



**HAL**  
open science

# Nouvelles approches thérapeutiques dans les leucémies aiguës myéloïdes ayant des mutations des gènes de la voie RAS

Justine Decroocq

► **To cite this version:**

Justine Decroocq. Nouvelles approches thérapeutiques dans les leucémies aiguës myéloïdes ayant des mutations des gènes de la voie RAS. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Cité, 2019. Français. NNT : 2019UNIP5205 . tel-04403631

**HAL Id: tel-04403631**

**<https://theses.hal.science/tel-04403631v1>**

Submitted on 18 Jan 2024

**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 Paris Descartes**

École doctorale Hématologie, Oncogénèse et Biothérapies (HOB, ED 561)

**Thèse de Doctorat en Sciences**

**Spécialité Hématologie**

**Nouvelles approches thérapeutiques dans les  
leucémies aiguës myéloïdes ayant des mutations des  
gènes de la voie RAS**

**Justine DECROOCQ**

Equipe « Hématopoïèse normale et pathologique »  
Département Développement, Reproduction et Cancer  
Institut Cochin, INSERM U1016, Paris

**Directeur de thèse** : Pr Jérôme TAMBURINI

Présentée et soutenue publiquement le 10 septembre 2019

**Jury :**

Pr Valérie Bardet	Rapporteur
Dr Sophie Tartare-Deckert	Rapporteur
Pr Norbert Vey	Examineur
Dr Jean-Emmanuel Sarry	Examineur
Pr Christian Récher	Examineur

# Résumé

Ces dernières années ont connu de grandes avancées dans le domaine de la caractérisation moléculaire des leucémies aiguës myéloïdes (LAM). Malgré le développement clinique rapide de thérapies ciblées hautement actives dans certains sous-types de LAM comme ceux présentant des mutations des gènes *FLT3* ou *IDH1/2*, une majorité de cas ne disposent actuellement pas de cible moléculaire pertinente. Dans ce contexte, nous avons déterminé la fréquence des mutations activant la voie RAS au sein d'une cohorte de 127 patients atteints de LAM pour lesquels les traitements actuels sont insuffisamment actifs, c'est-à-dire après avoir exclu les cas caractérisés par un score ELN favorable ou une mutation *FLT3-ITD*. En utilisant un panel personnalisé de séquençage de nouvelle génération, nous avons détecté au moins une altération dans 50 échantillons de LAM (40%). Nous avons identifié 17 cas (14,8%) de mutations/délétions de *NF1*, et des mutations des gènes *NRAS*, *KRAS*, *PTPN11*, *CBL* et *BRAF* ont été détectées dans 13 (10,4%), 10 (8%), 9 (7,2%), 5 (4%) et 2 (1,6%) cas, respectivement. Des mutations des gènes *RAF1*, *RASA1*, *SOS1* et *MAP2K2* ont été observées une fois chacune. De plus, des mutations concomitantes d'acteurs de la voie RAS étaient présentes dans neuf échantillons. L'analyse des fréquences d'allèles variants nous permet de suggérer que ces altérations de la voie RAS peuvent, soit faire partie du clone leucémique principal, soit survenir dans des sous-clones. En les analysant de manière globale, les altérations de la voie RAS sont plus volontiers associées à des marqueurs de prolifération cellulaire (leucocytose, pourcentage de blastes et taux de LDH) chez les patients. De plus, ces anomalies sont associées à une diminution de la survie globale, en particulier parmi le sous-groupe de patients ayant un score ELN intermédiaire. Nous avons ensuite établi des modèles robustes d'activation de la voie RAS/MAPK, par délétion de *NF1* et expression de *NRAS*<sup>G12D</sup> dans des lignées cellulaires dépendantes de facteurs de croissance. Nous avons pu montrer une addiction oncogénique à la voie RAS dans ces différents modèles, définie par une prolifération cellulaire indépendante des facteurs de croissance, une augmentation de l'activité de RAS, une propagation plus rapide dans des souris immunodéficientes et une sensibilité accrue aux inhibiteurs de MEK *in vitro* et *in vivo*. Lors d'un criblage pharmacologique à forte densité comportant une majorité de molécules approuvées en thérapeutique humaine, nous avons identifié le pyrvinium pamoate, actuellement utilisé comme anti-helminthique, comme étant particulièrement cytotoxique vis-à-vis des cellules ayant une altération de la voie RAS, y compris dans des échantillons de patients atteints de LAM. De plus, nous avons observé une synergie entre le tramétinib (un inhibiteur de MEK) et le pyrvinium pamoate, ce dernier pouvant agir sur des mécanismes de résistance induits par l'inhibition de MEK. Nos résultats suggèrent que le développement clinique du pyrvinium pamoate pourrait représenter une nouvelle opportunité thérapeutique dans les LAM ayant une altération de la voie RAS.

# Abstract

Recent advances led to the exhaustive characterization of acute myeloid leukemia (AML) molecular landscape. Despite the rapid clinical development of breakthrough targeted therapies in selected AML subtypes, such as those harboring *FLT3* or *IDH1/2* mutations, a majority of AML cases still lack therapeutically actionable targets.

In 127 AML cases with unmet therapeutic needs, as defined by the exclusion of ELN favorable cases and of *FLT3-ITD* mutations, we characterized the occurrence of RAS activating pathway alterations. Using a customized targeted next-generation sequencing (NGS), we observed 50 (40%) RAS pathway gene alterations in our cohort. We identified 17 (14.8%) *NF1* mutations/deletions, and *NRAS*, *KRAS*, *PTPN11*, *CBL* and *BRAF* variants were detected in 13 (10.4%), 10 (8%), 9 (7.2%), 5 (4%) and 2 (1.6%) cases, respectively. Mutations in *RAF1*, *RASA1*, *SOS1* and *MAP2K2* were observed in a single case each. These RAS pathway alterations may be found in the main leukemic clone, as well as in subclones, as extrapolated from variant allele frequencies analysis. Concurrent RAS pathway mutations were observed in nine samples. When considered as a whole, RAS pathway alterations were associated with higher clinical proliferation markers (elevated white blood cell count, blast cell percentage and LDH levels), and correlated with reduced survival probability, particularly within ELN intermediate AML subgroup. We established robust models of RAS/MAPK activation by inducing *NF1* genetic disruption or *NRAS*<sup>G12D</sup> expression in growth factor (GF)-dependent cell lines. In these cells, oncogenic addiction to the RAS pathway was assessed by GF-independent growth, increased RAS activity, faster propagation in immunocompromised mice and an exquisite sensitivity to pharmacological MEK inhibition *in vitro* and *in vivo*. From a high-density pharmacological screen with FDA-approved molecules, we identified pyrvinium pamoate, an anti-helminthic agent as preferentially active in RAS-activated cells. This compound strongly decreased cell viability and colony formation in primary AML samples with RAS pathway alterations. Moreover, we observed a synergy between trametinib and pyrvinium pamoate, suggesting that pyrvinium may alleviate MEK inhibition-induced resistance feedbacks including in samples from AML patients.

Our current data suggest that the clinical development of pyrvinium pamoate in RAS pathway mutated AML may represent a meaningful opportunity for future patient's care.

# Remerciements

Tout d'abord un grand merci à mon directeur de thèse le Pr Jérôme Tamburini, sans qui je ne me serais jamais lancée dans cette grande aventure. Merci d'avoir été un soutien et un guide de tous les instants, tant sur le plan scientifique que personnel. Ces trois années ont été très enrichissantes et m'ont apporté le goût pour la science que je ne suis pas prête d'abandonner.

Je remercie les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail :

- Merci au Pr Valérie Bardet et au Docteur Sophie Tartare-Deckert qui m'ont fait l'honneur d'avoir accepté d'évaluer mon travail en tant que rapporteurs.
- Merci au Pr Norbert Vey, au Dr Jean Emmanuel Sarry et au Pr Christian Récher qui m'ont fait l'honneur d'avoir accepté de faire partie de mon jury et d'avoir examiné mon travail.

Je remercie le Pr Didier Bouscary, le Dr Patrick Mayeux et le Pr Michaëla Fontenay de m'avoir accueillie dans leur équipe.

Je remercie également toutes les personnes qui ont participé à ce travail :

- Jordi Mano et Rudy Birsén qui ont initié le projet. Et Rudy qui a poursuivi en m'aidant tout au long de ma thèse et en réalisant, entre autres, le criblage de la banque Selleckchem.
- Le Pr Olivier Kosmider qui a beaucoup contribué au côté biologie moléculaire du projet avec ses conseils techniques et scientifiques. Bien sûr, le Dr Anne Sophie Alary qui m'a énormément aidée, qui a retrouvé et coordonné la distribution de tous les ADNs et qui était disponible pour répondre à toutes mes nombreuses questions. Merci également au Dr Chloé Friedrich qui a pris le relais.
- Le Dr Eric Pasmant qui a réalisé le séquençage NF1 et PRC2, m'a initié à l'analyse du séquençage NGS et beaucoup aidé dans l'interprétation des résultats.
- La plateforme de Genomic de l'institut Cochin qui a réalisé le séquençage RASopathies et en particulier Brigitte Izac et Franck Letourneur.
- Guillemette Fouquet, le Dr Ivan Moura et le Pr Olivier Hermine qui m'ont permis de réaliser les premières expériences *in vivo* à Imagine. Merci énormément à Guillemette !
- L'équipe de pharmacologie de Curie qui m'a permis de réaliser le criblage pharmacologique : le Dr Elaine Del Nery, Adèle Soria, Amandine Ferrand et Aurianne Lescure.
- Mathilde Gotanègre et le Dr Jean Emmanuel Sarry qui m'ont accueillie à Toulouse pour des expériences de souris qui porteront leur fruit pour l'article !
- Laury Poulain qui a réalisé les expériences de Seahorse et qui m'aide dans le dédale de l'univers du métabolisme.
- Le Dr Nicolas Chapuis qui m'a fourni de précieux conseils de tri cellulaire et les images de frottis médullaires.
- Le Dr Isabelle Radford et son équipe qui ont réalisé les FISH pour toute la cohorte de patients.
- Le Dr Camille Gobeaux grâce à qui j'ai pu doser glucose et lactates.
- La plateforme de cytométrie et en particulier Karine Bailly et Patrice Valin.
- Le Pr Didier Bouscary et le Pr Olivier Hermine sans qui je n'aurais pas eu accès aux prélèvements des patients.

Merci à mes incroyables co-thésards de l'équipe LAM qui ont mis du soleil dans ma vie, tous les jours de ces trois années : Adrien pour ta gentillesse, nos confidences et ton grain de folie ; Fetta pour notre complicité et ton rire ; Rudy et notre passion commune pour les livres audio en manipulant et Johanna la bostonnienne pour ton optimisme et ton sourire.

Merci à mes formidables co-thésards du reste de l'équipe : la folle équipe des filles Salomé, Sabrina et Meriem, la team shoot contest Ismaël, Charles et Rudy, à Cyrielle, Pierre, Gabriel, aux petites nouvelles Zubaidan et Samia. En vrac, merci pour votre soutien, pour tous les fous-rires, les shoot contests, les déjeuners plats-picard, les bières au Val Royal, les vidéos de folie, les larmes, les western blot brûlés, les cellules infectées, les confidences, le Typhoon, les tenues sac-poubelle pluie, la classe de nature à Dourdan, les gros grecs, les journées rangement, les conseils littéraires et cinématographiques, les angoisses fortésiennes, les siestes horribles, les cultures d'orchidées, les débats passionnés et j'en passe !

Merci à tous les membres de l'équipe, présents, passés, et futurs pour leur soutien sans faille, leurs aides techniques, leur bonne humeur qui fait l'ambiance de notre équipe rock'n roll du 7<sup>ème</sup> étage de Roussy: Carine Lefèvre, Frédérique Verdier, Lamya Haddaoui, Patrick Mayeux, Frédéric Pendino, Yaël Zermati, Evelyne Lauret, Isabelle Dusanter, Maria Lilia Brassard, Sandra Pinto, Amandine Houvert, Alice Rousseau, Shanti, Christophe, Mireille Lambert, Françoise Levavasseur, Marjorie Leduc et Camille Knosp. Merci à tous les M2 qui ont croisé ma route, Maya Belhadj, Florian Chevillon, Myriam Hormi, Thomas Nivet, Tony Montana, Agathe Boussaroque.

Merci à mes amis qui sont présents pour moi tous les jours et ont été un soutien pendant les moments difficiles et en particulier : ma Paola et Loulou, mes parisiens chéris Chach', Marine et Yoyo et Gus et Yacine, les pyrs, Oliv et Juju & co, les POsiens, Capu, Louise, Amélie, Lise et Guigui et le trio EP7.

Merci à toute ma famille. Merci à mon Papa, ma Maman et à ma Mamie d'être les piliers de ma vie. Merci à mes sœurs adorées Camille et Marion, et merci à Guillaume mon plus grand soutien.

Et enfin, spéciale dédicace à des peut-être futurs chercheurs en herbe: Léon, Simon, Alma et Isaac <3

# Sommaire

<b>Résumé.....</b>	<b>3</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>4</b>
<b>Remerciements .....</b>	<b>5</b>
<b>Sommaire .....</b>	<b>7</b>
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>10</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>14</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>15</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>16</b>
<b>I. Les leucémies aiguës myéloïdes .....</b>	<b>16</b>
A. Généralités sur les leucémies aiguës myéloïdes .....	16
1. Epidémiologie, généralités et diagnostic .....	16
2. Classification pronostique .....	18
3. Traitement.....	21
B. Leucémogénèse.....	26
4. Généralités .....	26
5. Cellules souches pré-leucémiques et hématopoïèse clonale.....	31
6. Cellules souches leucémiques .....	34
7. Micro-environnement .....	34
8. Signalisation tumorale et altération du métabolisme.....	35
<b>II. L'oncoprotéine RAS en physiologie et en pathologie oncologique humaine.....</b>	<b>36</b>
A. Propriétés et structure des protéines RAS .....	36
B. Ancrage à la membrane .....	37
C. Activation et inactivation : la commutation.....	40
D. Le rôle des GEFs.....	41
E. Le rôle des GAPs .....	43
F. Les effecteurs de RAS .....	44

1.	Généralités .....	44
2.	La voie RAF/MAPK .....	46
3.	La voie PI3K/AKT.....	57
4.	La voie RALGDS.....	59
5.	Les autres effecteurs .....	59
G.	La neurofibromine .....	60
1.	Structure et fonction .....	60
2.	Régulation de la neurofibromine .....	61
H.	La voie RAS en oncologie.....	61
1.	Mutations germinales de la voie RAS et prédispositions aux cancers .....	61
2.	Implications de RAS dans l'oncogénèse .....	64
3.	Autres mutations de la voie RAS en oncologie.....	71
I.	Cibler la voie RAS.....	72
1.	Cibler les modifications post traductionnelles .....	73
2.	Cibler directement RAS .....	74
3.	Utiliser la létalité synthétique .....	75
4.	Cibler le métabolisme.....	75
5.	Agir sur les voies de signalisation en aval .....	75
6.	Agir sur la voie de signalisation en amont.....	77
7.	Activer le système immunitaire.....	78
<b>III.</b>	<b>La voie RAS et ses partenaires dans les leucémies aiguës myéloïdes.....</b>	<b>78</b>
A.	Épidémiologie et architecture clonale .....	78
1.	Les mutations de RAS .....	78
2.	Les altérations de NF1 .....	79
3.	Les mutations de <i>PTPN11</i> .....	80
B.	Le rôle de RAS dans la leucémogénèse .....	81
1.	Le cas des LMMJ .....	81
2.	Rôle de la voie RAS dans l'initiation de la LAM grâce à l'expérience des modèles murins	82



3. Rôle de la voie RAS dans le maintien des cellules de LAM.....	88
4. Impact pronostic des mutations de la voie RAS.....	91
5. Thérapies ciblées dans les LAM mutées RAS/ NF1.....	91
<b>Objectifs .....</b>	<b>96</b>
<b>Résultats.....</b>	<b>98</b>
<b>Discussion.....</b>	<b>146</b>
<b>Conclusions et perspectives .....</b>	<b>152</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>155</b>

# Liste des abréviations

AA : Acide aminé

ADMA : Diméthylarginine asymétrique

Allo-CSH: Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

BCL2: B-cell leukaemia/lymphoma-2

CART cells: Lymphocytes T avec récepteur chimérique à l'antigène

CBF: *Core binding factor*

CDC25-HD : *CDC25 homology-domain*

CDK : Cycline dépendante kinase

CFC : Syndrome cardio-facio-cutané

CHIP : Hématopoïèse clonale de potentiel indéterminé

CKI : Inhibiteurs de kinases dépendantes des cyclines

CM-AVM : Syndrome de malformations artérioveineuses malformations capillaires

CN: Caryotype normal

CNK : Connecteur de l'activateur KSR

Complexe SCF : *Skp, Cullin, F-box containing complex*

CRD : *Cystein rich domain*

CSH : Cellules souches hématopoïétiques

CSM : Cellules souches mésenchymateuses

CSRD: *Cystein and serin rich domain*

DAG : Diacylglycérol

DDHA1 : Diméthylarginine diméthylminohydroxylase 1

DL : Domaine de liaison

DLI: Injections de lymphocytes du donneur

DLV : Domaine de liaison variable

DMBA : 7,12-dimethylbenz[a]anthracene

DPSYL2 : *Dihydropyrimidase-related protein 2*

DUSP : Phosphatase à spécificité double

EBMT: *l'European Group of Blood and Marrow Transplantation*

ELN: *European LeukemiaNet*

ERK: *extracellular signal-regulated kinase*

ETP: *Enhancer of trithorax and polycomb*

FAF2: *FAS-associated factor 2*

FAK: *focal adhesion kinase*

FDA: *Food and drug administration*

FLT3-ITD: *Fms like tyrosine kinase 3- Internal tandem duplication*

FOXO: *Forkhead box O*

FRET: transfert d'énergie par résonance fluorescente

FT : Facteur de transcription

FTI: Inhibiteur de farnesyltransferase

GAP: *GTPase activating protein*

GDI: *Guanine nucleotide dissociation inhibitor*  
GDP: Guanosine diphosphate  
GEF: *Guanosine exchange factor*  
GIST : tumeur stromale gastro-intestinale  
GCSF : *Granulocyte-colony-stimulating factor*  
GPCR: Récepteurs couplés à une protéine G  
GTP : Guanosine triphosphate  
GVH: Maladie du greffon contre l'hôte

H3K27me3: Triméthylation de la lysine 27 de l'histone 3  
HCT-CI: *Hematopoietic cell transplantation comorbidity index*

ICMT: isoprenylcystein-carboxyl-methyltransferase  
IDH1 / IDH2: Isocitrate deshydrogénase 1 / isocitrate deshydrogénase 2  
IP3 : inositol (1,4,5)-triphosphate

KDM1A: Lysine déméthylase 1A  
KO : *Knock out*  
KSR1 et 2 : Kinase suppresseur de RAS 1 et 2

LAL : Leucémie aiguë lymphoblastique  
LAM: Leucémie aiguë myéloïde  
LAP: Leucémie aiguë promyélocytaire  
LMC : Leucémie myéloïde chronique  
LMMC : Leucémie myélomonocytaire chronique  
LMMJ : Leucémie myélomonocytaire juvénile  
LIMK2 : *LIM domain kinase 2*  
LSC : Cellules souches leucémiques

MAPK : *Mitogen-activated protein kinase*  
ME : Micro-environnement  
MEF : Fibroblastes embryonnaires murins  
MEK : MAP/ERK kinase-1  
MLK : Kinase de lignage mixte  
MNR: Mortalité non liée à la rechute  
MP1 : MEK-partenaire 1  
MRD: Maladie résiduelle  
mTORC1 : *Mammalian Target of Rapamycin Complex 1*  
mTORC2 : *Mammalian Target of Rapamycin Complex 2*

NF1: Neurofibromine  
NPM1: Nucléophosmine  
NSML : Syndrome de Noonan avec multiples lentigines

OMS: Organisation mondiale de la santé

PAK1 : Kinase activée p21  
PD-1 : *Programmed cell death-1*  
PD-L1 : *Programmed death ligand-1*

PCMRLP : Protéine contenant un motif riche en leucines pentatricopeptide  
PDE $\delta$  : Enzyme phosphodiesterase  $\delta$   
PDK1 : Pyruvate kinase deshydrogenase 1  
PGC1 $\alpha$  : *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 $\alpha$*   
PEA15 : Phosphoprotéine enrichie en astrocytes  
PH : *Pleckstrin homology*  
PI(4,5)P2 : Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate  
PI(4)P : Phosphatidylinositol (4)-phosphate  
PI(3,4,5)P3 ou PIP3: Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate  
PI(3,4)P2 : Phosphatidylinositol (3,4)-bisphosphate  
PI3K : *Phosphoinositide 3 kinase*  
pI-pC : *Polyinosinic-polycytidylic acid*  
PKC : *Protein Kinase C*  
PP1 : Protéine phosphatase 1  
PP2A : Protéine phosphatase 2  
PPA : Protéine précurseur de l'amyloid- $\beta$  (A4)  
pRB : protéine de rétinoblastome  
PRC2 : Complexe *polycomb repressor 2*  
PS: *Performance status*  
PTEN : *Phosphatase and tensin homolog*  
PTP : Phosphotyrosine phosphatase

RA : *RAS associating domain*  
RALGDS: *Ral guanine nucleotide dissociation stimulator*  
RBD : *RAS binding domain*  
RC: Rémission complète  
RCE1 : *Ras converting CAAX endopeptidase 1*  
REM : *Ras exchange motif*  
RG : Réponse globale  
RKIP : *Raf kinase inhibitor*  
RNA seq: *RNA sequencing*  
ROS : Espèces réactives de l'oxygène  
R/R : réfractaire ou en rechute  
RRN : Région régulatrice négative  
RSK : *Ribosomal S6 kinase*  
RTK : Récepteur à tyrosine kinase

SCF: *Stem cell factor*  
SEN: Séquence d'export nucléotidique  
SG: Survie globale  
SHP2 : *Src homology 2-containing phosphotyrosine phosphatase*  
SMD: Syndrome myélodysplasique  
SMP: Syndrome myéloprolifératif  
SPR: *Sprouty-related C-terminal cystéine-rich*  
SPRED: *Sprouty-related, EVH1 domain-containing protein 1*  
SOS: *Son of sevenless*

TCGA: *Cancer Genome Atlas*  
TCF: Facteur à complexe ternaire

VAF: Variation de fréquences alléliques  
VCP : *Valosine-containing protein*

WES: *Whole exome sequencing*  
WGS: *Whole genome sequencing*  
WT : *Wild type*

