyacetone kinase/FAD-AMP lyase (cyclizing);ATP-dependent dihydroxyacetone kinase;FAD-AMP lyase (cyclizing) | 44 |
| TLDC1 | TLD domain-containing protein 1 | 137 |
| TMED7 | Transmembrane emp24 domain-containing protein 7;TIR domain-containing adapter molecule 2 | 62 |
| TMED7-TICAM2 | Transmembrane emp24 domain-containing protein 7;TIR domain-containing adapter molecule 2 | 61 |
| TMED8 | Protein TMED8 | 2736 |
| TMEM120A | Transmembrane protein 120A | 143 |
| TMEM126A | Transmembrane protein 126A | 41 |
| TMEM126B | Complex I assembly factor TMEM126B, mitochondrial | 278 |
| TMEM14C | Transmembrane protein 14C | 83 |
| TMEM160 | Transmembrane protein 160 | 54 |
| TMEM199 | Transmembrane protein 199 | 36 |
| TMEM245 | Transmembrane protein 245 | 311 |
| TMEM57 | Macoilin | 95 |
| TMEM9 | Transmembrane protein 9 | 266 |
| TMPIT | Transmembrane protein 120A | 143 |
| TMPPE | Transmembrane protein with metallophosphoesterase domain | 141 |
| TMX2 | Thioredoxin-related transmembrane protein 2 | 42 |
| TNFAIP2 | Tumor necrosis factor alpha-induced protein 2 | 52 |
| TNFAIP8L2 | Tumor necrosis factor alpha-induced protein 8-like protein 2 | 32 |
| TNPO2 | Transportin-2 | 34 |
| TOMM5 | Mitochondrial import receptor subunit TOM5 homolog | 55 |
| TOPBP1 | DNA topoisomerase 2-binding protein 1 | 84 |
| TOR1A | Torsin-1A | 40 |
| TOR1AIP2 | Torsin-1A-interacting protein 2 | 56 |
| TOR2A | Torsin-2A | 170 |
| TPD52 | Tumor protein D52 | 52 |
| TPRKB | EKC/KEOPS complex subunit TPRKB | 32 |
| TRAF3IP3 | TRAF3-interacting JNK-activating modulator | 84 |
| TRAPPC13 | Trafficking protein particle complex subunit 13 | 85 |
| TRAPPC3 | Trafficking protein particle complex subunit 3 | 67 |
| TRAPPC5 | Trafficking protein particle complex subunit 5 | 34 |
| TRIM59 | Tripartite motif-containing protein 59 | 119 |
| TRIOBP | TRIO and F-actin-binding protein | 33 |

| | | |
|---|---|---|
| TRMT112 | Multifunctional methyltransferase subunit TRM112-like protein | 39 |
| TROVE2 | 60 kDa SS-A/Ro ribonucleoprotein | 35 |
| TRUB1 | Probable tRNA pseudouridine synthase 1 | 32 |
| TSC22D4 | TSC22 domain family protein 4 | 71 |
| TSSC4 | Protein TSSC4 | 42 |
| TTC5 | Tetratricopeptide repeat protein 5 | 68 |
| TTF2 | Transcription termination factor 2 | 33 |
| TTN | Titin | 278 |
| TUBB4A | Tubulin beta-4A chain | 100034 |
| TYW3 | tRNA wybutosine-synthesizing protein 3 homolog | 1194 |
| UFSP2 | Ufm1-specific protease 2 | 31 |
| UNC45A | Protein unc-45 homolog A | 33 |
| UQCR10 | Cytochrome b-c1 complex subunit 9 | 46 |
| UQCRB | Cytochrome b-c1 complex subunit 7 | 57 |
| VAC14 | Protein VAC14 homolog | 100 |
| VAMP7 | Vesicle-associated membrane protein 7 | 85 |
| VAPB | Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C | 32 |
| VARS2 | Valine--tRNA ligase, mitochondrial | 54 |
| VAT1L | Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog-like | 190 |
| VMA21 | Vacuolar ATPase assembly integral membrane protein VMA21 | 47 |
| VPS33B | Vacuolar protein sorting-associated protein 33B | 43 |
| VWA9 | von Willebrand factor A domain-containing protein 9 | 35 |
| WBSCR22 | Probable 18S rRNA (guanine-N(7))-methyltransferase | 42 |
| WDR11 | WD repeat-containing protein 11 | 71 |
| WDR37 | WD repeat-containing protein 37 | 156 |
| WDR48 | WD repeat-containing protein 48 | 48 |
| WDR7 | WD repeat-containing protein 7 | 87 |
| XPNPEP3 | Probable Xaa-Pro aminopeptidase 3 | 37 |
| YPEL5 | Protein yippee-like 5 | 31 |
| YWHAQ | 14-3-3 protein theta | 44 |
| ZADH2 | Zinc-binding alcohol dehydrogenase domain-containing protein 2 | 63 |
| ZBTB14 | Zinc finger and BTB domain-containing protein 14 | 1363 |
| ZCCHC17 | Nucleolar protein of 40 kDa | 158 |
| ZFP91 | E3 ubiquitin-protein ligase ZFP91 | 84 |
| ZFP91-CNTF | E3 ubiquitin-protein ligase ZFP91 | 80 |
| ZNF511 | Zinc finger protein 511 | 69 |
| ZNF574 | Zinc finger protein 574 | 81 |
| ZNF740 | Zinc finger protein 740 | 2273 |
| ZNF8 | Ran-binding protein 3 | 41 |