# Liste des tableaux

<b>Tableau 1 : Classification cytogénétique des LAM selon le MRC d’après (Grimwade et al. 2010) ....</b>	<b>19</b>
<b>Tableau 2 : Classification génétique des LAM selon l’ELN d’après (Döhner et al. 2017) .....</b>	<b>20</b>
<b>Tableau 3 : Recommandations d’allo-CSH dans les LAM en RC1 selon (Cornelissen and Blaise 2016). .....</b>	<b>23</b>
<b>Tableau 4 : Fréquence des mutations de <i>RAS</i> et des différents isoformes parmi les cancers les plus fréquemment mutés selon (Cox et al. 2014) .....</b>	<b>65</b>
<b>Tableau 5 : Pourcentage des mutations de <i>KRAS</i>, <i>NRAS</i>, <i>HRAS</i>, <i>PTPN11</i> et <i>NF1</i> dans les LAM, SMD, LMMJ, LMMC. ....</b>	<b>79</b>
<b>Tableau 6 : Principaux modèles murins d’hémopathies caractérisées par des mutations de <i>KRAS</i>, <i>NRAS</i>, <i>NF1</i> ou <i>PTPN11</i> .....</b>	<b>87</b>
<b>Tableau 7 : Réponse cliniques aux inhibiteurs de MEK dans les études portant sur les LAM .....</b>	<b>94</b>

# Liste des figures

<b>Figure 1 : Fréquence des mutations et altérations génétiques driver parmi une population de 1540 patients présentant une LAM. ....</b>	<b>17</b>
<b>Figure 2 : 1540 patients répartis dans les groupes génomiques établis par Papaemmanuil <i>et al.</i> selon (Bullinger, Döhner, and Döhner 2017). ....</b>	<b>18</b>
<b>Figure 3 : Fonction des gènes les plus fréquemment mutés dans les LAM d'après (Döhner, Weisdorf, and Bloomfield 2015) ....</b>	<b>28</b>
<b>Figure 4 : Leucémogénèse par acquisition séquentielle de mutations selon (Corces-Zimmerman <i>et al.</i> 2014; Hirsch <i>et al.</i> 2016) ....</b>	<b>33</b>
<b>Figure 5 : Les 4 isoformes de RAS d'après (Ryan and Corcoran 2018) ....</b>	<b>37</b>
<b>Figure 6 : Modifications post traductionnelles de RAS d'après (Cox <i>et al.</i> 2014) ....</b>	<b>39</b>
<b>Figure 7 : Action des GEF selon (Vetter and Wittinghofer 2001; Bos, Rehmann, and Wittinghofer 2007) ....</b>	<b>42</b>
<b>Figure 8 : RAS et ses principaux effecteurs ....</b>	<b>46</b>
<b>Figure 9 : Représentation des domaines de KSR1 et CRAF d'après (Kolch 2005) ....</b>	<b>48</b>
<b>Figure 10 : Isoformes de MEK selon (Caunt <i>et al.</i> 2015) ....</b>	<b>49</b>
<b>Figure 11 : La voie RAF/MAPK et sa régulation par KSR d'après (Kolch 2005) ....</b>	<b>52</b>
<b>Figure 12 : Régulation négative de la voie RAF/MAPK selon (Caunt <i>et al.</i> 2015) ....</b>	<b>54</b>
<b>Figure 13 : Voie de signalisation PI3K/AKT et ses effecteurs ....</b>	<b>58</b>
<b>Figure 14 : Structure de la Neurofibromine et interactions protéiques connues selon (Ratner and Miller 2015) ....</b>	<b>60</b>
<b>Figure 15 : Rasopathies selon (Ratner and Miller 2015) ....</b>	<b>62</b>
<b>Figure 16 : Conséquences des mutations de RAS, activation et régulation de nombreux mécanismes caractéristiques du cancer ....</b>	<b>67</b>
<b>Figure 17 : Cibles thérapeutiques pour inhiber la voie RAS dans les cancers humains selon (Ryan and Corcoran 2018) ....</b>	<b>73</b>

# Introduction

## I. Les leucémies aiguës myéloïdes

### A. Généralités sur les leucémies aiguës myéloïdes

#### 1. Epidémiologie, généralités et diagnostic

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sont des hémopathies malignes hétérogènes, caractérisées par la prolifération de cellules hématopoïétiques immatures dénommées blastes, ayant acquis des mutations et/ou des réarrangements chromosomiques leur conférant un avantage prolifératif et un défaut de différenciation et qui envahissent la moelle osseuse et le sang (Döhner, Weisdorf, and Bloomfield 2015). En Europe, 3,7 personnes pour 100 000 habitants sont atteintes de LAM chaque année (Visser et al. 2012).

Le diagnostic de LAM est porté devant une symptomatologie clinique pouvant associer : insuffisance médullaire (anémie, thrombopénie et infections liées à la neutropénie), syndrome de leucostase (en cas d'hyperleucocytose), coagulation intravasculaire disséminée et syndrome tumoral. Sur le plan biologique, il existe sur l'hémogramme des cytopénies associées à la présence de blastes circulants, et dans certains cas, une hyperleucocytose constituée de blastes.

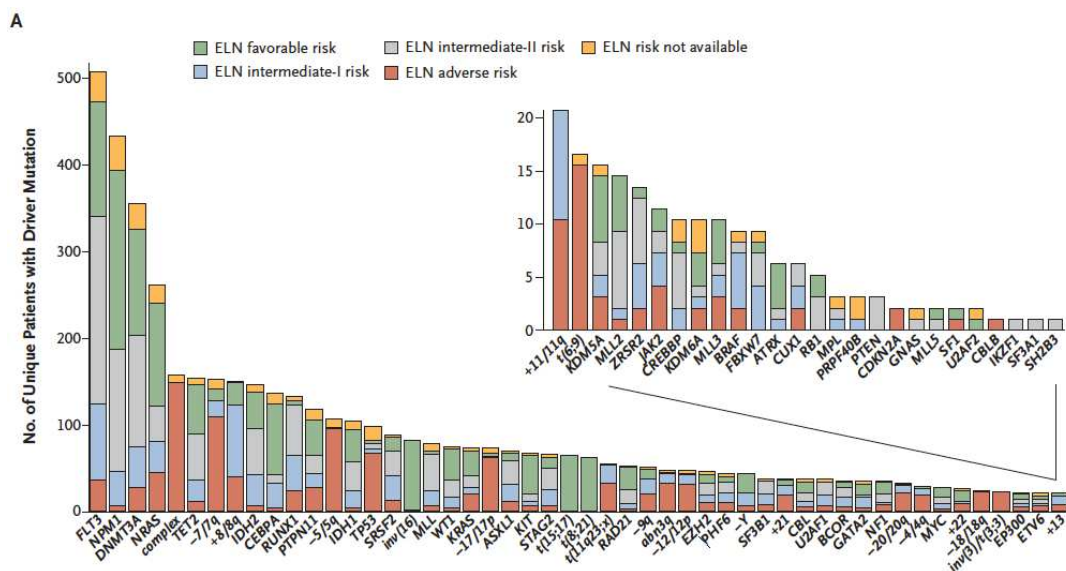
L'organisation mondiale de la santé (OMS) retient comme définition de la LAM la présence d'au moins 20% de blastes, évalués morphologiquement sur un frottis médullaire ou sanguin (Arber et al. 2016). Le caractère myéloïde est apprécié par la présence de corps d'Auer, la positivité du marquage cytochimique de la myéloperoxydase, et sur l'immunophénotypage qui permet de confirmer la présence de blastes CD33+, CD13+. L'âge médian de survenue de la maladie se situe autour de 70 ans (Juliusson et al. 2012; Nagel et al. 2017) et il existe peu de facteurs prédisposants connus. A ce titre on peut quand même citer : l'exposition à des toxiques comme les benzènes (Khalade et al. 2010), l'existence d'un syndrome myélodysplasique ou myéloprolifératif préalable, le fait d'avoir reçu un traitement de chimio- ou radiothérapie pour un précédent cancer (Pedersen-Bjergaard et al. 2008) certaines prédispositions génétiques comme le syndrome de Down, la maladie de Fanconi, la dyskératose congénitale, l'anémie de Blackfan-Diamond, le Syndrome de Wiskott-Aldrich, la neurofibromatose de type 1, ou encore, plus récemment identifiées, les mutations germinales de *GATA2*, *RUNX1*, *ETV6* ou *CEBPA* (Spinner et al. 2014; Churpek et al. 2015; Tawana et al. 2015).

L'ancienne classification morphologique FAB (J. M. Bennett et al. 1976) a été remplacée depuis de nombreuses années par la classification de l'OMS, dont la dernière version date de 2016 et qui permet



- de classer les LAM grâce à leurs caractéristiques morphologiques, cytogénétiques, moléculaires et cliniques en 8 sous-catégories clinico-pathologiques (Arber et al. 2016). Elle comprend :
- les LAM avec anomalies génétiques récurrentes : LAM avec t(8;21), LAM avec inv(16), leucémie aiguë promyélocytaire (LAP ou LAM avec t(15;17)), LAM avec t(9 ;11), LAM avec t(6;9), LAM avec inv(3) ou t(3;3), LAM avec t(1;22), LAM avec mutation de *NPM1*, LAM avec mutations de *CEBPA* bialléliques et deux entités provisoires (LAM avec mutation de *RUNX1* et LAM avec *BCR-ABL*)
  - les LAM avec anomalies en relation avec une myélodysplasie
  - les LAM secondaires à un traitement
  - les LAM sans autres particularités
  - les sarcomes myéloïdes
  - les proliférations myéloïdes en rapport avec un syndrome de Down
  - les leucémies à cellules dendritiques plasmocytoïdes
  - les leucémies aiguës de lignage ambigu

Cependant, des mutations dans de nombreux gènes ne sont pas prises en compte dans cette classification. Parmi les gènes les plus fréquemment mutés, chez l'adulte, on relève *NPM1* (25 à 30% des patients), *FLT3 ITD* (20 à 25% des patients), *DNMT3A* (15 à 30%), *IDH1* (6 à 10%) et *IDH2* (5 à 25%), *NRAS* (10-15%), *CEBPA* (5 à 10%), *TET2* (5 à 25%), *RUNX1* (5 à 20%), *TP53* (5 à 20%), *ASXL1* (5 à 18%), *KIT*, *MLL*, *SRSF2*, *SF3B1*, *WT1*, *NF1*, *KRAS*, *PTEN* etc.



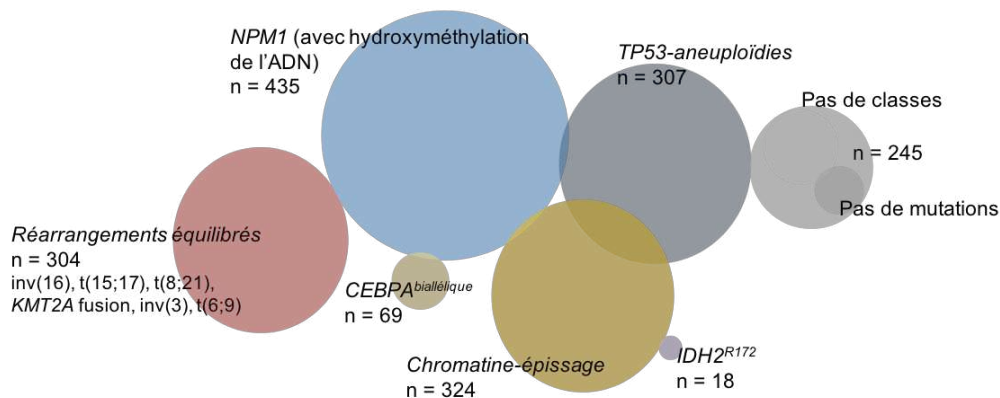
**Figure 1 : Fréquence des mutations et altérations génétiques driver parmi une population de 1540 patients présentant une LAM.**

Les patients sont classés selon leur groupe de risque génétique selon la classification de l'ELN d'après (Papaemmanuil et al. 2016).

En 2016, Papaemmanuil *et al.* ont proposé une classification entièrement génomique basée sur l'analyse de séquençage ciblé de 111 gènes et d'anomalies cytogénétiques sur 1540 patients inclus

dans 3 essais thérapeutiques (Papaemmanuil et al. 2016). Ils ont retrouvé des mutations « driver » (conductrices) dans 76 gènes ou régions génomiques (Figure 1).

Onze sous-groupes sans recouvrements ont été constitués (Figure 2): LAM avec mutation de *NPM1*, LAM avec mutations de gènes régulant l'état de la chromatine ou de l'épissage, LAM avec mutations de *TP53* ou des aneuploïdies, LAM avec *inv(16)*, LAM avec mutations biallélique de *CEBPA*, LAP, LAM avec *t(8;21)*, LAM avec gènes de fusion impliquant *KMT2A*, LAM avec *inv(3)*, LAM avec mutation *IDH2<sup>R172</sup>*, LAM avec *t(6;9)* et enfin, LAM non classables et LAM sans mutation conductrice. Contrairement à la classification de l'OMS, cette dernière revêt également un intérêt pronostique.



**Figure 2 : 1540 patients répartis dans les groupes génomiques établis par Papaemmanuil *et al.* selon (Bullinger, Döhner, and Döhner 2017).**

Les LAP, grâce à l'existence d'un traitement ciblé différenciant (l'association acide tout-trans-rétinoïque/ trioxyde d'arsenic) ont un pronostic excellent. Le traitement des autres LAM reste à l'heure actuelle plus compliqué, avec une survie globale (SG) chez les patients jeunes éligibles à une chimiothérapie intensive, toutes catégories confondues de 40% à 5 ans, et de 10% chez les patients de plus de 60 ans (Büchner et al. 2012; Juliusson et al. 2012). Établir un pronostic précis pour chaque patient est essentiel dans le traitement des LAM afin d'adapter l'intensité du traitement et de mesurer le risque de mortalité non liée à la rechute (MNR) qu'il est possible de prendre pour un patient donné. Ce pronostic dépend de plusieurs variables : le patient, les caractéristiques de la LAM, la réponse au traitement.

## 2. Classification pronostique

### **Facteurs liés au patient**

La médiane d'âge de survenue d'une LAM se situe autour de 70 ans, et un âge avancé est fortement corrélé à une survie réduite (Juliusson et al. 2012) . L'explication est multifactorielle, ces patients ayant plus volontiers des comorbidités et des caractéristiques défavorables de la maladie (cytogénétique

défavorable, *performance status* (PS) élevé, LAM secondaire) (Büchner et al. 2009; Østgård et al. 2015; Walter et al. 2015).

### **Caractéristiques de la maladie**

Environ 45% des patients au diagnostic présentent des anomalies cytogénétiques. Ces anomalies constituent un facteur pronostique majeur, connu depuis de nombreuses années. La classification la plus utilisée est celle révisée du *Medical Research Council* « MRC » anglais publiée en 2010 et établie à partir de 5876 patients (Grimwade et al. 2010) (Tableau 1).

Groupe cytogénétique	Anomalies
Favorable	t(15;17)(q22;q21) t(8;21)(q21;q21) inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)
Intermédiaire	Entités non classées favorables ou défavorables
Défavorable	abn(3q) [t(3;5)(q21~25;q31~35) exclue] inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26) add(5q), del(5q), -5 -7, add(7q)/del(7q) t(6;11)(q27;q23) t(10;11)(p11~13;q23) t(11q23) [t(9;11)(p21~22;q23) et t(11;19)(q23;p13) exclues] t(9;22)(q34;q11) -17/abn(17p) Complexe (≥ 4 anomalies)

**Tableau 1 : Classification cytogénétique des LAM selon le MRC d'après (Grimwade et al. 2010)**

Elle distingue les anomalies cytogénétiques récurrentes t(15;17), t(8;21) et inv(16) ou t(16;16), qui sont associées à un pronostic favorable, des anomalies associées à un pronostic défavorable qui comprennent en autres, les anomalies du chromosome 3, des pertes partielles ou complètes des chromosomes 5, 7 ou 17, les remaniements du gène *KMT2A* (anciennement appelé *MLL*) ou l'existence d'un caryotype complexe (≥4 anomalies cytogénétiques). L'absence d'anomalie cytogénétique ou la présence d'anomalies non listées dans le Tableau 1 sont associées à un pronostic dit « intermédiaire ». Avec l'avènement de la génétique à haut débit, une classification plus précise réalisée par l'*European LeukemiaNet* (ELN) et révisée en 2017, permet de mieux différencier les devenir des patients grâce aux anomalies oncogénétiques (Döhner et al. 2017) (Tableau 2). Elle prend en compte, en plus des anomalies cytogénétiques décrites précédemment, la présence des mutations de *NPM1* codant pour la nucléophosmine en association ou non à la duplication en tandem du gène du récepteur *Fms like tyrosine kinase 3* (FLT3) (*FLT3-ITD*) de ratio faible ou élevé, la présence des mutations bi-alléliques de

*CEBPA*, la présence d'un caryotype monosomal, et la présence des mutations de *TP53*, *RUNX1* et *ASXL1*.

Groupe Génétique	Caractéristiques
Favorable	t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
	inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
	<i>NPM1</i> muté sans mutation <i>FLT3-ITD</i> ou avec <i>FLT3-ITD</i> ratio faible†
	Mutation <i>CEBPA</i> bi-allélique
Intermédiaire	Mutation <i>NPM1</i> et <i>FLT3-ITD</i> ratio élevé †
	<i>NPM1</i> sauvage sans mutation <i>FLT3-ITD</i> ou avec <i>FLT3-ITD</i> ratio faible† (sans risque génétique défavorable)
	t(9;11)(p21.3;q23.3) ; <i>MLLT3-KMT2A</i> ‡
	Anomalies cytogénétiques non classées favorables ou défavorables
Défavorable	t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i>
	t(v;11)(v;q23.3); <i>KMT2A</i> réarrangé
	t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i>
	inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2) ; <i>GATA2,MECOM (EVI1)</i>
	-5 ou del(5q) ; -7 ; abn(17p)
	Caryotype complexe §, caryotype monosomal II
	<i>NPM1</i> sauvage et <i>FLT3-ITD</i> ratio élevé†
	<i>RUNX1</i> muté¶
	<i>ASXL1</i> muté¶
	<i>TP53</i> muté#

**Tableau 2 : Classification génétique des LAM selon l'ELN d'après (Döhner et al. 2017)**

† Ratio allélique faible (<0,5) ; ratio allélique élevé (≥0,5) la mesure semi quantitative du ratio allélique *FLT3-ITD* (en utilisant une analyse de fragments d'ADN) est déterminée en utilisant le ratio de l'aire sous la courbe « *FLT3-ITD* » divisée par l'aire sous la courbe « *FLT3-sauvage* ».

‡ La présence d'une t(9;11)(p21.3;q23.3) prend le dessus sur une rare mutation d'un gène du risque défavorable associée.

§ Trois ou plus anomalies chromosomiques en l'absence d'une translocation récurrente ou inversion définies par l'OMS : t(8;21), inv(16) ou t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23.3), t(6;9), inv(3) ou t(3;3), LAM avec *BCR-ABL1*

II Défini par la présence d'une monosomie (à l'exclusion des pertes du X ou du Y) en association avec au moins une autre monosomie ou une anomalie structurale d'un chromosome (à l'exclusion des LAM à core binding factor (CBF))

¶ A ne pas utiliser comme marqueur défavorable si en présence d'une LAM de risque favorable

# Les mutations de *TP53* sont significativement associées aux LAM avec caryotypes complexe et défavorables

La classification de Papaemmanuil est donc également pronostique et prend en compte les anomalies oncogénétiques de tous les gènes drivers les plus fréquents (Papaemmanuil et al. 2016). Papaemmanuil *et al.* ont aussi mis en évidence que le nombre de mutations drivers influençait négativement le pronostic, et que parmi les autres caractéristiques (données cliniques etc.), les altérations génomiques étaient le prédicteur de survie le plus puissant. Les marqueurs de masse tumorale ont également un impact : LDH, hyperleucocytose, splénomégalie (M. L. Smith, Hills, and Grimwade 2011). Le caractère secondaire (lié au traitement ou secondaire à un syndrome

myélodysplasique (SMD) ou à un syndrome myéloprolifératif (SMP)) est aussi un facteur de mauvais pronostic (Larson 2007).

### **Réponse au traitement**

Le concept de maladie résiduelle (MRD) a transformé le monde de l'hématologie ces dernières années. Evaluée en cytométrie en flux ou par des techniques de biologie moléculaire, la MRD se présente comme un nouveau facteur associé à la survie globale et à la rechute (Hourigan and Karp 2013). C'est un marqueur pronostique très précis, car elle est le reflet de plusieurs paramètres souvent difficile à évaluer : la chimiosensibilité de la maladie, la masse tumorale, la présence de mécanismes moléculaires de résistance (Ivey et al. 2016).

### **Vision globale**

Gerstung *et al.* ont analysé les données génétiques et cliniques des 1540 patients de la cohorte utilisée pour la classification de Papaemmanuil et, grâce à des modèles statistiques inclusifs à plusieurs étages, ont établi un modèle statistique permettant de prédire avec précision les probabilités de rémission, de rechute et de mortalité (Gerstung et al. 2017). Un portail en ligne est disponible à des fins de recherche, à l'adresse suivante : <https://cancer.sanger.ac.uk/aml-multistage/>. L'utilisateur peut ainsi comparer les probabilités de survie à long terme avec différents traitements, ce qui pourrait procurer une aide à la décision thérapeutique personnalisée. Les banques de données sont donc un puits de connaissances, qui, dans le futur permettra des approches précises personnalisées.

## 3. Traitement

### **Traitement des sujets jeunes de moins de 65 ans**

Malgré l'hétérogénéité biologique des LAM, le traitement d'induction de première ligne actuel est peu influencé par les différentes caractéristiques génomiques (hors LAP). Les patients les plus âgés ou possédant une altération du PS ou des comorbidités significatives ne sont pas éligibles à ces traitements intensifs. Le traitement d'induction standard (hors LAP) dit « 3+7 » comprend une anthracycline de type daunorubicine à une dose supérieure ou égale à 60 mg/m<sup>2</sup> par jour ou idarubicine 8 à 12 mg/m<sup>2</sup> par jour pendant 3 à 5 jours, associée à de la cytarabine à la dose de 100 à 200 mg/m<sup>2</sup> par jour pendant 7 jours (Döhner et al. 2017). Il permet d'obtenir 70 à 80% de rémission complète (RC), mais est malheureusement suivi d'un taux de rechute de l'ordre de 50% (Schlenk et al. 2008; Büchner et al. 2012). En complément de ce traitement classique de nouvelles approches permettent d'apporter l'espoir d'un meilleur contrôle de la maladie :

- L'adjonction de gemtuzumab ozogamycin à une chimiothérapie d'induction 3+7, a montré, dans une méta-analyse récente incluant 5 études randomisées (3325 patients), une supériorité

en terme de survie et de moindre rechute chez les patients de risque favorable ou intermédiaire selon l'ELN (Hills et al. 2014)(Hills et al. 2014). Par ailleurs, dans l'étude MRC AML15 il **existait** une survie supérieure chez les patients présentant des LAM à *core binding factor* (CBF) (Burnett et al. 2011).

- L'utilisation de la clofarabine, analogue des purines en association avec une chimiothérapie de type « 3+7 » a donné des résultats controversés (Holowiecki et al. 2012; Faderl et al. 2012; Löwenberg et al. 2017). Une étude récente a cependant montré qu'utilisée en consolidation, elle permettait d'augmenter la survie sans rechute (Thomas et al. 2017) et une étude de phase III chez les patients de plus de 60 ans est en cours (ECOG E2906).
- Le CPX-351 est une encapsulation liposomale de cytarabine et de daunorubicine dans une association synergique à un ratio de 5 :1 qui permet une délivrance plus spécifique aux cellules tumorales. Il a montré un gain de réponse complète et de survie globale chez des patients âgés qui présentaient des LAM secondaires (Lancet et al. 2018), son évaluation chez des patients atteints de LAM *de novo* est en attente.
- Enfin, l'adjonction d'inhibiteurs de FLT3 en première ligne a fait l'objet de plusieurs études. Une étude de phase 3 a inclut 717 patients jeunes ayant une LAM avec mutation de *FLT3* et randomisait l'adjonction de midostaurine ou d'un placebo à une induction classique puis aux consolidations (hors allogreffe) suivi d'une maintenance (Stone et al. 2017). Cette stratégie a montré un gain de SG dans le bras midostaurine et a permis la mise sur le marché de cette molécule en première ligne en association à la chimiothérapie conventionnelle chez les patients ayant des mutations de *FLT3*.

Le traitement de consolidation dépend des caractéristiques intrinsèques de la LAM, et donc de son pronostic ; des comorbidités du patient ; et de la disponibilité d'un donneur de cellules souches hématopoïétiques. Il comprend des cycles de chimiothérapie de consolidation à base de cytarabine, associés ou non à la réalisation d'une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (allo-CSH). L'allo-CSH n'apporte pas de bénéfice aux patients appartenant au groupe de risque favorable, mais est indiquée dans les autres cas (Döhner et al. 2017). Sa réalisation doit cependant être discutée en mettant en balance le bénéfice attendu (lié au risque de rechute) par rapport au risque de MNR (dépendant de la toxicité du conditionnement et de la survenue d'une maladie du greffon contre l'hôte (GVH)). Lorsque le risque de rechute augmente, le praticien tolère un plus haut risque de MNR. Plusieurs scores ont donc été créés afin de stratifier le risque de MNR et aider à la décision de réalisation d'une allo-CSH : l'*European Group of Blood and Marrow Transplantation* (EBMT) (Gratwohl et al. 1998) et l'index de comorbidité pour allo-CSH (HCT-CI pour *Hematopoietic cell transplantation comorbidity index*) (Sorrer et al. 2005). En intégrant ces différents paramètres des recommandations consensuelles ont été publiées concernant les indications de greffe en

première rémission complète (RC1) (Cornelissen and Blaise 2016). Le tableau 3 indique dans sa partie gauche le risque de rechute en fonction de différentes caractéristiques de la maladie et du choix du traitement (chimiothérapie seule ou associée à une allo-CSH), et dans sa partie droite le score EBMT ou HCT-CI correspondant à une probabilité de MNR qu'il est considéré comme acceptable de tolérer pour réaliser une greffe.

Groupe de risque	Caractéristiques du groupe	MRD après 2 cycles	Risque de rechute		Score pronostique faisant préférer une consolidation par allo-CSH		
			Chimiothérapie (%)	Allo-CSH (%)	Score EBMT	Score HCT-CI	MNR (%)
Bon	-t(8;21) avec leucocytes ≤20G/L -Inv(16)/t(16;16) -Mutation CEBPα biallélique -Mutation NPM1 (Pas FLT3-ITD)	Positive ou négative	35-40	15-20	NA (≤1)	NA (≤1)	10-15
Intermédiaire	-t(8;21) avec leucocytes >20G/L ou mutant KIT -CN (ou -X, -Y), leucocytes <100G/L, RCp	Négative	50-55	20-25	≤2	≤2	<20-25
Défavorable	-t(8;21) avec leucocytes >20G/L ou mutant KIT -CN (ou -X, -Y), leucocytes <100G/L, RCp -CN (ou -X, -Y), leucocytes <100G/L, no RCp -CN ou -X -Y, leucocytes >100G/L -Caryotype anormal, non CBF, non Abn3q26	Positive	70-80	30-40	≤3-4	≤3-4	<30
		Positive					
		Négative					
		Négative					
Très défavorable	-CN ou -X -Y, leucocytes >100G/L -Caryotype anormal, non CBF, non Abn3q26  -Caryotype monosomal -Abn3q26 -Surexpression Evi1 - Pas CBF, mutant p53, ou mutant RUNX1, ou mutant ASXL1, ou FLT3-ITD biallélique et ratio >0,6	Positive	>90	40-50	≤5	≤5	<40
		Positive					
		Positive ou négative					

**Tableau 3 : Recommandations d'allo-CSH dans les LAM en RC1 selon (Cornelissen and Blaise 2016).**

Allo-CSH signifie allogreffe de cellules souches hématopoïétiques; CN, caryotype normal ; CBF, core binding factor ; EBMT, European group of blood and marrow transplantation; HCT-CI, Hematopoietic cell transplantation comorbidity index; MNR, mortalité non liée à la rechute ; NA, non approprié ; RCp, rémission complète précoce

Par ailleurs, la place de l'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques a récemment été réévaluée chez les patients du groupe de pronostic intermédiaire. Elle serait, selon plusieurs études, une alternative moins toxique et de même efficacité en particulier chez les patients ayant une MRD négative (Cornelissen and Blaise 2016; Vellenga et al. 2011; Herr et al. 2007).

### **Traitement des sujets âgés de plus 65 ans**

Le bénéfice/risque du traitement doit être soigneusement évalué au-dessus de 65 ans. En effet, les patients aux cytogénétiques favorables sans altération du PS bénéficient d'un traitement d'induction

standard y compris avec des doses importantes d'anthracyclines (Gardin et al. 2013; Löwenberg et al. 2009). En cas de cytogénétique défavorable, d'altération du PS ou de comorbidités actives, un traitement de confort privilégiant la qualité de vie est proposé. A ce titre, la cytarabine à faible dose a longtemps été utilisée, en association avec les meilleurs soins de support. Les agents hypométhylants ont ensuite fait leur apparition en première ligne chez les sujets âgés. En effet, l'azacitidine a montré son efficacité chez des patients âgés (Fenaux et al. 2010; Dombret et al. 2015) et notamment dans un essai de phase III où elle induisait une augmentation de la médiane de survie (10,4 vs 6,5 mois), de la survie à 1 an, mais pas de la survie à long terme (Dombret et al. 2015). De même, l'intérêt de la décitabine a été démontré dans un essai de phase III avec un bénéfice en termes de réponse et de survie (Kantarjian et al. 2012). Les patients inéligibles à la chimiothérapie intensive sont également des candidats aux essais thérapeutiques de phase précoce.

### **Thérapies ciblées et nouvelles stratégies**

- ◇ Un des axes de recherche majeur actuel est le développement de thérapies ciblées ;
  - Les inhibiteurs de *FLT3* peuvent désormais être utilisés en première ligne et ont montré une amélioration de la survie globale, dans une pathologie où les progrès de ces dernières années résidaient essentiellement dans les soins de support et le développement des agents hypométhylants (Stone et al. 2017). Cibler *FLT3* est d'un intérêt majeur car près de 30% des patients possède une altération de ce gène. Des inhibiteurs de nouvelle génération, plus spécifiques, sont en en cours de développement comme le quizartinib, le gilteritinib ou le crenolanib (Cortes et al. 2018; E. S. Wang et al. 2016; Perl et al. 2017).
  - Les mutations des gènes des isocitrates deshydrogénases 1 et 2 (*IDH1* et *IDH2*) sont présentes dans 8 et 12% des LAM respectivement. Ces mutations entraînent la formation d'un oncométabolite (le 2-hydroxyglutarate) qui donne lieu à un profil hyperméthylé conduisant à un arrêt de différenciation. L'énasidénib, inhibiteur d'*IDH2*, a montré des taux de réponse de l'ordre de 40% chez les patients en rechute ou réfractaires, dont 20% de RC (F. Wang et al. 2013; Stein et al. 2019), et il est également efficace chez les patients âgés (Pollyea et al. 2019). L'ivosidenib, inhibiteur d'*IDH1*, permet également d'obtenir 30% de réponse globale chez les patients en rechute réfractaires avec une LAM possédant une mutation d'*IDH1* (DiNardo et al. 2018). Ces deux drogues ont été approuvées par la *food and drug administration* (FDA) aux Etats-Unis, et des programmes d'utilisation en compassionnel sont en cours en Europe (autorisation temporaire d'utilisation en France).



- Les mutations de *TP53*, de très mauvais pronostic dans les LAM conduisent souvent à la formation d'une protéine mal repliée, inactive, résistante à l'apoptose. L'APR-246, dont le mécanisme d'action serait d'aider au repliement et à la restauration de la fonction de p53 d'une part, et une action sur la balance d'oxydo-réduction d'autre part, a montré des résultats intéressants dans une phase Ib/II (Sallman et al. 2018).
  - Cibler l'apoptose fait partie des nouvelles stratégies très prometteuses dans les LAM. La protéine anti-apoptotique B-cell leukaemia/lymphoma-2 (BCL-2) en séquestrant les protéines pro-apoptotiques joue un rôle dans la survie et la maintenance des cellules de LAM. Le venetoclax (inhibiteur de BCL-2) a montré de très bons résultats chez les patients nouvellement diagnostiqués, inéligibles à la chimiothérapie intensive, en association à des faibles doses d'aracytine ou à des agents hypométhylants, avec des taux de réponse complète allant de 60 à 67% et des survies prolongées (DiNardo et al. 2019; Wei et al. 2019). Il fait désormais partie à part entière de l'arsenal thérapeutique des patients âgés. D'autres thérapies ciblées sur l'apoptose sont en cours de développement comme les inhibiteurs de MCL-1.
  - Les inhibiteurs de modificateurs de l'épigénétique sont également activement développés. On peut citer les inhibiteurs de la méthyltransférase DOT1L qui pourraient avoir un intérêt dans les LAM avec réarrangement de *KMT2A* (Stein et al. 2018; Daigle et al. 2011); les inhibiteurs d'EZH2 (Fiskus et al. 2009); les inhibiteurs de la lysine déméthylase 1A (KDM1A) (Maes et al. 2018; Schenk et al. 2012) ou les inhibiteurs de BET (Berthon et al. 2016).
  - De très nombreux autres inhibiteurs ciblés sont en développement comme : les inhibiteurs de *smoothed*, MDM2, AXL, E-selectin, MEK, SYK, PLK1, PARP, PIM kinases, VEGFR, cyclines dépendantes kinases etc (Cerrano and Itzykson 2019).
- ◇ Comme dans d'autres hémopathies malignes, le système immunitaire représente une cible importante des nouvelles thérapies en développement. L'agent hypométhylant azacitidine, dans des modèles précliniques, provoque la surexpression de *Programmed Cell death 1* (PD-1). Ainsi, le nivolumab (inhibiteur de l'axe PD-1/ *Programmed death ligand 1* (PD-L1)) a été testé en association avec l'azacitidine chez des patients présentant des LAM en rechute ou réfractaire, et cette association a montré des taux de réponse et de survie prometteurs (Daver et al. 2019).
- ◇ De nombreux anticorps dirigés contre des cibles antigéniques des LAM, des anticorps bispécifiques ainsi que la production de lymphocytes T avec récepteur chimérique à l'antigène (CART cells) sont également en cours de développement.

- ◇ Enfin, une stratégie de maintenance par agents hypométhylants a très récemment montré une augmentation de la survie sans progression chez des patients âgés ayant reçu une induction et inéligibles à la greffe (Huls et al. 2019).

### **Rechutes et traitement de rattrapage**

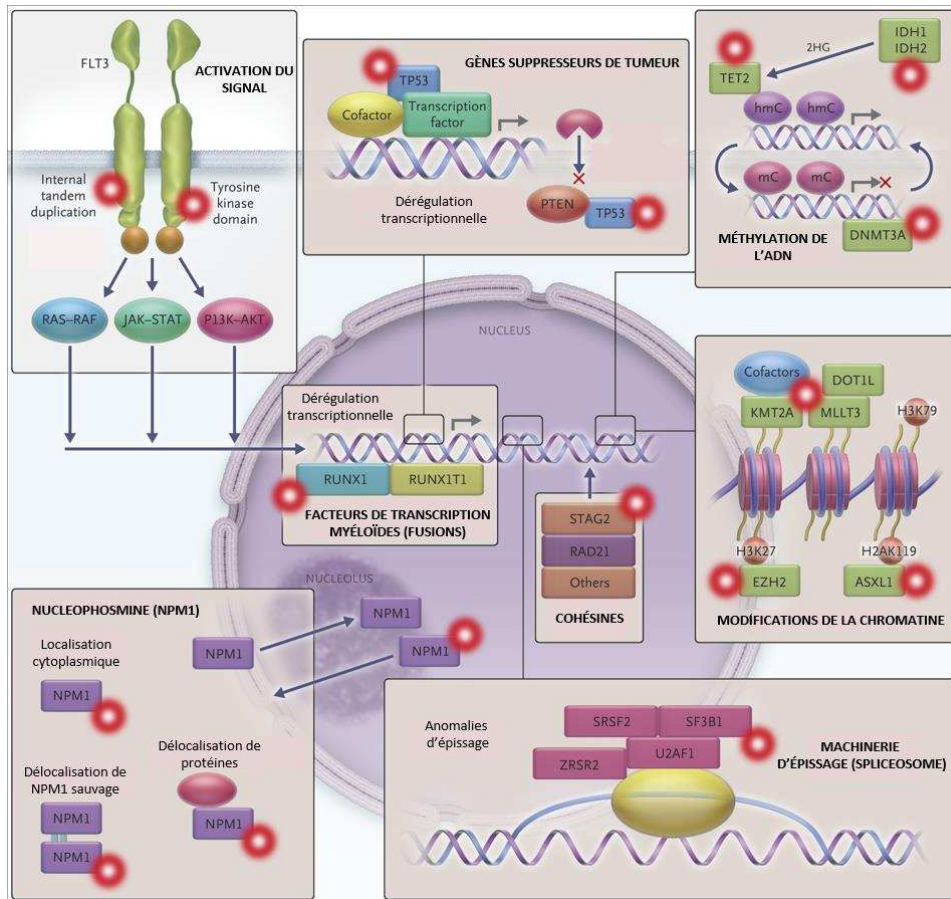
Soixante-dix à 80% des patients recevant une chimiothérapie intensive obtiennent une RC, 20% sont donc réfractaires à ce traitement d'induction. Parmi les patients ayant obtenu une RC, environ la moitié rechutera (Büchner et al. 2012; Rowe et al. 2010). Le pronostic de ces patients est médiocre ; seuls 40% d'entre eux obtiennent une seconde rémission complète et leur survie à 5 ans varie entre 4 et 46% en fonction de l'âge, de la durée de la première RC, du caryotype et de l'éventuelle réalisation d'une allo-CSH (Breems et al. 2005). L'objectif pour les patients jeunes n'ayant pas été greffés est l'obtention d'une seconde RC et la réalisation d'une allo-CSH (Jabbour et al. 2014; Othus et al. 2015; Kurosawa et al. 2010; Armistead et al. 2009). Différentes associations de chimiothérapie peuvent être proposées dont : cytarabine haute dose avec ou sans anthracyclines, FLAG-IDA (fludarabine, cytarabine, idarubicine et *granulocyte-colony-stimulating factor* (GCSF)) (Virchis et al. 2004), clofarabine (Faderl et al. 2012), ou encore mitoxantrone (Amadori et al. 1991). Une alternative pour les patients réfractaires primaires ou en rechute précoce peut être la réalisation d'une allo-CSH séquentielle c'est à dire une chimiothérapie intensive précédant de quelques jours une allo-CSH à conditionnement réduit suivie d'une baisse rapide de l'immunosuppression et d'injections de lymphocytes du donneur (DLI) prophylactiques (Schmid et al. 2005; Pfeiffer et al. 2013; Mohty et al. 2016; Decroocq et al. 2018). Les patients âgés ou ayant des comorbidités peuvent être inclus dans des essais thérapeutiques de phase précoce, les protocoles non intensifs (agents déméthylants, aracytine faible dose) conduisent à des survies médianes de l'ordre de 6 mois (Ivanoff et al. 2013; Sarkozy et al. 2013).

## **B. Leucémogénèse**

### **4. Généralités**

Nos connaissances dans la physiopathologie des LAM se sont considérablement accrues ces dernières années grâce aux technologies « omiques » basées sur l'utilisation des puces génomiques et du séquençage de nouvelle génération. Désormais, plusieurs études sont disponibles et l'analyse de leurs données donne un large aperçu de l'éventail mutationnel, mais aussi des profils transcriptionnels et de méthylation des échantillons de LAM. La cohorte du *Cancer Genome Atlas* (TCGA) est la première à avoir été publiée en 2013 (Cancer Genome Atlas Research Network 2013). Elle comprend 200 patients au diagnostic (d'âge médian 55 ans) pour lesquels ont été réalisés : du *whole genome sequencing*

(WGS) pour 50 patients, du *whole exome sequencing* (WES) pour les 150 autres, du transcriptome sur puce affimatrix pour 197 patients, du *RNA sequencing* (RNA seq) pour 179 patients et *micro RNA sequencing* (miRNA seq) pour 194 patients et un profil de méthylation pour 192 patients. La cohorte de Papaemmanuil comprend 1540 patients pour lesquels a été réalisé du séquençage ciblé sur 111 gènes (Papaemmanuil et al. 2016). Et dernièrement, une cohorte comprenant 531 patients dont 275 cas *de novo* a été publiée ; du WES a été réalisé pour tous les patients, du RNA seq sur 411 patients et des tests fonctionnels en utilisant une banque de 122 drogues sur 363 patients (Tyner et al. 2018). Plus de 2000 mutations ont été identifiées. Chaque patient possède : en moyenne 13 mutations somatiques dans les régions codantes (ce qui est très inférieur à la majorité des autres cancers) (Cancer Genome Atlas Research Network 2013; Tyner et al. 2018) ; en médiane une altération du nombre de copie (par exemple : trisomie, monosomie etc.) ; et en moyenne moins d'un événement impliquant un gène de fusion. On peut désormais penser que tous les gènes drivers, c'est à dire possédant une implication dans la leucémogénèse, ont été identifiés même si le rôle de certains reste encore à définir. Papaemmanuil *et al.* ont retrouvé 76 gènes ou régions génomiques impliqués dans les mutations drivers. Grâce à ce panel une mutation driver a été identifiée pour 98% des patients et 2 mutations drivers ont été retrouvés pour 86% des patients. Les principales mutations, touchent des gènes impliqués dans différents processus biologiques. D'après le TCGA, ceux-ci peuvent être classés dans 8 catégories distinctes : gènes codant des facteurs de transcription, des acteurs de la signalisation intracellulaire, des régulateurs de l'épissage des ARNs, des régulateurs épigénétiques (méthylation de l'ADN et modification de la chromatine), des gènes suppresseurs de tumeur, des éléments du complexe cohésine et enfin, le gène *NPM1* (Figure 3).



**Figure 3 : Fonction des gènes les plus fréquemment mutés dans les LAM d'après (Döhner, Weisdorf, and Bloomfield 2015)**

La compréhension du rôle physiologique de ces gènes ainsi que des conséquences biologiques de leurs altérations aident à comprendre les mécanismes de la leucémogénèse myéloïde.

◇ Facteurs de transcription myéloïdes et gènes de fusion.

Le core binding factor (CBF) est un facteur de transcription (FT) hétérodimérique, nécessaire à l'hématopoïèse, constitué des protéines RUNX1 et CBFβ. Des translocations récurrentes affectent ces gènes : la t(8;21)(q22;q22) entraîne la fusion des gènes *RUNX1* et *RUNX1T1*, et l'inversion péricentrique du chromosome 16 (ou son équivalent la t(16;16) aboutissant à la même fusion) entraîne la fusion des gènes *CBFB* et *MYH11*. Les conséquences en sont, des modifications de la transcription, des altérations des profils de méthylation et l'activation de voies de signalisation. Le FT *RUNX1* est également dérégulé par des mutations ponctuelles, fréquemment au cours des LAM secondaires en particulier associées aux del(7), ainsi que dans certaines formes héréditaires exceptionnelles de LAM. *CEBPA* code pour un FT nécessaire à la maturation de la lignée granulocytaire, des mutations perte de fonction de ce gène sont associées à un pronostic favorable lorsque celles-ci sont bi-alléliques. Plus rarement, d'autres FT myéloïdes comme *GATA2* peuvent faire l'objet de mutations dans les LAM.

◇ Acteurs de la signalisation cellulaire.

FLT3 pour *fms-like protéine kinase 3* est un récepteur à activité tyrosine kinase (RTK) présent sur les cellules souches hématopoïétiques. Les mutations qui touchent ce RTK dans les LAM sont des duplications en tandem du domaine juxta membranaire (25%) ou des mutations ponctuelles du domaine kinase (5%) induisant son activation constitutive, favorisant ainsi la prolifération et la croissance cellulaire (Mizuki et al. 2000). KIT est également un RTK membranaire présent sur les cellules hématopoïétiques immatures, activé par le SCF (*stem cell factor*). Les mutations de *KIT* sont fréquentes dans les LAM CBF, entraînent son activation constitutive et sont associées à une prolifération cellulaire accrue (Boissel et al. 2006). Les mutations des gènes *RAS* (*NRAS* et *KRAS*) ou de ses régulateurs (*NF1*, *PTPN11*) entraînent l'activation de la voie de signalisation RAS, favorisant la survie et la prolifération des cellules tumorales.

◇ Régulateurs de l'épissage des ARN

Les mutations de gènes impliqués dans l'épissage des ARN messagers concernent principalement *U2AF1*, *SRSF2* et *SF3B1* (Hou et al. 2016). Les conséquences fonctionnelles de ces mutations sont encore peu connues.