## 3. Liste de protéines en aval d'eIF6 diminuées avec le siFLT3

| Gènes | Protéines | Pourcentage de diminution |
|---|---|---|
| AMPD3 | AMP deaminase 3 | -77 |
| AURKA | Aurora kinase A | -55 |
| BCAR2 | Transcriptional-regulating factor 1 | -100 |
| BUB1B | Mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase BUB1 beta | -58 |
| CCNA2 | Cyclin-A2 | -65 |
| CCNB2 | G2/mitotic-specific cyclin-B2 | -64 |
| CDC20 | Cell division cycle protein 20 homolog | -42 |
| CDCA3 | Cell division cycle-associated protein 3 | -100 |
| CDCA7 | Cell division cycle-associated protein 7 | -100 |
| CHST13 | Carbohydrate sulfotransferase 13 | -100 |
| CKS1B | Cyclin-dependent kinases regulatory subunit 1;Cyclin-dependent kinases regulatory subunit | -30 |
| CSRP3 | Cysteine and glycine-rich protein 3 | -100 |
| ELOVL1 | Elongation of very long chain fatty acids protein 1 | -100 |
| ENO2 | Gamma-enolase;Enolase | -52 |
| ENO3 | Beta-enolase;Enolase | -100 |
| FAS | Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6 | -57 |
| FBXL6 | F-box/LRR-repeat protein 6 | -100 |
| FPGS | Folylpolyglutamate synthase, mitochondrial | -100 |
| Hmgb2 | High mobility group protein B3 | -34 |
| IFIT1 | Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1 | -100 |
| KIF20A | Kinesin-like protein KIF20A | -36 |
| KIF22 | Kinesin-like protein KIF22;Kinesin-like protein | -39 |
| MAD2L1BP | MAD2L1-binding protein | -84 |
| ME1 | NADP-dependent malic enzyme | -32 |
| MID1IP1 | Mid1-interacting protein 1 | -100 |
| MVD | Diphosphomevalonate decarboxylase | -62 |
| NAGPA | N-acetylglucosamine-1-phosphodiester alpha-N-acetylglucosaminidase | -88 |
| NFATC2IP | NFATC2-interacting protein | -41 |
| OIP5 | Protein Mis18-beta;Protein yippee-like | -100 |
| PKLR | Pyruvate kinase PKLR | -89 |
| PSTPIP2 | Proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 2 | -33 |
| RAD9A | Cell cycle checkpoint control protein RAD9A | -100 |
| RRM2 | Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2 | -40 |
| SERPINA3 | Alpha-1-antichymotrypsin;Alpha-1-antichymotrypsin His-Pro-less | -100 |
| SKP2 | S-phase kinase-associated protein 2 | -100 |
| SPC24 | Kinetochore protein Spc24 | -55 |
| SQLE | Squalene monooxygenase | -100 |
| TACC3 | Transforming acidic coiled-coil-containing protein 3 | -34 |
| TRUB2 | Probable tRNA pseudouridine synthase 2 | -100 |
| TTC39C | Tetratricopeptide repeat protein 39C | -67 |
| TYMS | Thymidylate synthase | -37 |

| | | |
|---|---|---|
| UBE2C | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 C | -36 |
| UBE2S | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 S | -44 |
| UBE2S | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 S | -44 |
| ZFPL1 | Zinc finger protein-like 1 | -69 |
| ZNFX1 | NFX1-type zinc finger-containing protein 1 | -90 |