◇ Régulateurs épigénétiques

Parmi les régulateurs épigénétiques on distingue les gènes impliqués dans la méthylation de l'ADN, de ceux impliqués dans la régulation de la chromatine. *DNMT3A* code pour une DNA méthyltransférase responsable de la méthylation des cytosines des îlots CpG de l'ADN ; ses mutations sont inactivatrices et entraînent des modifications des profils de méthylations et donc de la transcription des gènes (Spencer et al. 2017). TET2 est une enzyme qui convertit les 5-méthylcytosines en 5-hydroxyméthylcytosines dont les mutations entraînent une perte d'activité et donc une altération des profils de méthylation. Enfin, les IDH1 et 2 sont des enzymes impliquées dans le cycle de Krebs qui catalysent la décarboxylation oxydative de l'isocitrate. Leurs mutations conduisent à la formation de l'oncométabolite 2-hydroxyglutarate, et empêchent la production normale d'alpha-cétoglutarate indispensable à l'activité des protéines TET. En conséquence, ces mutations induisent un blocage de différenciation participant à l'oncogenèse. Les régulateurs de la chromatine comprennent notamment *EZH2*, *ASXL1* et *MLL*. *EZH2* est une protéine faisant partie du complexe *polycomb repressor 2* (PRC2) qui comprend également *SUZ12*, *EED*, *RbAP4*, *JARID2* et *AEBP2*. PRC2 est un complexe histone méthyl transférase responsable de la di et triméthylation de la lysine 27 de l'histone 3 (H3K27me3) constituant une marque répressive de la transcription. Les mutations du PRC2 touchent majoritairement *EZH2* et sont inactivatrices, à l'inverse de celles rencontrées dans les pathologies lymphoïdes (Margueron and Reinberg 2011). *ASXL1* est un gène appartenant à la famille ETP (*enhancer of trithorax and polycomb*), régulant l'expression des gènes *HOX*, de *TP53* et favorisant le recrutement du PRC2. Ses mutations sont inactivatrices. Le gène *KMT2A* est impliqué dans des translocations récurrentes ou des

duplications en tandem. Il code la protéine KMT2A également appelée MLL (pour mixed-lineage leukemia) catalysant la méthylation de la lysine 4 de l'histone 3. Les gènes de fusion impliquant KMT2A entraînent une perte de sa fonction histone méthyl-transférase et empêchent le recrutement de DOT1L qui est responsable de la méthylation de la lysine 79 de l'histone 3, entraînant des modifications de la chromatine (Bernt et al. 2011).

◇ Les gènes suppresseurs de tumeur.

Le principal gène suppresseur de tumeur est *TP53* dont les mutations sont de mauvais pronostic et associées aux caryotypes complexes. La protéine p53 est un FT qui entraîne notamment l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose en réponse à différents signaux comme le stress génotoxique. Elle possède de nombreuses autres fonctions également altérées en raison des mutations pertes de fonctions (Purvis et al. 2012). *PHF6*, *PTEN* ou *WT1* sont d'autres gènes de cette catégorie.

◇ Le complexe cohésine

Le complexe multimoléculaire des cohésines régule la séparation des chromatides sœurs lors de la mitose et de la méiose et posséderait également des fonctions dans la réparation de l'ADN. Dans les cancers colorectaux, ses mutations sont associées à une instabilité génomique. Il comprend les protéines SMC1A, SMC3, STAG1, STAG2, et RAD21 (Thol et al. 2014), codées par des gènes altérés par mutation/délétions à des fréquences significatives (de l'ordre de 4% pour SMC1A, SMC3 et STAG2) dans les LAM.

◇ *NPM1*.

*NPM1* code pour la nucléophosmine, protéine essentiellement nucléolaire qui transite entre le cytoplasme et le noyau. *NPM1* a 4 fonctions principales : un rôle dans la biogenèse des ribosomes, le maintien de la stabilité génomique, la réponse au stress dépendante de p53 et la modulation des voies inhibitrices de la croissance (Heath et al. 2017). Les mutations rencontrées dans les LAM entraînent sa séquestration dans le cytoplasme et altèrent ses fonctions.

Enfin, l'étude des variations de fréquences alléliques (VAF) des différentes mutations rencontrées pour chaque patient laisse penser qu'il existe un clone fondateur chez une majorité de patients et que des sous-clones (entre 1 et 4) ayant une VAF supérieure 10% sont retrouvés chez 50% d'entre eux (Cancer Genome Atlas Research Network 2013). Le modèle classique de leucémogénèse, adapté d'une théorie plus large de carcinogénèse à deux étapes élaborée par Armitage et Doll (Armitage and Doll 1954), décrivait l'existence d'au moins 2 mutations (L. M. Kelly and Gilliland 2002). L'une survenait dans un gène codant pour un facteur de transcription et la seconde dans un gène intervenant dans une voie de signalisation. L'apport du séquençage à haut débit indique que la réalité est plus complexe et sera détaillé dans le paragraphe suivant. On peut noter par exemple, que dans la cohorte du TCGA, seuls

59% des patients possèdent une mutation d'un gène connu comme étant impliqué dans la signalisation cellulaire.

#### 5. Cellules souches pré-leucémiques et hématopoïèse clonale

L'ontologie de la maladie est au fil des années de mieux en mieux comprise. Elle résulte de l'accumulation séquentielle d'altérations génétiques et épigénétiques par une cellule hématopoïétique au sein d'un microenvironnement favorable, qui conduit au phénotype caractéristique de prolifération et de défaut de différenciation. La cellule à l'origine de la maladie proviendrait soit d'une cellule souche hématopoïétique (CSH) normale, soit d'un progéniteur myéloïde ayant acquis des capacités d'auto-renouvellement, les deux modèles n'étant pas mutuellement exclusifs (R. J. Jones and Armstrong 2008; P. N. Kelly et al. 2007). Au moins deux mutations sont nécessaires à cette cellule pour devenir une cellule initiatrice de leucémie (J. S. Welch et al. 2012). La cellule souche « pré » leucémique posséderait une mutation initiatrice pouvant être accompagnée d'autres mutations dites secondaires ou passagères n'ayant pas d'implication définie dans la leucémogénèse (Shlush et al. 2014; Corces-Zimmerman et al. 2014). Plusieurs caractéristiques sont allouées à ces mutations initiatrices : elles doivent survenir précocement dans la leucémogénèse, persister à la rechute, les cellules les possédant doivent être capables de reconstituer l'hématopoïèse normale et d'initier la leucémogénèse (Hirsch et al. 2016). Une deuxième mutation coopératrice, est responsable de la formation du clone leucémique fondateur, qui peut lui-même donner naissance à des sous-clones en acquérant de nouvelles mutations.

Récemment, il a été démontré l'existence d'états pré-leucémiques asymptomatiques et le terme d'hématopoïèse clonale de potentiel indéterminé (CHIP) a été introduit (Shlush et al. 2014; Steensma et al. 2015). En effet, en 2014, un séquençage d'exome de trois larges cohortes de personnes ne présentant pas de pathologie hématologique apparente (une cohorte suédoise de patients ayant des pathologies psychiatriques ou des contrôles, une cohorte de personnes bien portantes ou diabétiques de type 2 et une cohorte de patients du TCGA n'ayant pas d'hémopathie) a révélé des mutations dans plusieurs gènes impliqués dans la leucémogénèse dont les 3 principaux étaient : *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1* (Jaiswal et al. 2014; Xie et al. 2014; Genovese et al. 2014). Des mutations pouvaient être observées dans d'autres gènes comme : *TP53*, *SRSF2*, *JAK2*, *SF3B1* etc. Il est à noter que les mutations de *NPM1*, ou *FLT3* ne font pas partie de cet éventail, ce qui suggère qu'il s'agit d'évènements drivers qui surviendraient plus tard dans la leucémogénèse. Ces 3 études ont montré que la fréquence de ces mutations augmentait avec l'âge : rarement présentes avant 50 ans, elles sont présentes dans 5 à 10% de la population au-dessus de 70 ans. Cette croissance exponentielle avec l'âge, indique que la survenue de ces mutations est probablement le fait du vieillissement du système hématopoïétique, ces mutations donnant probablement lieu à un avantage sélectif. Des techniques plus précises ont

même identifié l'existence d'une hématopoïèse clonale à des VAF bien plus petites (Young et al. 2016; Buscarlet et al. 2017)) dans des proportions plus importantes de la population. Par ailleurs la présence d'une mutation est significativement associée au risque d'hémopathie qui se situerait entre 0.5% et 1% par an.

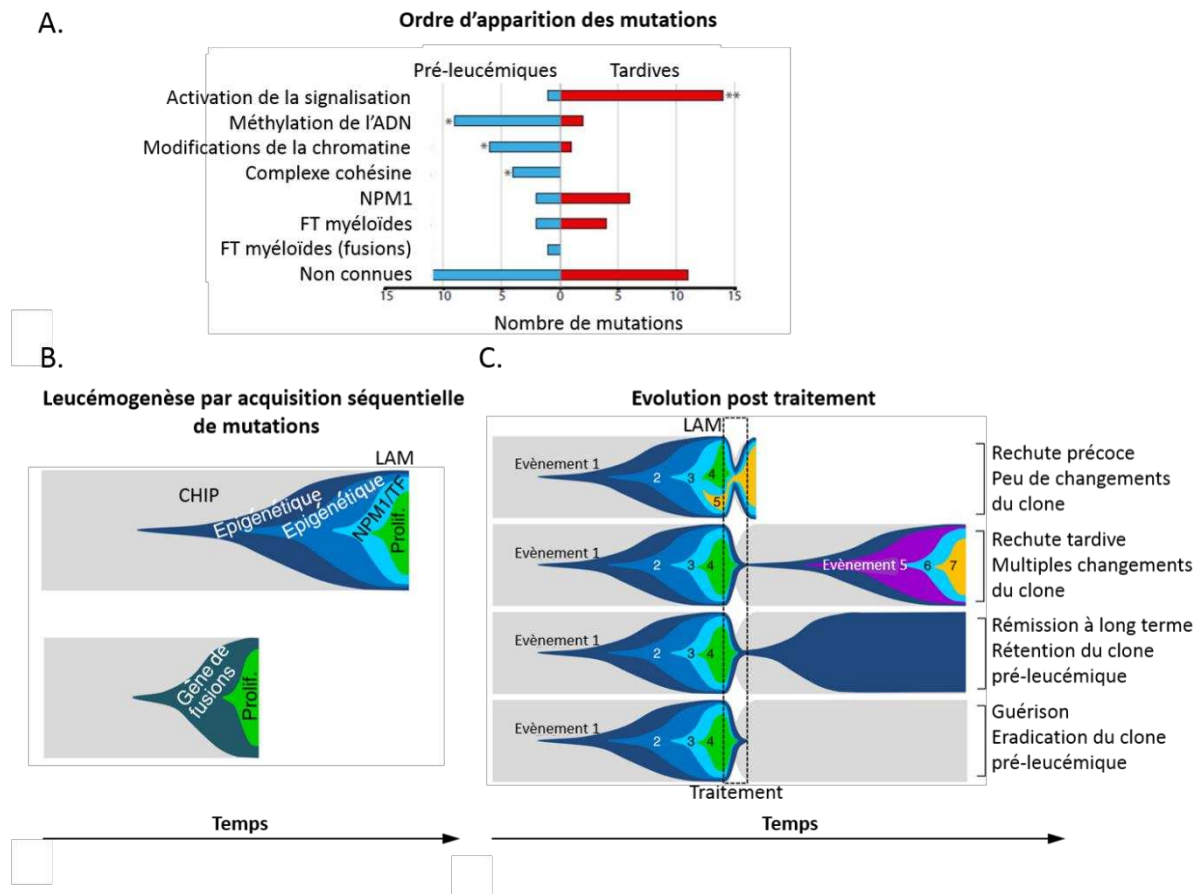
Afin de différencier les personnes présentant des états pré-leucémiques qui évolueront vers une LAM et les personnes porteuses d'une hématopoïèse clonale, Abelson *et al.* ont réalisé du séquençage ciblé sur des échantillons de patients plusieurs années avant le diagnostic de LAM et sur des échantillons d'une cohorte d'individus sains (Abelson et al. 2018). Ils concluent que les états pré-leucémiques évoluant vers une LAM étaient distincts des témoins : ils étaient caractérisés par d'avantage de mutations, des VAF plus élevées (indiquant une expansion clonale plus importante pouvant dépendre de facteurs intrinsèques ou de pression de sélection extrinsèque), et montraient un enrichissement de mutations dans des gènes spécifiques comme *TP53*, *U2AF1* ou d'autres gènes d'épissage.

*TP53* est aussi un gène pouvant être muté dans le cadre d'une hématopoïèse clonale. Il a été montré qu'une partie des patients ayant des LAM secondaires à des traitements de chimiothérapie ou de radiothérapie, possédaient cette mutation avant la survenue du premier cancer et que ces traitements favorisaient l'expansion clonale des cellules *TP53* mutées (résistantes à la chimiothérapie), dans lesquelles pouvaient survenir un second évènement responsable de la survenue d'une LAM (T. N. Wong et al. 2015). L'environnement peut donc exercer une pression de sélection responsable de la maladie. La cellule dans laquelle surviennent ces mutations a aussi fait l'objet d'investigations et dépendrait du type de mutation : les mutations de *DNMT3A* étant acquises par des cellules souche moins différenciées, tandis que celles de *TET2* surviendraient dans un progéniteur myéloïde (Buscarlet et al. 2018). Par ailleurs, Loh *et al.* ont montré qu'outre les mutations ponctuelles, les aberrations chromosomiques conduisant à des pertes d'hétérozygoties ou à des altérations du nombre de copies entraient également dans le spectre des CHIP (P.-R. Loh et al. 2018). Les altérations génétiques présentes dans les CHIP et en particulier les mutations de gènes impliqués dans la méthylation de l'ADN et les modifications épigénétiques font donc partie des mutations initiatrices pré-leucémiques, au premier rang desquelles on retrouve *DNMT3A*, *TET2* et *ASXL1*.

D'autres altérations sont cependant également décrites comme des évènements initiateurs. Les translocations impliquant les gènes *RUNX1* et *CBFB* (t(8;21) et inv(16)) et le gène *KMT2A* ont été rapportées comme survenant précocement dans la leucémogénèse (Corces-Zimmerman et al. 2014; Bäsecke et al. 2005; Moriya et al. 2012), de même que les mutations des gènes du complexe cohésine (Corces-Zimmerman et al. 2014), ou dans un modèle plus particulier, les t(15;17) (J. S. Welch et al. 2012). D'autres altérations chromosomiques surviennent aussi dans les clones initiaux comme les del(20q) (Hirsch et al. 2016) .



La rapidité d'évolution vers une LAM dépend ensuite de facteurs extrinsèques et du type de mutation (facteur intrinsèque). La cellule acquière de nouvelles mutations coopératrices, qui concernent les gènes comme *NPM1*, des facteurs de transcriptions myéloïdes puis/ou des gènes impliqués dans la signalisation et la croissance cellulaire comme *FLT3* ou *RAS* (Hirsch et al. 2016; Xie et al. 2014; Corces-Zimmerman et al. 2014). Elles sont nécessaires à la progression de la maladie et donnent naissance au clone fondateur (Figure 4). La survenue de nouvelles mutations entraîne la formation de sous-clones.



**Figure 4 : Leucémogénèse par acquisition séquentielle de mutations selon (Corces-Zimmerman et al. 2014; Hirsch et al. 2016)**

A. Nombre de mutations identifiées par séquençage d'exome chez 16 patients présentant des LAM ordonnées selon les catégories du TCGA et classées en pré-leucémiques ou tardives d'après Corces-Zimmerman et al. PNAS 2014. B. Exemples de modèle de leucémogénèse. Représentation de l'initiation et de l'évolution du clone leucémique (zones colorées) parmi les CSH normales (zone grise). Le premier évènement peut-être par exemple une mutation d'un gène de l'épigénétique (*DNTM3A*, *ASXL1*, *TET2*) à l'origine d'une hématopoïèse clonale de potentiel indéterminée (CHIP) (schéma du dessus) ou l'acquisition d'une translocation avec gène de fusion (schéma du dessous). Les mutations sont acquises ensuite séquentiellement et peuvent être à l'origine de sous-clones. C. Différentes possibilité d'évolution post traitement selon Hirsch et al: rechute précoce, rechute tardive, rétention du clone pré-leucémique, guérison. FT signifie facteur de transcription ; \*\* $p < 0,001$ , \* $p < 0,01$

## 6. Cellules souches leucémiques

Parmi les cellules tumorales, un modèle assez classique, calqué sur l'hématopoïèse physiologique, décrit l'existence d'un développement hiérarchique de la maladie avec l'existence de plusieurs populations : les cellules souches leucémiques (LSC), les progéniteurs et les cellules du « bulk » (Warner et al. 2004). Ce modèle semble actuellement réducteur, et une plasticité des cellules tumorales est décrite (Ho et al. 2016; Pollyea and Jordan 2017). Les LSC dont une des caractéristiques est leur capacité d'auto-renouvellement, ont été longtemps décrites comme quiescentes et de ce fait peu accessibles aux chimiothérapies cytotoxiques classiques (Jordan 2002; Dick 2005). Cependant, des études plus récentes ont indiqué que des LSC étaient hétérogènes, présentant des phénotypes variés et pouvaient se trouver dans des sous-populations de cellules en cycle (Farge et al. 2017; Eppert et al. 2011; Sarry et al. 2011). Une des propriétés essentielles des LSC (Bonnet and Dick 1997) est leur capacité de reproduire une LAM dans des souris immunodéficientes ainsi que dans des receveuses secondaires. Des expériences de dilutions limitées en avaient fait des cellules rares, mais l'utilisation de modèles plus immunodéficients a montré que leur fréquence était plus importante qu'initialement décrite (Bonnet and Dick 1997; Sarry et al. 2011). L'identification de leur phénotype est une source de recherche depuis de nombreuses années, dans le but de mieux les étudier, mais également, dans l'optique d'un traitement ciblé. Une grande partie des LSC se situerait dans la fraction de cellules ayant un phénotype CD34+/CD38-/CD123+, mais elles sont également détectées dans des fractions CD34- ou CD38+, leur phénotype pouvant également changer au cours de la maladie (Ho Blood 2016) et de nombreux autres marqueurs associés ont été décrits (Hanekamp, Cloos, and Schuurhuis 2017). Parmi les nouvelles stratégies thérapeutiques, cibler les CSL est une attitude prometteuse qui pourrait permettre d'éviter les rechutes et des recherches dans ce sens voient le jour actuellement (Pollyea and Jordan 2017; Hanekamp, Cloos, and Schuurhuis 2017).

## 7. Micro-environnement

Le micro-environnement médullaire (ME), composé de différents types cellulaires (cellules souches mésenchymateuses (CSM), cellules endothéliales, cellules du système immunitaires, cellules du système nerveux sympathique, etc.) et de molécules (facteurs de croissance, cytokines, molécules d'adhésion etc.) est un tissu de soutien de l'hématopoïèse normale. Dans des conditions physiologiques, de nombreuses interactions existent entre les cellules qui le composent et les CSH afin, entre autres, de réguler leur devenir (auto-renouvellement, quiescence et différenciation). Le ME est majoritairement hypoxique et la concentration en calcium y est élevée. Deux types de niches y sont décrites ; la niche endostéale et la niche vasculaire ; cependant il s'agit d'une structure hautement dynamique.

En pathologie, le ME semble jouer un rôle important dans les LAM comme dans d'autres hémopathies myéloïdes. De façon parallèle aux CSH, les CSM présentent également des anomalies : aberrations chromosomiques et mutations (Blau et al. 2007; von der Heide et al. 2017) qui sont néanmoins différentes. Elles ont un phénotype particulier : altération de leurs capacités de différenciation, de leur potentiel clonogénique et de leurs capacités de soutien des CSH normales (Goulard, Dosquet, and Bonnet 2018). Elles interagissent avec les cellules leucémiques, notamment par l'axe CXCR4-CXCL12, et les protègent de l'apoptose en participant à la chimiorésistance (Takam Kamga et al. 2016; Carter et al. 2016) , soutiennent leur survie, leurs capacités d'auto-renouvellement et leur état indifférencié (Reikvam et al. 2015; Ito et al. 2015). Nos connaissances sur les interactions entre ME et les cellules leucémiques sont en pleine expansion et sont à l'origine de nouvelles possibilités thérapeutiques.

#### 8. Signalisation tumorale et altération du métabolisme

La signalisation cellulaire est altérée au sein de la cellule de LAM. Ceci résulte, d'une part des mutations activatrices de protéines impliquées dans ces voies de signalisation (*FLT3 ITD NRAS, KRAS, KIT*) et d'autre part d'autres mécanismes complexes faisant intervenir l'épigénétique, l'interaction avec des cellules du ME, ou d'autres acteurs conduisant à une activation constitutive. Elles concourent à stimuler la prolifération cellulaire, la croissance et la survie de manière coordonnée.

Par exemple, le récepteur à activité tyrosine kinase FLT3 modifié par la mutation *FLT3 ITD* est constitutivement activé et entraîne l'activation en aval des voies de signalisation PI3K, STAT5 et *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) (Choudhary et al. 2009; Tsapogas et al. 2017).

La voie PI3K/AKT (*Phosphoinositide 3 kinase/AKT*) est constitutivement activée dans près de la moitié des cas de LAM (Tamburini et al. 2007; Sujobert et al. 2005) sans que cela implique des mutations activatrices (en dehors de rares mutations de la phosphatase PTEN) au contraire d'autres types de cancers comme les cancers colo-rectaux (Samuels et al. 2004) et promeut la survie des cellules de LAM. De même, la voie mTORC1 (*Mammalian Target of Rapamycin Complex 1*) (Tamburini et al. 2009; Q. Xu et al. 2003) qui régule la traduction des ARNm, la glycolyse, la synthèse des lipides, l'autophagie afin de promouvoir la croissance cellulaire, est activée dans la plupart des cas de LAM et semble indispensable à la survie cellulaire (Hoshii et al. 2012).

D'autres voies de signalisation sont mises en jeu, comme la voie Wnt/ $\beta$ catenin dans les cellules souches leucémiques, ou la voie JAK/STAT.

La voie RAS/MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) peut être activée en raison des mutations de *NRAS, KRAS, PTPN11, CBL* ou *NF1* ou en raison de l'activation d'autres voies de signalisation ou d'un récepteur membranaire, comme cela sera détaillé plus loin dans le manuscrit.

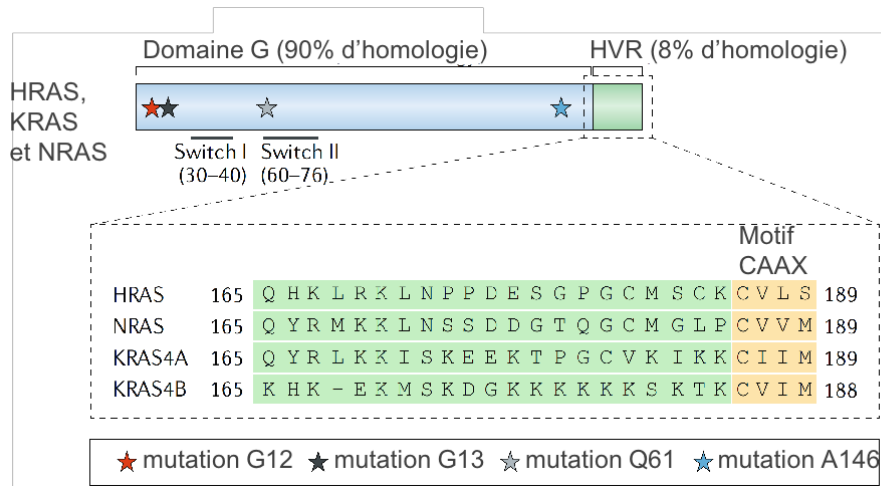
Ces protéines sont des candidates idéales pour les traitements ciblés, en particulier quand la cellule tumorale devient dépendante de l'une d'entre elles pour sa croissance et sa survie, cette

caractéristique étant appelée « addiction oncogénique » (Weinstein 2002). Cette propriété a été démontrée dans les leucémies myéloïdes chroniques (LMC) ou l'addiction oncogénique à BCR-ABL a conduit au développement et au succès thérapeutique de l'imatinib.

## II. L'oncoprotéine RAS en physiologie et en pathologie oncologique humaine

### A. Propriétés et structure des protéines RAS

Les 3 gènes humains de la famille RAS, *NRAS*, *HRAS* et *KRAS*, codent pour 4 protéines assez similaires, de 188 à 189 acides aminés (AA) : HRAS, NRAS, KRAS4A et KRAS4B ; ces deux dernières étant des variants d'épissage de *KRAS*. En raison du faible taux d'expression de KRAS4A, en particulier chez l'homme, le terme KRAS fait souvent référence à KRAS4B. Ce sont des protéines ubiquitaires, bien que le ratio des différentes isoformes varie en fonction des tissus. Elles appartiennent à la superfamille des protéines Ras qui comprend 5 entités : RAS, RHO, RAN, ARF/SAR et RAB (Wennerberg, Rossman, and Der 2005). Les protéines RAS appartiennent à la famille des petites protéines G possédant une activité GTPase intrinsèque et régulent un grand nombre de processus intracellulaires comme la croissance et la prolifération, le maintien du cytosquelette, la migration, l'adhésion cellulaire, la différenciation et la survie. NRAS, KRAS et HRAS sont hautement conservées entre les espèces et possèdent un rôle majeur dans le développement et la croissance. Les études d'inactivation génétique chez la souris *knockout*, (KO) ont montré que *Hras* et *Nras* n'étaient pas nécessaires au développement de la souris, tandis que *Kras* était essentiel, son KO étant létal (Johnson et al. 1997). Les protéines RAS ont un poids moléculaire de 21kDa, sont composées de 6 feuillets  $\beta$  et 5 hélices  $\alpha$  et possèdent deux domaines : un domaine C-terminal de liaison à la membrane et un domaine G de 166 AA permettant la liaison au nucléotide à guanosine et contenant 5 motifs (Figure 5). Les quatre isoformes sont identiques dans la première partie du domaine G et présentent 82% d'homologie dans la deuxième partie du domaine G (Simanshu, Nissley, and McCormick 2017). Le domaine C-terminal est hypervariable, il constitue la cible de modifications lipidiques (prénylations, palmytoylations de résidus cystéines) permettant l'ancrage à la membrane. Ces modifications post-traductionnelles sont en effet indispensables pour la localisation intracellulaire de RAS, principalement la face interne de la membrane plasmique et pour l'activation des voies de signalisation en aval (Jackson et al. 1990; Simanshu, Nissley, and McCormick 2017).



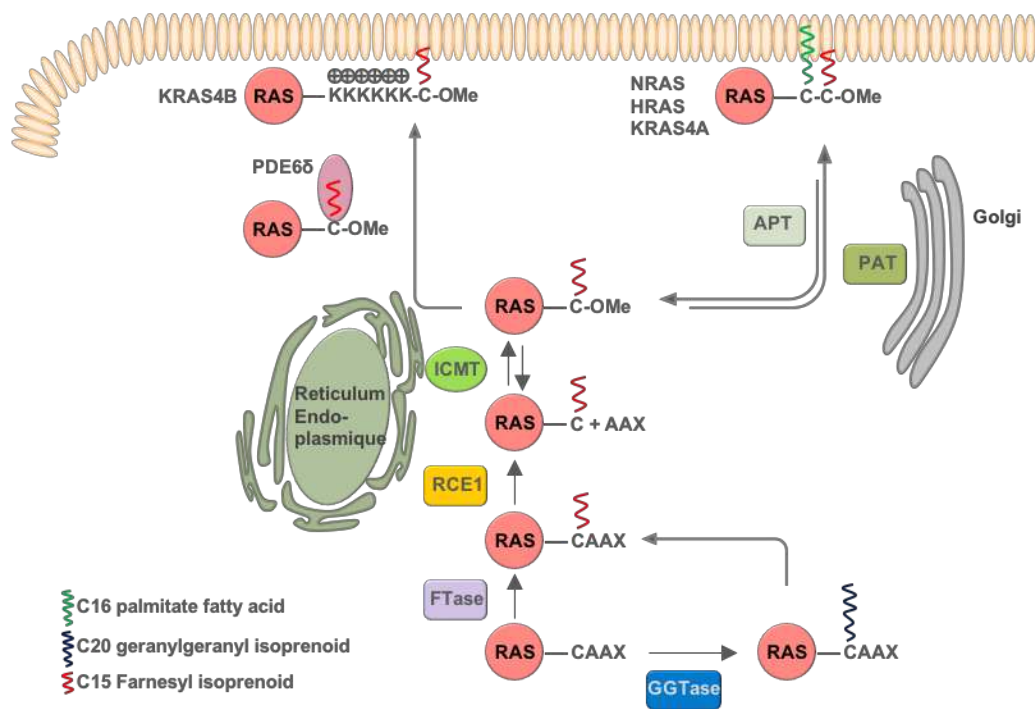
**Figure 5 : Les 4 isoformes de RAS d'après (Ryan and Corcoran 2018)**

Les protéines RAS sont des commutateurs moléculaires oscillant entre 2 formes, une forme active liée au guanosine triphosphate (GTP) et une forme inactive liée au guanosine diphosphate (GDP). En conditions physiologiques, la transition entre ces deux états est régulée par des facteurs d'échanges nucléotidiques à la membrane (GEF pour *guanosine exchange factor*) permettant la libération du GDP de RAS et la liaison au GTP en abondance dans le cytoplasme ; et par des facteurs permettant l'activation de la fonction GTPasique de RAS (GAP pour *GTPase activating protein*) qui catalysent en retour l'hydrolyse du GTP, favorisant donc le retour à la forme inactive de RAS liée au GDP. Les GEF et les GAP sont des protéines à multi domaines, régulées par des signaux extracellulaires et contrôlant le niveau d'activation de RAS dans le temps et l'espace (Bos, Rehmann, and Wittinghofer 2007). Les protéines RAS sont activées en aval de différents types de récepteurs : les récepteurs aux cytokines, les récepteurs couplés à des protéines G, les récepteurs à tyrosine kinase (RTK), les récepteurs de la matrice extracellulaire, des intégrines etc. Bien que possédant des effecteurs communs et de nombreuses similitudes, ces protéines ont des propriétés biologiques spécifiques, expliquées par leur domaine C terminal divergeant entre les isoformes.

### **B. Ancrage à la membrane**

La localisation cellulaire de RAS est déterminée par les modifications lipidiques de son domaine hypervariable, ainsi que par la composition des membranes cellulaires. RAS est synthétisée sous forme de précurseur cytosolique, puis l'isoprénylation et la palmytoylation de ses résidus cystéines permettent son ancrage sur la face interne de la membrane plasmique, elle-même indispensable à l'activation des voies de signalisation en aval (Willumsen et al. 1984; Simanshu, Nissley, and McCormick 2017; Jackson et al. 1990; Willingham et al. 1980) (Figure 6). Le domaine C-terminal possède un motif CAAX (où C est une cystéine, A est un acide aminé aliphatique et X un acide aminé) autorisant la

prénylation de la cystéine par la farnésyltransférase, la séquence -AAX étant ensuite clivée par l'enzyme Ras converting CAAX endopeptidase 1 (RCE1) sur la face cytosolique du réticulum endoplasmique. Puis, l'isoprenylcystéine-carboxyl-méthyltransferase (ICMT) est responsable de la méthylation du groupe carboxyl alpha de l'isoprenylcystéine ainsi générée (Hancock 2003). Les protéines RAS sont ensuite dirigées vers la membrane plasmique après un deuxième signal par deux mécanismes différents : HRAS et NRAS sont palmytoylés sur des résidus cystéines par les enzymes DHHC9 et GCP19 lors de leur transfert trans-golgien tandis que KRAS4A est palmytoylé par une palmytoylacyltransférase inconnue sans passer par le Golgi. KRAS4B n'est pas palmytoylé mais possède une région polylysine polybasique qui interagit avec les têtes lipidiques à prédominance électro-négatives de la membrane cellulaire (Apolloni et al. 2000; Swarthout et al. 2005) (Figure 6). En présence d'inhibiteurs de farnésylation, NRAS et KRAS peuvent également subir une géranyl-géranylation, ce qui explique l'absence d'efficacité des inhibiteurs de farnésyltransférase dans les cancers avec activation oncogénique de NRAS ou KRAS (Berndt, Hamilton, and Sebti 2011). Les différentes isoformes de RAS ont deux possibilités pour leur déplacement d'un compartiment à l'autre : le transport vésiculaire comme des protéines membranaires intrinsèques le long des microtubules (Choy et al. 1999), ou, le détachement de la membrane puis la circulation libre dans le cytosol (à l'aide ou non d'une protéine chaperonne afin de protéger la chaîne farnésyle) vers la membrane cible. Pour HRAS et NRAS, Goodwin *et al* ont décrit un transport vésiculaire vers la membrane plasmique grâce à la palmytoylation. Après une dépalmytoylation qui permet le détachement de HRAS et NRAS, ils ont décrit un transport passif via le cytosol pour un retour vers le Golgi (Goodwin et al. 2005). Contrairement à ce qui était supposé, KRAS4B n'est pas associé constitutivement à la membrane en raison de sa chaîne polybasique, mais est présent dans le cytoplasme. Sa localisation est régulée via deux mécanismes connus. Le premier est une liaison à la calmoduline en présence de calcium qui permet son détachement de la membrane plasmique et, grâce à l'enzyme phosphodiesterase  $\delta$  (PDE $\delta$ ) (considérée comme une GDI pour *Guanine nucleotide dissociation inhibitor*), son transport jusqu'aux endomembranes et même son recyclage dans les endosomes et son retour à la membrane plasmique (Fivaz and Meyer 2005; Schmick et al. 2014; Sperlich et al. 2016). Le second est décrit via la phosphorylation du résidu S181 par la protéine kinase C (PKC) dans sa région polybasique (Bivona et al. 2006) permettant sa relocalisation dans d'autres compartiments cellulaires.



**Figure 6 : Modifications post traductionnelles de RAS d'après (Cox et al. 2014)**

APT signifie acyl-protein thioesterase ; FTase, farnésyltransférase ; GGTase, géranylgéranyltransférase ; ICMT, isoprenylcystein-carboxyl-méthyltransférase ; PAT, palmitoyl acyltransferase ; PDE6 $\delta$ , phosphodiesterase 6  $\delta$  ; RCE1, enzyme Ras converting CAAX endopeptidase 1.

Les différences de modifications du domaine HVR en fonction de l'isoforme de RAS sont probablement à l'origine des spécificités de signalisation car elles entraînent des localisations spécifiques en « microfoci » au sein de la membrane plasmique. Par exemple, HRAS et NRAS se localisent dans les radeaux lipidiques ordonnés liquides, riches en cholestérol alors que KRAS4A se localise dans les domaines liquides désordonnés. KRAS4B s'arrange en clusters dans des régions désordonnées indépendamment de la charge en GDP/GTP (Weise et al. 2011). Au-delà de la membrane plasmique, les protéines RAS sont également associées aux endomembranes telles que le Golgi, le réticulum endoplasmique, les mitochondries et les endosomes ; à différents degrés en fonction des isoformes (Choy et al. 1999).

Initialement, il semblait que l'activation de RAS et la transduction du signal étaient conditionnées par sa localisation sur la face interne de la membrane plasmique (Mochizuki et al. 2001). Le développement de méthodes de transfert d'énergie par résonance fluorescente (FRET) basées sur l'interaction dépendante du GTP de RAS avec des sondes fluorescentes RBD (RBD pour *Ras binding domain*) a permis de démontrer que RAS pouvait être également activée sur les endomembranes comme le Golgi ou le réticulum endoplasmique où NRAS et HRAS sont présents, en réponse à l'activation de récepteurs aux facteurs de croissance ou au recrutement de GEFs (Chiu et al. 2002; Bivona et al. 2003; Fehrenbacher, Bar-Sagi, and Philips 2009). L'activation de RAS sur ces endomembranes conduit à l'activation de voies de signalisation en aval. Cependant, il existe des

arguments pour penser qu'il existerait une compartimentalisation de la signalisation avec des spécificités en fonction des localisations subcellulaires (Daniels et al. 2006; Onken et al. 2006; Agudo-Ibáñez et al. 2007) Par exemple, KRAS4B, une fois phosphorylé par la PKC, peut se localiser sur les mitochondries et réguler la mort cellulaire programmée (Bivona et al. 2006). NRAS activé par la mutation G12D ou NRAS *wild type* (WT), localisé soit à la membrane plasmique et au niveau de la mitochondrie dans des modèles de SMD, soit à la surface mitochondriale dans des modèles de LAM, coopère avec BCL-2 afin de réguler également l'apoptose (Omidvar et al. 2007; Le Pogam et al. 2013). NRAS et HRAS peuvent aussi se localiser sur les endosomes dépendants ou non de la clathrine associés au récepteur aux facteurs de croissance et activer les voies de signalisation en aval (S. Roy, Wyse, and Hancock 2002; Omerovic et al. 2008). Il a été montré que cette localisation était même nécessaire à la transmission du signal RAS. KRAS a également été retrouvée localisée et activée dans les endosomes (Lu et al. 2009).

Ces éléments conduisent à l'élaboration d'un modèle plus complexe d'activation de RAS comme résultant de l'intégration de signaux subcellulaires localisés et régulés par la disponibilité et l'activation des molécules régulatrices et effectrices sur les différents sites.

### C. Activation et inactivation : la commutation

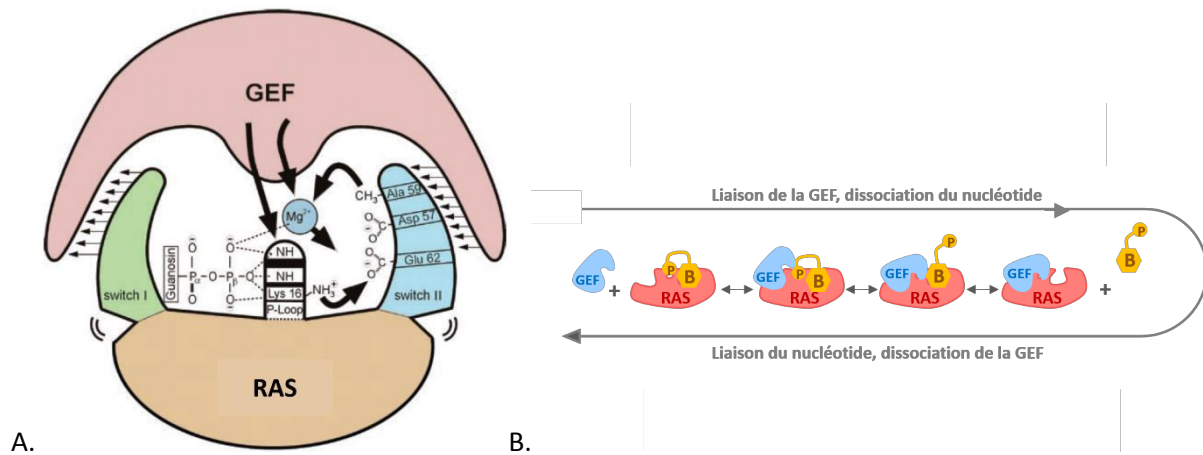
Le premier modèle structural de protéine RAS a été établi grâce à des homologies de séquence à la protéine EF-Tu en 1985 (McCormick et al. 1985) puis des données de cristallographie aux rayons X ont permis d'affiner le modèle (de Vos et al. 1988). Le domaine G permet la liaison aux nucléotides à guanosine GDP et GTP. Il comprend 5 motifs et possède une structure très conservée parmi les protéines G de 166 AA ; son mécanisme de commutation (« *switch* ») est universel. Une P-loop permet la liaison au  $\beta$ -Phosphate du GDP et du GTP, il existe ensuite 2 régions *switch*, un motif LVGNKXDL qui permet l'interaction avec la base du nucléotide et enfin un motif SAK. La spécificité de liaison à la guanine est due au résidu A46 invariant du motif SAK qui interagit avec l'oxygène de la guanine et au résidu D57 de la région *switch*-2. La région de commutation implique les résidus 32 à 38 pour le *switch*-1 et 59 à 67 pour le *switch*-2. Sous la forme liée au triphosphate, il existe deux liaisons hydrogène des oxygènes  $\gamma$ -phosphate aux groupes NH de la chaîne principale des résidus invariants T35 et G60 dans les régions *switch*-1 et *switch*-2 respectivement. La glycine fait partie d'un motif DXXG conservé et la thréonine est également impliquée dans la liaison au magnésium via sa chaîne latérale (Kjeldgaard, Nyborg, and Clark 1996; Vetter and Wittinghofer 2001). Il a été postulé très tôt, et est désormais établi que le niveau d'activation de RAS était déterminé par le rapport entre le taux d'hydrolyse du GTP et le taux d'échange du GDP (McCormick et al. 1988). De même que l'hydrolyse intrinsèque du GTP présente une demi-vie de 16 min ( $k_{off} = 6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ), la forte affinité de RAS pour le GTP/GDP explique un faible taux de dissociation et une demi vie de 6 min ( $k_{off} = 2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ) (Hunter et al. 2015). La vitesse



d'activation de RAS dans différents processus biologiques (quelques secondes à minutes) implique l'existence de protéines régulatrices que sont les GAPs et les GEFs.

#### **D. Le rôle des GEFs**

Les GEFs sont des protéines à multidomaines possédant une spécificité pour une famille de protéine G donnée, et il n'y a, la plupart du temps, pas de réactivité croisée pour une autre famille de protéine G. Les GEFs régulant les membres de la famille RAS ont un domaine *CDC25 homology-domain* (CDC25-HD) et dans la plupart des cas un domaine *Ras exchange motif* (REM). Les autres domaines sont principalement des domaines d'interaction lipidiques ou protéiques. La plus connue des GEFs est une protéine ubiquitaire appelée *son of sevenless* SOS. Il existe deux autres familles de RAS-GEFs chez les mammifères : les RASGRF et RASGRP qui sont principalement exprimées dans le tissu cérébral et les lymphocytes T (Guerrero et al. 1996; Ruiz, Santos, and Bustelo 2007). Leur mécanisme d'action consiste à modifier le site de liaison du nucléotide à RAS et ainsi de diminuer l'affinité de RAS pour le nucléotide et d'entraîner sa dissociation (Hennig et al. 2015; Bos, Rehmann, and Wittinghofer 2007). Bien que les affinités de RAS pour le GTP et le GDP soient similaires, la concentration intracellulaire de GTP est 10 fois plus élevée et RAS a donc tendance à se lier à nouveau au GTP ce qui favorise en retour la dissociation de la GEF. En effet, les structures binaires (RAS-GEF ou RAS-GTP/GDP) sont très stables, tandis que les structures ternaires possèdent beaucoup moins d'affinité (Figure 7B). La structure binaire RAS-SOS a été déterminée (Boriack-Sjodin et al. 1998). SOS insère une hélice alpha dans RAS ce qui entraîne le déplacement de la région switch-1 ouvrant le site de liaison au nucléotide (Figure 7A). Dans un second temps, les chaînes latérales présentées par cette hélice et par une conformation déformée de la région switch-2 modifient l'environnement du site de liaison pour les groupes phosphate du nucléotide et du magnésium de façon à défavoriser leur liaison. Cependant, SOS n'empêche pas la liaison de la base et du ribose du GTP ou du GDP, permettant ainsi la libération du GDP, puis la liaison du GTP. La dissociation du magnésium, mais surtout et principalement, la déstabilisation de la p-loop et donc de l'interaction avec le  $\beta$ -phosphate grâce à l'insertion de cette hélice alpha, sont capitales pour la diminution d'affinité pour le nucléotide (Figure 7A). Un résidu glutamate dans la région switch-2 semble également essentiel (E62).



**Figure 7 : Action des GEF selon (Vetter and Wittinghofer 2001; Bos, Rehmann, and Wittinghofer 2007)**  
**A. Mécanisme d'action des GEFS, B. Stabilité des structures binaires par rapport aux structures tertiaires**  
 B signifie base ; GEF, guanine exchange facteur.