## 4. Liste de protéines en aval d'eIF6 augmentées avec le siFLT3

| Gènes | Protéines | Pourcentage d'augmentation |
|---|---|---|
| DHCR7 | 7-dehydrocholesterol reductase | 31,1 |
| QPRT | Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase [carboxylating] | 31,7 |
| RPA2 | Replication protein A 32 kDa subunit | 32,5 |
| GMPPB | Mannose-1-phosphate guanyltransferase beta | 37,6 |
| NCAPG2 | Condensin-2 complex subunit G2 | 38,5 |
| PGP | Phosphoglycolate phosphatase | 39,8 |
| LSS | Lanosterol synthase | 41,1 |
| DAK | Bifunctional ATP-dependent dihydroxyacetone kinase/FAD-AMP lyase (cyclizing);ATP-dependent dihydroxyacetone kinase;FAD-AMP lyase (cyclizing) | 44,3 |
| RPUSD3 | RNA pseudouridylate synthase domain-containing protein 3 | 46,5 |
| ACSS2 | Acetyl-coenzyme A synthetase, cytoplasmic | 49,0 |
| TNFAIP2 | Tumor necrosis factor alpha-induced protein 2 | 51,8 |
| HIST1H2AB | Histone H2A type 1-C;Histone H2A type 3;Histone H2A type 1-B/E | 67,7 |
| IPO13 | Importin-13 | 73,9 |
| ADA | Adenosine deaminase | 81,8 |
| PYCRL | Pyrroline-5-carboxylate reductase 3;Pyrroline-5-carboxylate reductase | 82,7 |
| IRF5 | Interferon regulatory factor 5 | 108,1 |
| TGM1 | Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase K | 182,8 |
| H2AFX | Histone H2AX;Histone H2A type 1-A | 1502,7 |

Résumé en français :

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sont des hémopathies malignes caractérisées par une accumulation dans la moelle et le sang de progéniteurs hématopoïétiques bloqués dans un stade différenciation. La mutation FLT3-ITD, qui entraîne une activation constitutive du récepteur à activité tyrosine kinase FLT3, est retrouvée dans 20-25% des LAM et est associée à un mauvais pronostique. De nombreux inhibiteurs de FLT3 ont été développés et certains sont testés en clinique mais des études mettent en évidence l'apparition de résistance. Une meilleure compréhension des mécanismes oncogéniques de FLT3-ITD est donc nécessaire afin d'améliorer le traitement des LAM. Mes travaux de thèse ont été centrés sur l'analyse du processus autophagique qui correspond à l'un des mécanismes de résistance décrits dans les cellules cancéreuses en réponse aux traitements. Au cours de cette étude, nous avons constaté que l'expression de FLT3-ITD augmente l'autophagie basale des cellules de LAM, et que l'inhibition du récepteur réduit cette autophagie dans des échantillons primaires de LAM et dans des lignées cellulaires. Nous avons pu montrer que l'autophagie est requise pour la prolifération et la survie *in vitro* et *in vivo* des cellules de LAM et que sont ciblage permet de surmonté la résistance aux inhibiteurs de FLT3. De plus, nous avons identifié la protéine ATF4 comme un acteur essentiel au processus d'autophagie en aval de FLT3-ITD. Ces résultats suggèrent que le ciblage de l'autophagie ou d'ATF4 chez les patients exprimant les mutations de FLT3 peut représenter une stratégie thérapeutique prometteuse et innovatrice dans les LAM.

Résumé en anglais :

Acute myeloid leukemias (AMLs) are a family of hematological malignancies characterized by an accumulation in the marrow and blood of hematopoietic progenitors blocked in their differentiation process. The FLT3-ITD mutation is found in 20-25% of AMLs and is associated with a poor prognosis. Different FLT3 inhibitors have been developed and some of them are clinically tested but resistance to treatment has been observed in many patients. A better understanding of AML biology is necessary in order to improve the treatment of AMLs. My thesis project focused on the analysis of the autophagic process, which is one of the mechanisms described in the resistance of cancer cells. In this study, we found that the FLT3-ITD expression increases basal autophagy in AML cells, and that the receptor inhibition reduced this autophagy in primary patient samples and cell lines. We show that autophagy is required for proliferation and survival in vitro and in vivo of leukemic cells lines and inhibition of autophagy overcomes resistance to FLT3 inhibitors. In addition, we identified the ATF4 protein as a key actor of the autophagy process induced by the FLT3-ITD mutation. These results suggest that targeting autophagy or ATF4 may represent a promising and innovative therapeutic strategy for FLT3 mutated AMLs.