La régulation des GEFs peut se faire à 3 niveaux : une translocation dans un compartiment cellulaire spécifique, la libération de leurs sites de liaison aux protéines G d'un domaine d'auto-inhibition ou l'induction de changements allostériques dans leurs domaines catalytiques (Bos, Rehmann, and Wittinghofer 2007). Ces changements peuvent être induits par des interactions protéines-protéines ou protéines-lipides, mais aussi par des liaisons à des seconds messagers ou par des modifications post traductionnelles. SOS1 et SOS2 ont la particularité d'être composées d'un domaine N-terminal de liaison aux histones, d'un domaine DH spécifique de RAC, d'un domaine REM suivi d'un domaine CDC25-HD spécifiques de RAS et d'un domaine C terminal riche en prolines. Elles ont donc une activité GEF pour RAC et pour RAS et sont notamment régulées par un recrutement à la membrane par deux types de protéines adaptatrices : GRB2 pour RAS et Abi1/E3B1 pour RAC de manière mutuellement exclusive (Innocenti et al. 2002). GRB2 est une protéine adaptatrice possédant un domaine SH3-SH2-SH3. Son domaine SH2 se lie à la tyrosine phosphorylée du récepteur activé et ses domaines SH3 se lient au domaine riche en prolines de SOS (Aronheim et al. 1994) ce qui permet l'activation de RAS et un rétrocontrôle par ERK qui phosphoryle GRB2 et entraîne la dissociation de SOS. L'activité de SOS est également régulée par un rétrocontrôle positif de RAS-GTP grâce à une interaction allostérique entre RAS-GTP et SOS en dehors du site catalytique (Margarit et al. 2003). Les domaines DH et C terminal ont aussi été rapporté comme auto-inhibant l'activité de SOS (Aronheim et al. 1994; Sondermann et al. 2004), et la phospholipase D2 comme produisant de l'acide phosphatidique qui interagit avec le domaine *pleckstrin homology* (PH) pour réguler positivement SOS (C. Zhao et al. 2007). Les RASGRP sont régulées par des messagers secondaires (calcium et diacylglycérol) et par des interactions directes (Iwig et al. 2013; Ebinu et al. 1998).

Il est par ailleurs intrigant de constater que les mutations activatrices des GEFs ne sont que peu détectées dans les cancers humains (de l'ordre de 3-5% dans certains cancers comme le mélanome ou les cancers de l'endomètre selon le cancer genome atlas) alors que leur rôle dans la régulation de l'activation de RAS est essentiel. En revanche, les mutations germinales de SOS sont une des causes à l'origine d'un syndrome polymalformatif génétique prédisposant aux cancers, le syndrome de Noonan. Enfin, aucune mutation activatrice de RASGRP1 et RASGRP3 n'a été détectée chez l'homme alors que la surexpression de ces protéines a un rôle dans la leucémogénèse (Leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) T) et le cancer de prostate, respectivement (Hartzell et al. 2013; Dazhi Yang et al. 2010).

### E. Le rôle des GAPs

Les GAPs sont également des protéines à multi-domaines dont il existe 5 représentants chez les mammifères : RASA1 (ou p120GAP), la neurofibromine codée par le gène *NF1*, SynGAP/RASA5, la famille GAP1, DAB2IP et GAPVD1 (Hennig et al. 2015). Le domaine de liaison à RAS (appelé GRD pour *Gap related domain*) est hautement conservé parmi les RAS-GAPs. Le mécanisme d'hydrolyse du GTP par les GAPs dépend de plusieurs points essentiels : l'orientation et la polarisation de la molécule d'eau, son maintien dans le site actif et la stabilisation de l'état de transition. Les études structurales du complexe RAS-RASA1 ont permis de mieux comprendre ce mécanisme d'action (Scheffzek et al. 1997). La GAP interagit avec la région switch-2 et stabilise la glutamine 61 (Q61) qui ensuite coordonne l'attaque par la molécule d'eau catalytique. Un résidu arginine en position 789 de RASA1 appelé le doigt d'arginine se positionne dans le site actif de RAS, interagit avec les groupements phosphates  $\alpha$  et  $\beta$  et stabilise l'état de transition en neutralisant une charge négative du  $\gamma$ -phosphate (Ahmadian et al. 1997). Ceci permet donc d'extraire un atome d'hydrogène de la molécule d'eau et l'ion hydroxyl chargé négativement ainsi formé attaque le  $\gamma$ -phosphate du GTP pour créer la réaction d'hydrolyse. L'étude de la pathologie apporte une confirmation importante de la réalité de ces mécanismes moléculaires. En effet, des mutations affectant les gènes de la famille RAS sont fréquemment détectées en positions 12, 13 et 61. Le remplacement de la glycine en position 12 ou 13 par un autre acide aminé provoque un blocage stérique qui empêcherait le doigt d'arginine de RASA1 d'entrer dans le site actif de RAS. Le résidu Q61 prend une part active dans le mécanisme d'hydrolyse du GTP, et une substitution à cette position empêche toute activité GTPase intrinsèque ou médiée par une GAP (Scheffzek et al. 1997).

L'activation de RAS en aval des récepteurs aux facteurs de croissance est principalement régulée par son recrutement à la membrane et par l'action d'une GEF. Cependant, il existe des arguments pour penser, qu'après activation du récepteur, il pourrait exister une régulation négative des GAPs qui serait à l'origine de l'activation de RAS et de la transmission du signal.

RASA1 possède des domaines SH2, SH3, PH et C2 et peut donc s'associer à un récepteur à tyrosine kinase (RTK) (Bernards and Settleman 2004). RASA1 est engagée dans de nombreuses interactions protéine-protéine, comme par exemple avec des kinases aurora (Gigoux et al. 2002), SAM68 (Guitard et al. 1998) ou DOK1 (M. Zhao et al. 2006) ; et certaines de ces interactions modulent son activité. RASA1 peut également être recrutée à la membrane dans certains contextes cellulaires via un influx de calcium (Davis et al. 1996). De la même façon, les GAP de la famille GAP1 peuvent être recrutées à la membrane en présence de calcium (Q. Liu et al. 2005), ou encore par l'activation de la PI3K et la liaison du domaine PH au PIP3 (Bivona et al. 2003)(Cullen and Lockyer 2002). La neurofibromine est activée après stimulation de la voie RAS. Elle a été décrite comme étant régulée par ubiquitination et dépend également de la protéine SPRED1 pour son recrutement à la membrane (Hollstein and Cichowski 2013; Dunzendorfer-Matt et al. 2016; McGillicuddy et al. 2009).

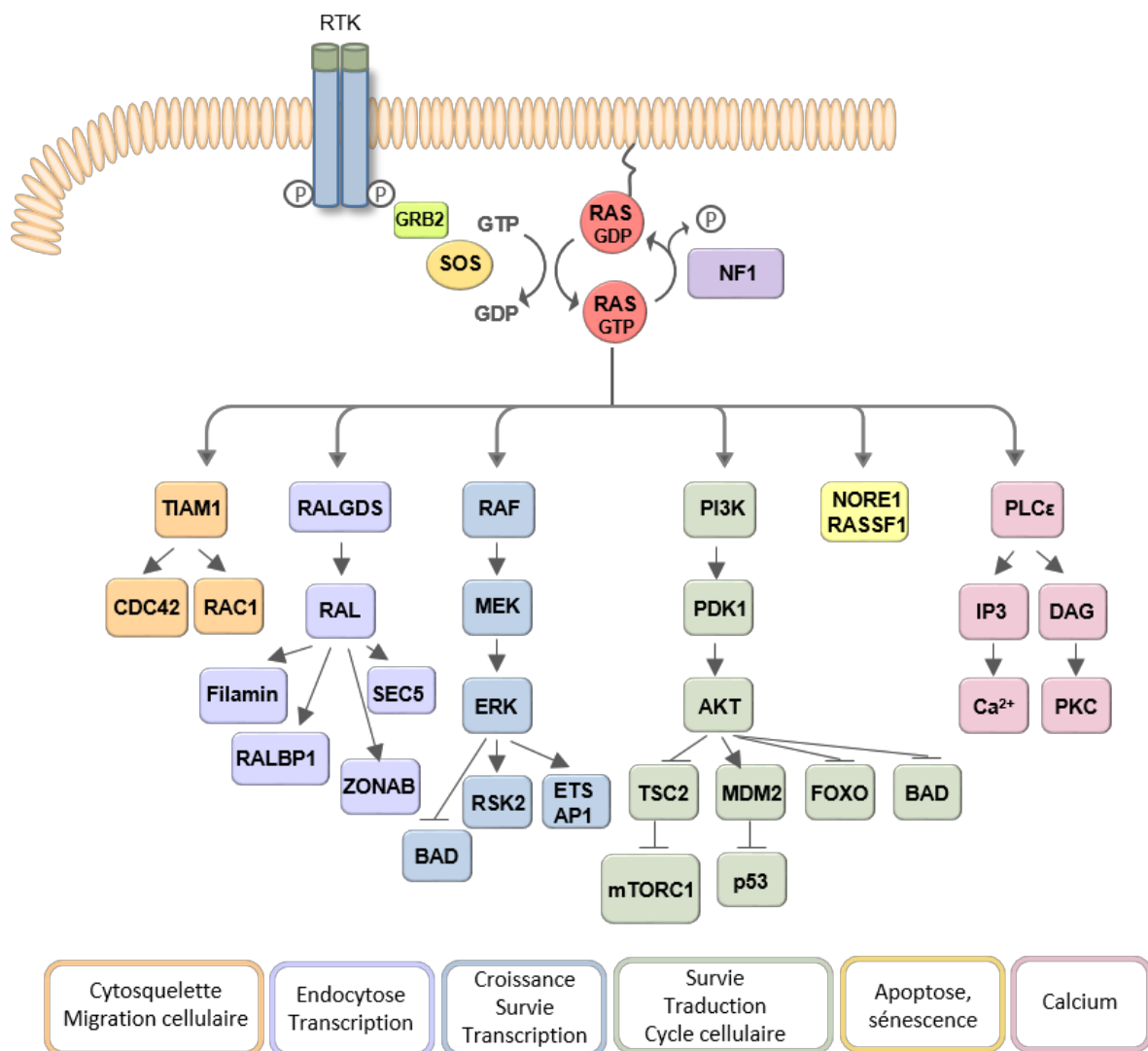
## F. Les effecteurs de RAS

### 1. Généralités

RAS est en aval de différents types de récepteurs, qui, une fois activés, recrutent des protéines adaptatrices comme GRB2 et des GEFs ce qui favorise l'activation de RAS sur la face interne de la membrane plasmique. Contrairement au mécanisme de la commutation qui est hautement conservé entre les espèces, les interactions de RAS avec ses effecteurs sont variées et diffèrent d'une espèce à l'autre. Ainsi, les protéines RAS de *Saccharomyces cerevisiae* (RAS1p et RAS2p) activent l'adénylate cyclase et régulent la production d'AMP cyclique en réponse au glucose intracellulaire (Powers 1992), tandis que les protéines RAS de *Drosophila melanogaster* régulent des protéines RAF ressemblant à celles de la voie de signalisation RAS-MAPK des mammifères (Lusk, Lam, and Tolwinski 2017). En effet, chez les mammifères, les kinases RAF (ARAF, BRAF et CRAF ou RAF-1) (Hagemann and Rapp 1999) sont les effecteurs majeurs de RAS. Les similitudes existantes entre les phénotypes des maladies génétiques constitutionnelles touchant les acteurs de cette voie de signalisation (*HRAS*, *NRAS*, *KRAS*, *BRAF*, *CRAF*, *MEK1*, *MEK2* etc.) suggèrent un rôle central de la voie RAF/MAPK comme relais des signaux induits par l'activation des protéines RAS. Il existe cependant de nombreux autres effecteurs.

Afin d'être considérée comme une protéine effectrice de RAS, la présence d'un domaine de liaison à RAS n'est pas suffisante, il faut que cette protéine interagisse spécifiquement avec la forme de RAS endogène liée au GTP et que cette liaison soit altérée en cas de mutation du domaine effecteur. La fonction de cette molécule effectrice doit être modulée par la liaison à RAS (changement allostérique, recrutement, formation de complexes etc.). Il existe 3 types de domaines de liaison à RAS : les *RAS binding domain* (RBD) trouvés sur RAF ou TIAM1, sur les phosphoinositide 3 kinases (PI3K) de classe I (PI3K-RBD) ou les *RAS associating domain* (RA) (Repasky, Chenette, and Der 2004). Tous les domaines

de liaison à RAS identifiés ont un repliement ubiquitine ( $\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ ), leur offrant un mode d'interaction à RAS similaire. Les effecteurs se lient au même site en formant un feuillet  $\beta$  intermoléculaire entre le feuillet  $\beta_2$  du domaine de liaison à RAS de l'effecteur et le feuillet  $\beta_2$  de RAS (Mott and Owen 2015). Des interactions supplémentaires avec différents domaines de RAS sous formes de liaisons hydrogènes, de ponts salins ou d'interactions hydrophobes dépendent de chaque effecteur. Les structures cristallines de RAS-GppNHp (un analogue du GTP non hydrolysable) lié à son effecteur n'ont été obtenues que pour HRAS avec CRAF, PI3K $\gamma$ , RalGDS, NORE1A, PLC $\epsilon$ , Grb14 et Bry2 et seule la structure cristalline PI3K $\gamma$ -HRAS contient l'effecteur en entier, les autres ne représentant que le domaine de liaison à RAS (Mott and Owen 2015). Parmi les effecteurs reconnus les mieux étudiés on peut noter : RAF (ARAF, BRAF et CRAF), PI3K ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  et  $\gamma$ ), RalGDS, RGL2 et 3, TIAM1, AF6, RIN1 2 et 3, NORE1A, RASSF1A 2 et 4, PLC $\epsilon$ , Grb14 et les GAP NF1 et p120 RAS GAP (Repasky, Chenette, and Der 2004) (Figure 8).



### Figure 8 : RAS et ses principaux effecteurs

Après activation d'un RTK, les GEFs sont recrutées à la membrane et permettent l'activation de RAS. RAS lié au GTP peut activer de nombreux effecteurs, au premier rang desquels on trouve la voie RAF/MAPK et la voie PI3K/AKT qui, grâce à la phosphorylation d'effecteurs et à la transcription de gènes clés, entraînent l'activation de la croissance et la prolifération cellulaire d'une part, et promeuvent la survie d'autre part. D'autres effecteurs sont également en aval de l'activation de RAS : TIAM1 qui permet une régulation du cytosquelette et de la migration cellulaire ; RALGDS impliqué dans les processus d'endocytose ; NORE1 RASSF1 qui régule apoptose et sénescence et PLC $\epsilon$  qui permet d'activer la protéine kinase C et la voie du calcium.

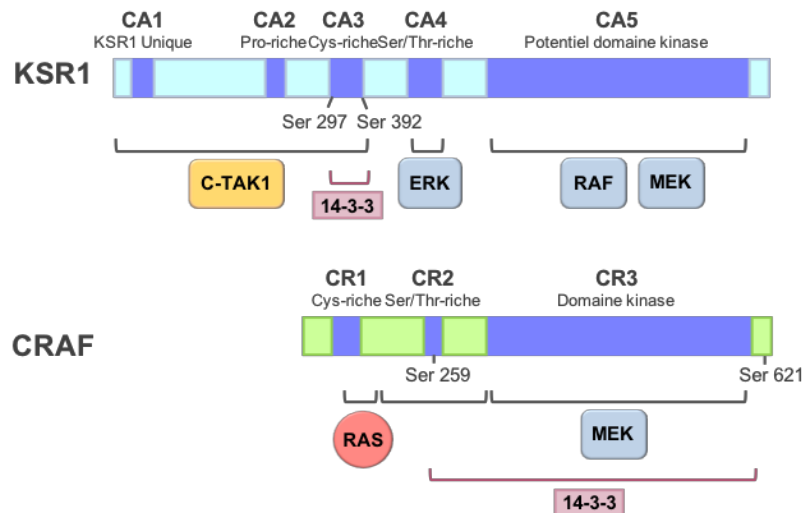
L'affinité de RAS pour RAF est considérablement plus importante que pour d'autres effecteurs. Les interactions avec les autres effecteurs sont favorisées par leurs concentrations localement élevées. Par exemple, les GAPs et PI3K présentent une faible affinité pour RAS, mais interagissent avec RAS grâce à leur recrutement à la membrane ce qui crée un environnement local concentré et permet une interaction directe avec RAS. Par ailleurs, si toutes les isoformes de RAS peuvent se lier à tous les effecteurs, il existe cependant des différences quantitatives et qualitatives dans leur capacité à activer un effecteur particulier.

#### 2. La voie RAF/MAPK

RAS-GTP induit la formation d'homo ou hétérodimères des sérine/thréonine kinases RAF (Rajakulendran et al. 2009) qui phosphorylent et activent les kinases à spécificité double MAP/ERK kinase-1 (MEK1) et MAP/ERK kinase-2 (MEK2), aussi connues sous les noms de *mitogen-activated protein kinase kinase 1* (MAPKK1) et *mitogen-activated protein kinase kinase 2* (MAPKK2). MEK1 et MEK2 activent ERK1 et ERK2 par phosphorylation sur des résidus thréonine et tyrosine conservés formant un motif T-E-Y retrouvé dans leurs boucles d'activation. Des centaines de protéines ont été définies comme étant des substrats ou partenaires de ERK1 et 2, et en particulier, d'autres protéines kinases, des facteurs de transcription comme ETS et AP1 et des protéines régulatrices de l'apoptose mitochondriale. Cette voie de signalisation possède plusieurs particularités. Tout d'abord, la concentration des effecteurs de la voie augmente suivant la voie de signalisation de sorte qu'une faible activation du récepteur peut entraîner une activation significative de ERK. Par ailleurs, de nombreuses protéines d'échafaudage sont nécessaires à l'activation de la voie, augmentant l'efficacité des interactions enzyme-substrat et assurant la fidélité à la voie de signalisation en l'isolant de signaux parallèles. De plus, la régulation de la voie de signalisation se fait grâce à des boucles de rétroaction négatives, la participation de protéines inhibitrices, l'expression de phosphatases. ERK peut phosphoryler MEK1, CRAF, BRAF, KSR1, SOS et les RTK. Les protéines de la famille SPRY inhibent les récepteurs à tyrosine kinase, SOS et interfèrent avec le domaine catalytique de RAS tandis que les phosphatases à spécificité double DUSPs déphosphorylent ERK sur le motif pT-E-pY (Dougherty et al. 2005).

### ***Les kinases de la famille RAF***

Les kinases de la famille RAF possèdent 3 domaines conservés : le domaine CR1 qui possède le RBD, un domaine riche en cystéine (CRD) CR2 qui joue un rôle dans la localisation de RAF, et un domaine kinase CR3 qui est phosphorylé par RAS (Chong, Vikis, and Guan 2003) (Figure 9). Le domaine kinase est relativement conservé parmi les trois isoformes, BRAF ayant 81% d'homologie avec CRAF et 78% avec ARAF. Les différentes isoformes ont des expressions tissulaires et des localisations subcellulaires spécifiques. Des différences biochimiques sont également notées, ARAF est un activateur plus faible de MEK en comparaison à BRAF et CRAF et ne peut activer que MEK1 (Pritchard et al. 1995). RAS lié au GTP recrute RAF à la membrane et se lie à ses deux domaines (RBD et CRD) (Vojtek, Hollenberg, and Cooper 1993; Nassar et al. 1995) avec une affinité identique quelle que soit l'isoforme de RAS. Cependant il a été montré que les isoformes de RAS activaient RAF à des degrés différents, KRAS activant d'avantage CRAF que HRAS (Yan et al. 1998). Bien que BRAF soit l'isoforme la plus fréquemment mutée dans les cancers humains, CRAF est la mieux étudiée. La phosphorylation est un important mécanisme de régulation des kinases RAF revu par Chong et collaborateurs (Chong, Vikis, and Guan 2003). A l'état basal, les kinases RAF sont maintenues dans un état inactif dans le cytosol où la partie N terminale exerce un effet auto-inhibition sur la partie C terminale catalytique. En effet, CRAF est phosphorylée sur les résidus S259 et S621, ce qui permet l'interaction de CRAF avec la protéine 14-3-3 et son maintien sous forme inactive (Morrison et al. 1993). AKT et PKA phosphorylent CRAF sur la S259 (Dhillon et al. 2002; S. Zimmermann and Moelling 1999), tandis que la S621 est un site d'autophosphorylation de CRAF, essentiel à sa structure tertiaire (Noble et al. 2008). BRAF a 3 sites de phosphorylation par AKT : la S365, équivalente à la S259 de CRAF et les S428 et T439, qui participent à son inhibition.



**Figure 9 : Représentation des domaines de KSR1 et CRAF d'après (Kolch 2005)**

KSR possède 5 domaines conservés : CA1 unique à KSR1 ; CA2 qui est une séquence proline riche ; CA3 permettant une interaction avec les lipides membranaires ; CA4 qui est une région riche en sérine/thréonines se liant à ERK et CA5 qui est le potentiel domaine kinase. C-TAK1 phosphoryle les sites de liaisons de la protéine 14-3-3 (S297 et S392) et MEK et RAF se lient au domaine CA5. Les kinases RAF (ici CRAF est représenté) possèdent 3 régions conservées : CR1 qui contient en partie le domaine de liaison à RAS ; CR2 ; et CR3 le domaine kinase qui se lie à MEK. La liaison à la protéine 14-3-3 lorsque les résidus S259 et S621 sont phosphorylés séquestre RAF dans le cytosol.

Lors de l'activation de la voie, RAS activée recrute les protéines RAF à la membrane plasmique ou les phosphatases, protéine phosphatase 1 (PP1) et protéine phosphatase 2 (PP2A) déphosphorylent la S259, ce qui induit la libération de 14-3-3 du site de liaison N-terminal et facilite les étapes de phosphorylation et l'activation du domaine catalytique de RAF (McKay and Morrison 2007). RAF est ensuite activé par phosphorylation sur 2 sites importants : la région N terminale négativement chargée et le segment d'activation. La phosphorylation du site de liaison à la protéine 14-3-3 joue également un rôle dans l'activation de RAF lors de sa dimérisation (voir plus bas). Dans la région N terminale de CRAF, la S338 est phosphorylée par PAK (King et al. 1998) et CK2 (Ritt et al. 2007) et les S339, Y340 et Y341 par SRC (N. G. Williams, Roberts, and Li 1992). La S338 de CRAF correspond à la S446 de BRAF qui est constitutivement phosphorylée, expliquant son taux d'activation basal plus important. Les résidus T491 et S494 situés dans le segment d'activation de CRAF sont phosphorylés d'une manière dépendante de RAS et correspondent aux résidus T599 et S602 de BRAF. La phosphorylation du domaine catalytique permet de déstabiliser la conformation inactive maintenue par les interactions hydrophobes entre la boucle riche en glycine et le domaine catalytique et de stabiliser la conformation active.

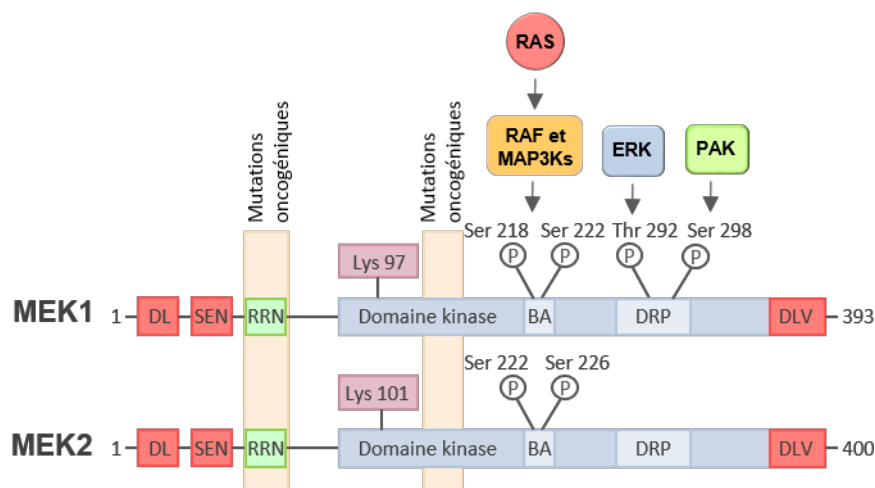
Il est par ailleurs désormais établi que l'interaction de RAF avec RAS induit la formation d'homo- ou d'hétéro-dimères de RAF. Cela avait initialement été constaté en situation oncogénique indépendamment de RAS, où les formes de BRAF mutées ayant une activité kinase réduite se dimérisait



à CRAF en l'activant ainsi que la voie MEK/ERK (Wan et al. 2004). La formation d'homo- et d'hétéro-dimères de BRAF et CRAF a ensuite été montrée en situation physiologique. Cette dernière était cependant dépendante de l'activation de RAS (Rushworth et al. 2006; Ritt et al. 2010; Rajakulendran et al. 2009). La formation d'un dimère permet des modifications allostériques avec une réorientation de l'hélice  $\alpha$ C du lobe N de la protéine et le réarrangement de la courte hélice H1 du segment d'activation phosphorylé du lobe C, ce qui favorise l'activité catalytique de ces kinases (Thevakumaran et al. 2015). Une fois activées, les kinases RAF peuvent initier la cascade de phosphorylation en phosphorylant MEK sur 2 sérines dans sa boucle d'activation (Kyriakis et al. 1992). Un rétrocontrôle négatif de CRAF et BRAF par ERK induisant des phosphorylations sur de multiples résidus fait suite à cette cascade d'activation (Dougherty et al. 2005; Ritt et al. 2010). Les protéines CRAF et BRAF hyperphosphorylées sont ensuite déphosphorylées par les phosphatases Pin1 propyl-isomérase et PP2A.

### Les kinases à spécificité double MEK

MEK1 et MEK2 sont des kinases à spécificité double, ce qui signifie qu'elles sont capables de phosphoryler les résidus sérine / thréonine en même temps que les résidus tyrosines. Ce sont les seuls activateurs de ERK1 et ERK2. Elles sont composées d'une région N terminale, d'un domaine central protéine kinase comprenant la boucle d'activation et un segment riche en prolines, et d'une extrémité carboxy-terminale (Figure 10). La région N-terminale comprend un site de liaison (DL) à ERK1/2, une séquence d'export nucléaire (SEN) contrôlant la localisation cytoplasmique de MEK1 et 2, et une région régulatrice négative (RRN) qui les maintient dans une conformation inactive. L'extrémité C terminale contient un site de liaison versatile (DLV) MAPKKK.



**Figure 10 : Isoformes de MEK selon (Caunt et al. 2015)**

DL signifie domaine de liaison ; SEN, séquence d'export nucléaire ; RRN, région régulatrice négative ; BA, boucle d'activation ; DRP, domaine riche en prolines ; DLV, domaine de liaison versatile.

Comme de nombreuses kinases, dans sa conformation en 3 dimensions, la protéine est composée d'un petit lobe N contenant une hélice C et d'un plus grand lobe C. A l'intersection des deux lobes se trouve une région conservée qui permet la liaison du substrat, de l'ATP et l'activité de transfert de phosphate. L'hélice C et le lobe C sont réarrangés après phosphorylation des S218 et S222 de MEK1 et des S222 et S226 de MEK2 par RAF, pour permettre l'activité kinase (C. F. Zheng and Guan 1994; Alessi et al. 1994). MEK1 reçoit également un signal des intégrines et est phosphorylée de manière dépendante de RAC par la kinase activée p21 (PAK1) sur un résidu S298 (Eblen et al. 2002). MEK1 et MEK2 peuvent former des hétérodimères. RAF n'est pas le seul activateur de MEK1 et 2 ; MEKK1, MEKK3, MAP3K8 et les kinases de lignage mixte (MLK) peuvent également activer MEK1 et MEK2 ainsi que d'autres voies MAPK et NFκB (Cuevas, Abell, and Johnson 2007; Marusiak et al. 2014). MEK activé phosphoryle ERK1/2 sur un motif conservé T-E-Y (T202 et Y204 sur ERK1 et T183 et Y185 sur ERK2) sur leur boucle d'activation, induisant un changement conformationnel (Canagarajah et al. 1997). Les sites d'interactions de ERK sur MEK sont nombreux et invitent à penser qu'ils servent également de site d'ancrage cytosolique et d'export nucléaire de la protéine ERK inactive (Adachi, Fukuda, and Nishida 2000; Rubinfeld, Hanoch, and Seger 1999). ERK activée se détache de MEK et peut être transloquée dans le noyau, où elle peut rester quelques minutes à plusieurs heures.

### ***ERK1 et ERK2***

La famille ERK comprend quatre membres : ERK1/2, JNK1/2/3, MAPK p38 (p38α/β/γ/δ) et ERK5 ; seuls ERK1/2 étant des substrats de MEK1/2. Les protéines ERK1/2 sont co-exprimés dans de nombreux tissus, et sont codées par des gènes différents leur conférant une homologie de séquences de 83% (Boulton et al. 1991). Bien que leur rôle soit redondant dans de nombreux tissus, des spécificités existent pour chaque isoforme (Voisin et al. 2010; Yao et al. 2003).

Les substrats des kinases ERK1/2 sont phosphorylés sur des résidus sérine ou thréonine suivi d'une proline (S/T-P). Deux types de domaines permettent la liaison de ERK à son substrat : les domaines D (appelés aussi motif DEJL) et les domaines DEF (appelés aussi FXFP, Phe-X-Phe-Pro) (Dimitri et al. 2005). Les domaines D sont des sites de liaison communs à de nombreuses MAPK et ont été décrits initialement pour JNK (Kallunki et al. 1994). Les domaines DEF sont caractérisés par l'existence d'une séquence FXFP adjacente du site de phosphorylation S/T-P (Biondi and Nebreda 2003). Plus de 160 substrats de ERK ont été décrits jusqu'à présent, de localisation cytosolique ou nucléaire (Yoon and Seger 2006). Ce sont des facteurs de transcription, des protéines kinases et phosphatases, des protéines du cytosquelette, des récepteurs, des protéines impliquées dans l'apoptose, etc. La plupart du temps la phosphorylation de ces substrats par ERK induit leur activation, mais elle peut également réguler leur localisation, leur dégradation et modifier leurs interactions avec d'autres protéines. Parmi les facteurs de transcription on peut noter Elk1 qui appartient à la sous-famille des facteurs à complexe

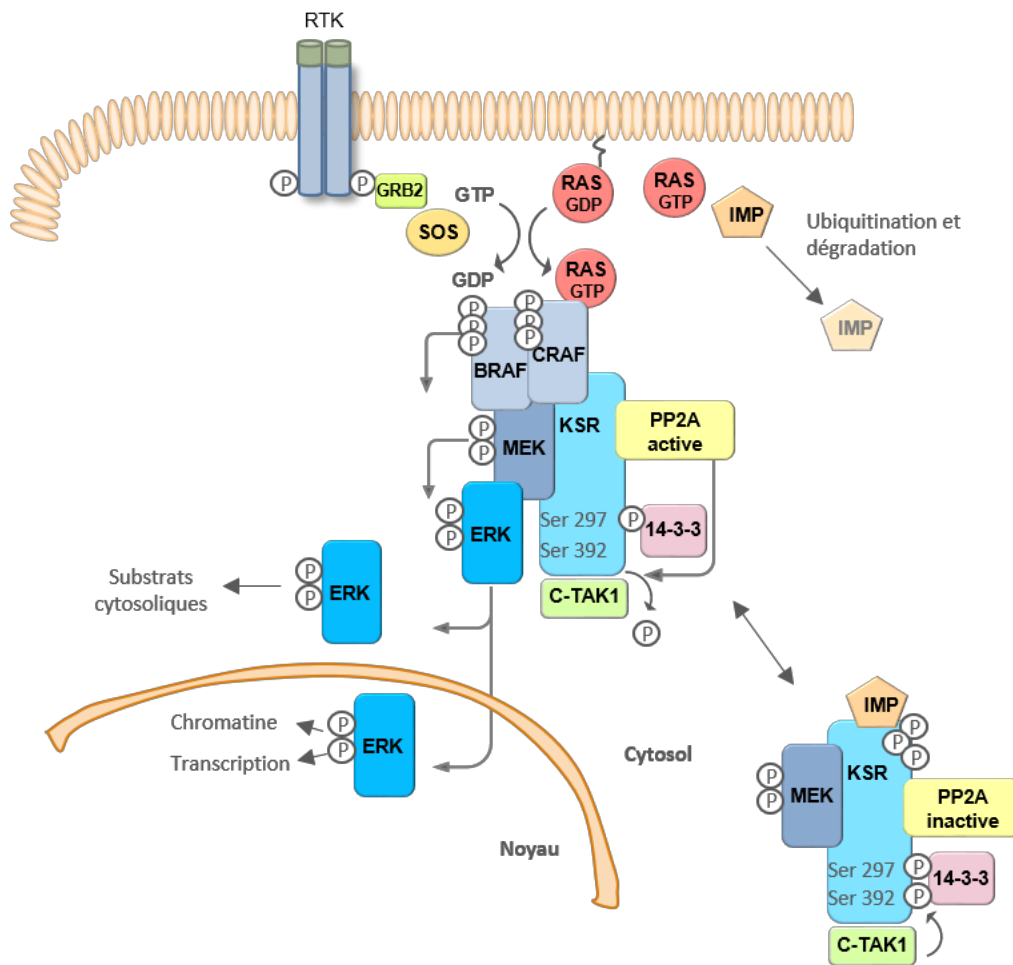
ternaire (TCF) de la famille des facteurs de transcription à domaine ETS et dont la liaison à l'ADN est favorisée par la phosphorylation de ERK. C-Fos est également une cible importante, il se complexe à C-jun pour former une des formes de facteurs de transcription AP-1 impliquée dans la prolifération, la différenciation ou encore la transformation oncogénique (Eferl and Wagner 2003). Parmi les autres facteurs de transcription régulés par ERK on peut également citer C-myc. Ces facteurs de transcription sont à l'origine de la transcription rapide de gènes « précoces immédiats » qui participent notamment à la prolifération cellulaire ou au cycle cellulaire. Au sein des substrats cytoplasmiques, l'une des cibles majeures de ERK est la famille de kinases *ribosomal S6 kinase* (RSK) à l'origine de la diversité des réponses cellulaires de la voie de signalisation (prévention de l'apoptose, induction du cycle cellulaire, etc). Les kinases MNK et MSK sont également des substrats de ERK. ERK phosphoryle aussi des protéines de régulation du cytosquelette et de la motilité cellulaire comme paxillin, vinexin ou calnexin. Bien que la prolifération cellulaire soit le rôle le plus connu de la voie RAF/ERK-MAPK, la survie cellulaire par la régulation de l'apoptose mitochondriale est désormais reconnue comme étant l'une de ses principales activités (Balmanno and Cook 2009). ERK est en partie responsable de la phosphorylation et régulation transcriptionnelle de BIM, de la phosphorylation de BAD dans certains modèles, et de la stabilisation de MCL-1, par phosphorylation directe ainsi que par régulation de GSK3 $\beta$ .

### **Régulation de la voie RAF/MAPK**

Comme expliqué précédemment les protéines d'échafaudage jouent un rôle essentiel dans la dynamique d'activation spatio-temporelle de la voie RAF/MAPK ainsi que dans sa spécificité (Good, Zalatan, and Lim 2011) en favorisant le rapprochement et l'activation des différentes kinases (Casar et al. 2009). De plus, leur localisation subcellulaire participe à la compartimentation de la signalisation RAS/MAPK. Cependant, la stœchiométrie relative des protéines d'échafaudage par rapport à leurs partenaires peut avoir des effets opposés à ceux attendus. En effet, en excès elles auront tendance à inhiber la voie de signalisation en interagissant avec substrats et kinases indépendamment, empêchant ainsi leur interaction (W. Yu et al. 1998; Levchenko, Bruck, and Sternberg 2000). Parmi ces protéines nous citerons la kinase suppresseur de RAS1 (KSR1), MEK-partenaire 1 (MP1), Sef, Paxillin, CNK,  $\beta$ -arrestine 2, PEA15 etc.

Les protéines KSR1 et KSR2 ont des homologies avec RAF, mais leur domaine kinase semble être inactif, suggérant que ces protéines ont un rôle prépondérant de protéines d'échafaudages (Figure 9). Dans les cellules quiescentes, KSR est localisée dans le cytoplasme, séquestrée par un dimère de protéines 14-3-3 arrimé sur les résidus S297 et S392 phosphorylés par TAK1 et masquant ainsi son domaine riche en cystéines permettant sa liaison à la membrane (Müller et al. 2001). Elle interagit de manière constitutive avec MEK1/2, PP2A, CK2 et TAK1 (Ritt et al. 2007) et peut se lier à ERK1/2 (F. Roy et al.

2002) (Figure 11). Lors de l'activation de RAS, KSR est libérée de son interaction avec les protéines 14-3-3 par déphosphorylation de la S392 par PP2A, et se porte à la membrane. KSR est retrouvée sous forme d'hétérodimères avec RAF à la membrane, favorisant la co-localisation de RAF, MEK et ERK bien qu'il ne soit pas démontré que MEK pouvait phosphoryler ERK dans cette configuration (Lavoie and Therrien 2015). KSR1 participe également à l'activation de RAF (Rajakulendran et al. 2009), et il a été montré que le complexe KSR-MEK régulait l'hétérodimérisation et l'activation de BRAF (Lavoie et al. 2018).



**Figure 11 : La voie RAF/MAPK et sa régulation par KSR d'après (Kolch 2005)**

Après liaison du récepteur à son ligand, RAS est recruté à la membrane et activé. RAS recrute alors RAF à la membrane, qui est déphosphorylé sur ses sites de liaison à la protéine 14-3-3. RAF est activé par phosphorylation et par son hétérodimérisation. KSR est également recrutée à la membrane plasmique par RAS-GTP qui permet : la dissociation d'IMP lui-même dégradé par ubiquitination, et l'activation de PP2A qui déphosphoryle un des sites de liaison de la protéine 14-3-3 afin de démasquer le domaine C1 permettant la liaison à ERK. KSR à la membrane plasmique interagit avec RAF et induit une colocalisation avec MEK et ERK pour permettre l'activation de la voie et la phosphorylation des substrats cytosoliques et nucléaires de ERK.

MP1 est une autre protéine d'échaffaudage localisée dans les endosomes tardifs grâce à une interaction constitutive avec la protéine p14 et permet de rapprocher MEK1 et ERK1 et donc l'activation de ERK1 (Teis, Wunderlich, and Huber 2002).

Sef est également une protéine d'échafaudage localisée dans le Golgi, elle se lie sélectivement à MEK activé et entraîne l'activation de ERK à la membrane du Golgi. Cependant, elle conserve le complexe MEK/ERK empêchant la translocation de ERK dans le noyau et restreignant ainsi la signalisation aux substrats cytosoliques (Torii et al. 2004).

IQGAP1 est une protéine connue pour réguler le cytosquelette et notamment la migration cellulaire en interagissant avec CDC42. Elle se lie également à RAF, MEK1 et ERK1 et a été rapporté à une activation de ERK en réponse à la signalisation EGF (J.-G. Ren, Li, and Sacks 2007; Hedman, Smith, and Sacks 2015).

La paxilline est une protéine d'échafaudage importante pour les complexes d'adhésion focale et la régulation du cytosquelette et de la migration cellulaire. Elle est associée de manière constitutive à MEK et, en réponse au facteur de croissance des hépatocytes (HGF), à CRAF et ERK.

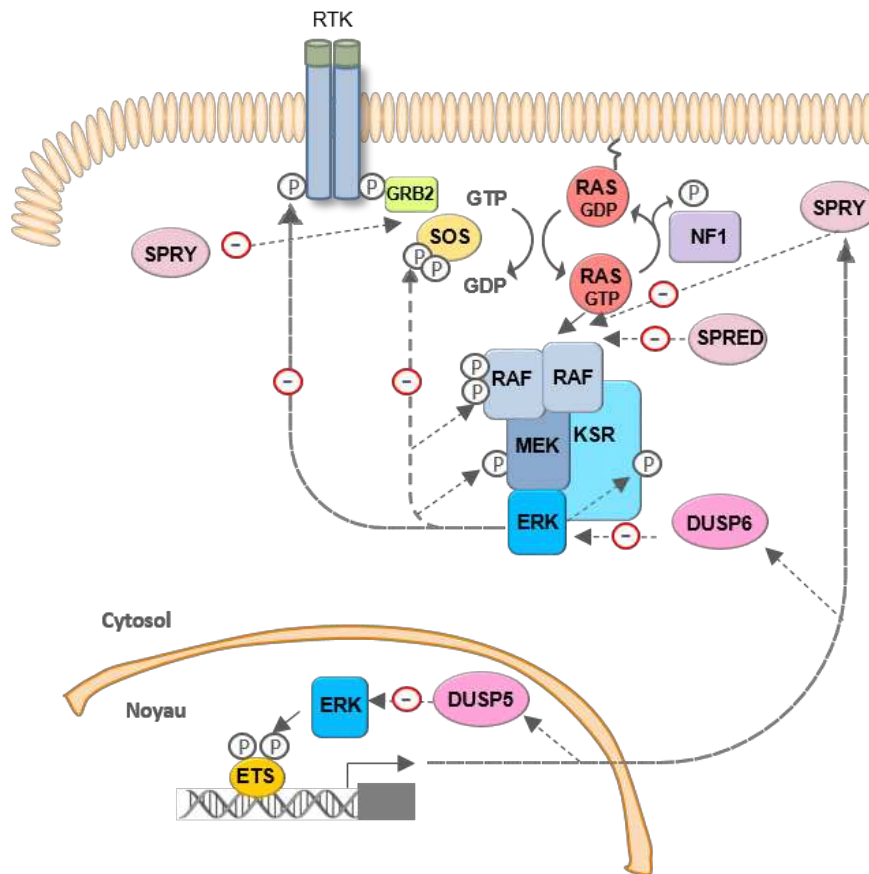
CNK (connecteur de l'activateur KSR) a 3 isoformes chez les mammifères, CNK1 qui se lie à CRAF, CNK2 exprimé uniquement dans les neurones se liant à BRAF et CRAF, et CNK3 encore insuffisamment caractérisée. Les protéines CNK régulent au moins quatre voies : la voie ERK / MAPK en renforçant l'activation de CRAF induite par RAS et SRC, la voie du cytosquelette en organisant des protéines de polarité cellulaire, la voie Rho, et l'apoptose grâce à RASSF1A (Ziogas, Moelling, and Radziwill 2005; Kolch 2005).

La  $\beta$ -arrestine 2 se lie aux récepteurs couplés à une protéine G (GPCR) lors de leur internalisation et intervient dans l'activation de ERK en l'assemblant à CRAF et MEK et en le dirigeant vers différents compartiments cellulaires (à l'exception du noyau) (Kolch 2005).

PEA15 (phosphoprotéine enrichie en astrocytes) est également décrite comme étant une protéine d'échafaudage en aval de la voie. Elle se lie à ERK et l'empêche de se localiser dans le noyau (Formstecher et al. 2001), elle permet également l'interaction entre ERK et son substrat RSK2 (Vaidyanathan et al. 2007).

SHOC2 est une protéine ubiquitaire, composée presque exclusivement de répétitions riches en leucine et identifiée à l'origine chez *C. elegans* en tant que protéine d'échafaudage ERK (Selfors et al. 1998; Sieburth, Sun, and Han 1998). MRAS est une GTPase de la famille RAS. Une fois activée, elle se lie à SHOC2 qui se lie alors à la sous unité catalytique de PP1 pour former une holoenzyme phosphatase qui déphosphoryle spécifiquement la S259 de CRAF (S365 de BRAF) le site de liaison de la protéine 14-3-3 et joue un rôle clé dans le cycle d'activation de RAF (Pablo Rodriguez-Viciano et al. 2006).

La voie RAF-MAPK est également finement et étroitement régulée par des rétrocontrôles et l'interaction de protéines inhibitrices (Figure 12).



**Figure 12 : Régulation négative de la voie RAF/MAPK selon (Caunt et al. 2015)**

Plusieurs mécanismes de régulation négative après stimulation de la voie RAF/MAPK sont mis en jeu : des rétrocontrôles par phosphorylation exercés par ERK, l'action des protéines SPRY et SPRED et la transcription puis traduction des gènes codant pour les phosphatases DUSP5 et DUSP6.

ERK activé phosphoryle CRAF et BRAF, exerçant un rétrocontrôle négatif sur la phosphorylation de MEK (Dougherty et al. 2005; Ritt et al. 2010), et phosphoryle de même MEK1 ce qui empêche la phosphorylation de ERK (Eblen et al. 2004) et SOS, à proximité de ses séquences riches en proline, inhibant l'interaction de SOS avec les domaines SH3 de GRB2 et empêchant le recrutement de SOS à la membrane plasmique (Corbalan-Garcia et al. 1996) .

Différentes phosphatases sont à l'origine de la déphosphorylation de ERK et donc de l'inhibition de la voie. ERK peut être déphosphorylée par des sérine-thréonine phosphatases, des tyrosines phosphatases ou les DUSP. La déphosphorylation d'un seul résidu suffit à inactiver la protéine (Keyse 2000). La déphosphorylation par les DUSP est largement majoritaire. Parmi les 10 membres de la famille DUSP, DUSP6 et DUSP5 sont spécifiques de ERK1/2, contrairement à DUSP8 (spécifique de p38 et JNK MAPK) et DUSP1 (qui déphosphoryle les 3 classes de MAPK) (Caunt and Keyse 2013). Elles peuvent se lier à ERK phosphorylée ou non, et pour DUSP6, la liaison à ERK entraîne une activation de sa fonction catalytique. DUSP6 possède une séquence d'export nucléaire tandis que DUSP5 possède une séquence de localisation nucléaire, ces propriétés leur permettent, outre leur rôle de phosphatase de réguler la localisation de ERK dans les différents compartiments subcellulaires. DUSP5 et DUSP6

régulent ainsi la signalisation ERK en fonction des différents types d'activation (soutenue, brève, etc.), et leur expression est induite par ERK (Caunt and Keyse 2013).

Il existe d'autres régulateurs négatifs de la voie tels que les protéines SPROUTY et SPRED (Sprouty-related, EVH1 domain-containing protein 1) qui ont en commun de posséder un domaine SPR (pour *Sprouty-related C-terminal cystéine-rich*) pouvant être palmytoylé ce qui entraîne leur localisation à la membrane (H. J. Kim and Bar-Sagi 2004). La famille SPROUTY comporte 4 membres chez les mammifères (SPRY1, SPRY2, SPRY3 et SPRY4) et inhibe la voie RAS par différents mécanismes. Elles peuvent séquestrer le complexe GRB2/SOS, empêchant alors l'activation de RAS (Hanafusa et al. 2002); et elles bloquent également directement le domaine catalytique de RAF (Sasaki et al. 2003). Dans le contexte d'une activation de RAS induite par l'EGFR, SPRY2 peut également activer la voie en empêchant l'ubiquitination du récepteur grâce à une liaison à l'ubiquitine-ligase CBL (Hall et al. 2003). La famille SPRED comprend 4 membres : SPRED1, SPRED2, SPRED3 et Eve3 (un variant d'épissage de SPRED3) et régule négativement la voie RAS (Wakioka et al. 2001). Les mécanismes précis d'action des protéines SPRED sont imparfaitement connus. Comme SPRED prolonge l'association de RAF à la membrane plasmique et augmente la liaison de RAF à RAS, l'expression de SPRED pourrait diminuer l'activation de RAF en modifiant son accessibilité aux activateurs (Wakioka et al. 2001; Bundschu, Walter, and Schuh 2007). Ces protéines interfèrent également avec l'ancrage de KRAS à la membrane (Siljamäki and Abankwa 2016). Récemment, il a aussi été montré qu'elles pouvaient favoriser le recrutement de la neurofibromine sur RAS et ainsi réprimer l'activité de cette dernière (Stowe et al. 2012; Hirata et al. 2016).

*Raf kinase inhibitor* (RKIP) est également une protéine inhibitrice qui se lie à RAF et MEK pour inhiber leur action (Yeung Nature 1999) et empêche l'activation complète de RAF notamment en réponse à la phosphorylation de la S338 induite par PAK (Trakul et al. 2005). *RKIP* est considéré comme un gène suppresseur de tumeur car la diminution d'expression de RKIP a montré être associée à une progression tumorale, à l'émergence de métastases (Schuierer et al. 2004) et au développement de certains cancers du pancréas (Karamitopoulou et al. 2013). Tandis que sa réexpression sensibilise à la chimiothérapie (Chatterjee et al. 2004)).

### **Le cas de SHP2**

*Src homology 2-containing phosphotyrosine phosphatase* (SHP2) est une protéine majoritairement cytoplasmique, codée par le gène *PTPN11*. C'est une phosphatase ayant également un rôle de protéine d'échafaudage en aval de différents récepteurs qui participe notamment à la régulation de la voie RAS. SHP2 est ubiquitaire et possède un domaine SH2 N terminal (N-SH2), un domaine SH2 C terminal (C-SH2) et un domaine phosphotyrosine phosphatase (PTP). La liaison entre son domaine N-SH2 et son domaine PTP la maintient dans une configuration inactive. Elle a la propriété de se lier aux récepteurs

à activité tyrosine kinase ou à des protéines d'ancrage ce qui permet la libération de sa conformation auto-inhibitrice, la phosphorylation des résidus Y542 et Y580 de son domaine C terminale et entraîne l'activation de son domaine phosphatase. Elle est impliquée dans de nombreuses cascades de signalisation comme les voies RAS/MAPK, JAK-STAT, PI3K-AKT, Rho, NFκB, et NFAT (Neel, Gu, and Pao 2003; Tonks 2006; D. Xu and Qu 2008). Son action est à la fois dépendante et indépendante de son activité catalytique. Concernant la voie RAS, il a été depuis longtemps démontré qu'elle agissait en amont de RAS et favorisait l'activation de la voie. Cependant, son mécanisme d'action, à savoir, si elle inhibait l'activité des GAP ou si elle favorisait l'échange de nucléotides restait controversé. La première fonction à avoir été décrite, était celle de recruter GRB2/SOS, via ses sites de phosphorylation en N terminal, à la membrane et au RTK (W. Li et al. 1994; A. M. Bennett et al. 1994). Il a ensuite été démontré qu'elle favoriserait l'activation de la voie RAS en empêchant l'accès des régulateurs négatifs à leurs enzymes cibles (Neel, Gu, and Pao 2003). En effet, SHP2 prévient la localisation de RAS-GAP à la membrane en déphosphorylant ses sites de liaison sur le récepteur ou sur les protéines d'ancrage (Agazie and Hayman 2003). Elle déphosphoryle également SPRY pour l'empêcher de se lier à la membrane et de recruter, et donc d'inhiber GRB2/SOS (Hanafusa et al. 2004). SHP2 active aussi les Src kinases en déphosphorylant Cbp (*Csk binding protein*) et en empêchant la liaison de Csk (un régulateur négatif de Src) aux Src kinases (S. Q. Zhang et al. 2004). De plus, Bunda *et al.* ont décrit la phosphorylation du résidu Y32 dans la région switch I de RAS par les Src kinases, favorisant la liaison aux RAS-GAP par un mécanisme conformationnel et empêchant la liaison de RAS à RAF. Dans ce contexte, SHP2 serait ensuite responsable de la déphosphorylation du résidu Y32 de RAS-GDP, permettant de recruter les adaptateurs GRB2 et SOS et l'interaction entre RAS et RAF, (Bunda et al. 2015). Enfin, des avancées récentes montrent qu'elle serait aussi impliquée directement dans l'activation de RAS en favorisant l'échange de nucléotides, au sein d'un complexe multiprotéique avec SOS1 et GRB2 (Fedele et al. 2018; Nichols et al. 2018). Elle posséderait de ce fait, un rôle essentiel dans certains cancers RAS activés qui possèdent une sensibilité résiduelle aux GEF.

Par ailleurs, SHP2 a un rôle important dans l'hématopoïèse normale (Pandey, Saxena, and Kapur 2017). En effet, les modèles murins d'inactivation conditionnelle ont montré qu'elle participait au maintien des cellules souches hématopoïétiques (grâce à sa fonction phosphatase et par l'activation de ERK) (G. Chan et al. 2011; Zhu et al. 2011); à la différenciation mégacaryocytaire en déphosphorylant RUNX1 pour permettre son association à GATA1 (Huang et al. 2012); et à la différenciation érythrocytaire (Usenko et al. 2014).

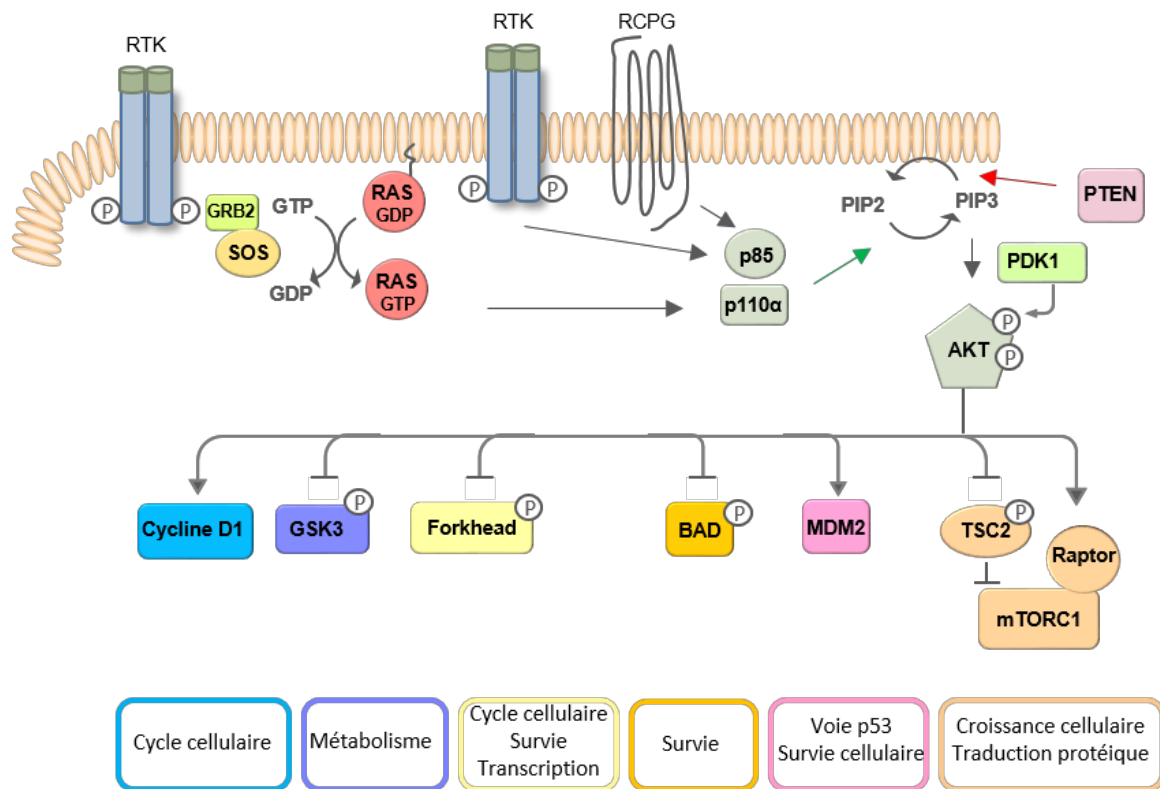
Les mutations germinales de *PTPN11* font partie des causes des syndromes malformatifs de Noonan, et de Noonan avec multiples lentigines. SHP2 est la première phosphatase à avoir été considérée oncogénique (R. J. Chan and Feng 2007); des mutations somatiques sont décrites dans plusieurs cancers dont les leucémies myélomonocytaires juvéniles (LMMJ), les LAM mais aussi dans des



neuroblastomes et des carcinomes (poumon, sein). Récemment, des inhibiteurs allostériques ont vu le jour et pourraient s'avérer efficaces dans plusieurs pathologies (Y.-N. P. Chen et al. 2016; Ran et al. 2016).

### 3. La voie PI3K/AKT

Les PI3K sont les membres d'une famille conservée de kinases lipidiques divisée en trois classes en raison de leurs différentes spécificités de substrat et de leurs homologies de séquence (Castellano and Downward 2011). Les PI3K de classe I sont des hétérodimères dont les sous-unités catalytiques sont diverses et comprennent p110 $\alpha$ , p110 $\beta$ , p110 $\gamma$  et p110 $\delta$ , codées par des gènes très fréquemment mutés dans les cancers solides (en particulier PIK3CA codant p110 $\alpha$ ) mais pas dans les LAM (Samuels et al. 2004). Elles sont divisées en deux classes : les protéines de classe IA (p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  et p110 $\delta$ ) activées en aval des RTK et impliquant la sous-unité régulatrice p85 ; et les protéines de classe IB définie par l'interaction de p110 $\gamma$  à p101 ou p87 et activées en aval des récepteurs couplés aux protéines G. Les PI3K de classe II comprennent les PI3K-C2 $\alpha$ , PI3K-C2 $\beta$  et PI3K-C2 $\gamma$ . VPS34 est la seule PI3K de classe III. Les PI3K de classe I sont principalement activées en aval d'un RTK selon 3 modalités : 1) par liaison directe de p85 à un motif phosphorylé du récepteur ; 2) par des adaptateurs moléculaires (liaison de GRB2 au RTK, puis de GRB2 à GAB et enfin de GAB à p85) ; 3) par RAS (Figure 13). L'activation de PI3K dépendante de RAS est induite par la liaison du RBD de p110 à RAS (Pablo Rodriguez-Viciana, Sabatier, and McCormick 2004; Kodaki et al. 1994; Rubio et al. 1997), avec, comme pour RAF, la formation d'un feuillet  $\beta$  intermoléculaire. HRAS, KRAS et NRAS peuvent se lier à p110 $\alpha$  et p110 $\gamma$  (Pablo Rodriguez-Viciana, Sabatier, and McCormick 2004) tandis que RRAS peut activer p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  et p110 $\gamma$ . La PI3K une fois activée phosphoryle des phospholipides, le phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>) et le phosphatidylinositol (4)-phosphate (PI(4)P) sur le groupe inositol 3-hydroxyl, générant ainsi du phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PI(3,4,5)P<sub>3</sub>) ou PIP<sub>3</sub> et du phosphatidylinositol (3,4)-bisphosphate (PI(3,4)P<sub>2</sub>) respectivement. Le PIP<sub>3</sub> est un second messenger lipidique important qui peut se lier au domaine PH de protéines effectrices provoquant ainsi leur activation ou leur translocation. C'est ainsi que l'enzyme PDK1 est recrutée à la membrane, lui permettant de phosphoryler la sérine thréonine kinase AKT localisée à proximité via son domaine PH sur la T308. Cette première phosphorylation permet l'activation complète d'AKT via un second évènement de phosphorylation sur la S473 médié par le complexe mTORC2 (*mammalian target of rapamycin complex 2*). AKT est une kinase ayant un fort potentiel oncogénique via de nombreux substrats régulant l'apoptose, le métabolisme, le cycle cellulaire, l'import du glucose, l'autophagie, le remodelage du cytosquelette etc (Figure 13). Le PIP<sub>3</sub> est déphosphorylé en premier lieu par la phosphatase PTEN (pour *phosphatase and tensin homolog*) mais également par SHP2.



**Figure 13 : Voie de signalisation PI3K/AKT et ses effecteurs**

La voie PI3K/AKT peut être activée par 3 mécanismes : activation directe de p110 $\alpha$  par RAS-GTP, ou activation en aval des RTK ou RCPG (récepteurs couplés aux protéines G). Le second messenger PIP3 permet le recrutement de PDK1 et d'AKT cette dernière étant successivement phosphorylée par PDK1 et mTORC2. AKT possède de très nombreux effecteurs qu'elle régule par phosphorylation. Elle permet notamment l'activation de la voie mTORC1 par phosphorylation de Raptor et de TSC2 (bloquant l'activité de cette dernière). Elle est également impliquée dans la régulation du cycle cellulaire via la cycline D1, la régulation de l'apoptose via BAD, la survie cellulaire et le cycle cellulaire via les facteurs de transcription FOXO, le métabolisme via GSK3 et la voie p53 via MDM2.

Il existe de nombreuses interactions et rétrocontrôles entre les voies PI3K et RAF/MAPK. L'importance de la voie RAS/PI3K a été soulignée par des modèles murins. Suire *et al* ont généré des souris porteuses d'une mutation du gène *PIK3CG* (codant p110 $\gamma$ ) dans le domaine RBD et dont le phénotype hématologique retrouvait des anomalies fonctionnelles des polynucléaires neutrophiles. Un autre modèle a consisté à introduire une mutation du gène *PIK3CA* codant p110 $\alpha$  empêchant son interaction avec RAS. Ces anomalies étaient généralement létales pour la souris avant l'âge adulte et les animaux avaient des défauts du système lymphatique, de l'angiogenèse et des fonctions macrophagiques (Gupta *et al.* 2007). L'interaction entre PI3K et RAS semble également essentielle dans le développement tumoral (Castellano *et al.* 2013) et notamment par l'inhibition de l'apoptose par différents mécanismes. De plus, la voie de signalisation KRAS-PI3K joue un rôle important dans l'érythropoïèse, comme cela a été montré dans un modèle murin d'inactivation de KRAS au niveau du foie fœtal (Jing Zhang and Lodish 2005), et semble également essentielle au cours de l'hématopoïèse (Wandzioch *et al.* 2004; Schmidt, Fichelson, and Feller 2004).

#### 4. La voie RALGDS

La famille RALGDS comprend RALGDS (*Ral guanine nucleotide dissociation stimulator*), RGL2/RLF, RGL et RGL3. Ce sont des GEFs qui possèdent un domaine RA permettant leur liaison à RAS (Wolthuis and Bos 1999) et donc une interconnexion entre les signaux de différentes protéines G. La liaison à RAS n'induit pas de changement conformationnel de RALGDS mais permet sa translocation à la membrane et un rapprochement de ses effecteurs. RALGDS active les petites protéines G RAL A et RAL B via son domaine CDC25-REM. RAL A et B ont de nombreux effecteurs comme SEC5, FILAMIN, RALBP1 et ZONAB, leur permettant de réguler des processus tels que l'endocytose, l'exocytose, l'organisation de l'actine et la transcription via FOS, JUN ou encore AFX (Ferro and Trabalzini 2010). Elles contribuent, avec AKT, à inhiber les facteurs de transcription de la famille FOXO (pour *forkhead box O*), et à empêcher ainsi la mort cellulaire (via l'inhibition de la transcription de protéines pro-apoptotiques) et l'arrêt du cycle cellulaire. Plusieurs études ont montré le rôle oncogénique de la voie RALGDS dans un contexte d'activation de RAS (Hamad et al. 2002; González-García et al. 2005).

#### 5. Les autres effecteurs

D'autres effecteurs moins bien caractérisés sont décrits, et notamment PLC $\beta$  qui promeut la conversion du PI(4,5)P<sub>2</sub> en diacylglycérol (DAG) et inositol (1,4,5)-triphosphate (IP<sub>3</sub>), reliant RAS au calcium et à l'activité de PKC.

Les RAC sont également des effecteurs importants de RAS, activés soit directement par TIAM1 qui est une GEF de RAC1 (Lambert et al. 2002; Malliri et al. 2002), soit par l'intermédiaire de PI3K (H. C. E. Welch et al. 2002). RAC1 régule le remodelage du cytosquelette et la migration cellulaire et son rôle dans l'oncogenèse a été confirmé par la découverte de mutations somatiques dans certains cas de mélanomes (Krauthammer et al. 2012).

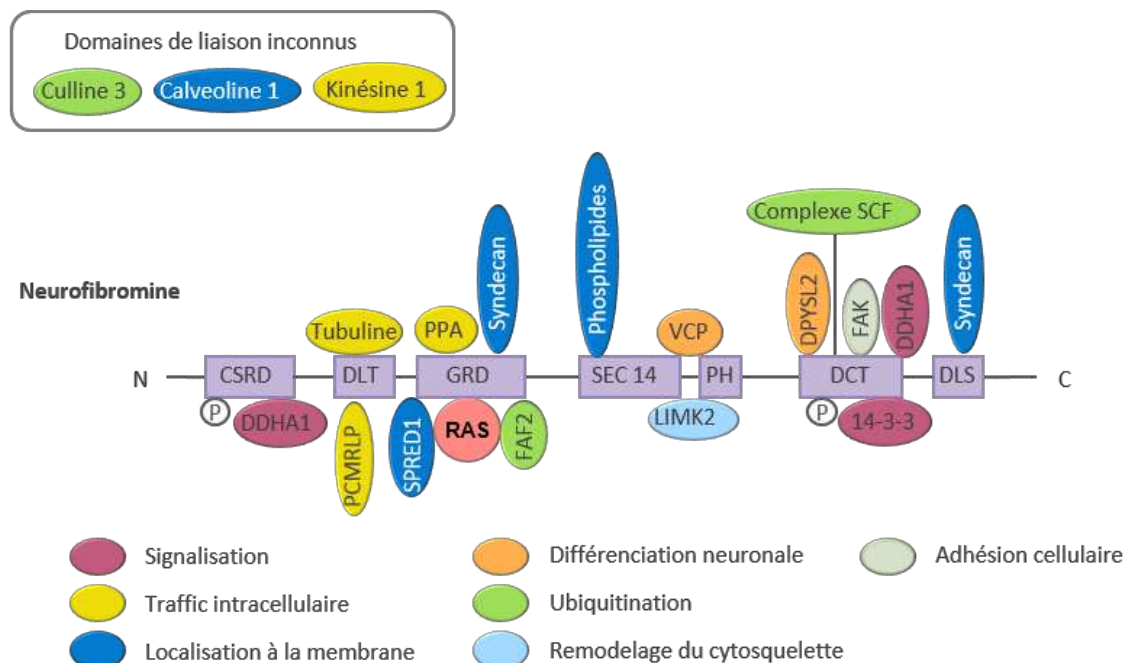
Les protéines C-RASSF et en particulier NORE1 (aussi connue sous le nom de RASSF5) et RASSF1, interagissent également avec RAS via leur domaine RA (Iwasa, Hossain, and Hata 2018). Les gènes RASSF sont considérés comme des suppresseurs de tumeurs et leur régulation négative est induite par différents phénomènes comme la méthylation de l'ADN, l'existence de miRNA ou la dégradation des protéines. Elles ont un rôle dans l'induction de l'apoptose mais interagissent également avec p53, la protéine de rétinoblastome (pRb) ou la voie de signalisation Hippo (Iwasa, Hossain, and Hata 2018).

## G. La neurofibromine

### 1. Structure et fonction

La neurofibromine (NF1) est une grande protéine de 2818 acides aminés codée par le gène *NF1* situé sur le chromosome 17 en 17q11.2. Son domaine le plus connu est le domaine GRD codé en parti par l'exon 23 qui est responsable de l'activité GAP de NF1 vis-à-vis de RAS. Par ailleurs, NF1 comporte des domaines CSRD (*cystein and serin rich domain*), PH, de liaison à la tubuline (DLT), de liaison à syndecan (DLS) et un domaine SEC14 (Ratner and Miller 2015) (Figure 14).

De nombreux partenaires de NF1 ont été décrits. NF1 se lie à la protéine LIMK2 (pour *LIM domain kinase 2*), ce qui empêche l'activation de cette dernière par Rho avec des implications sur l'organisation du cytosquelette. Certains domaines permettent de réguler la localisation cellulaire de NF1. Par exemple, SPRED1 permet la localisation de NF1 à la membrane de façon à inhiber RAS (Stowe et al. 2012). La protéine VCP (pour *valosine-containing protein*) est une chaperonne qui se lie au domaine riche en leucine de NF1, et dont l'expression permet d'atténuer le phénotype neurologique résultant de la perte de *NF1* (réexpression des épines dendritiques). La diméthylarginine diméthylminohydroxylase 1 (DDHA1) est également un partenaire de NF1, sa fonction est de dégrader la diméthylarginine asymétrique (ADMA) qui est un inhibiteur du monoxyde d'azote endogène.



**Figure 14 : Structure de la Neurofibromine et interactions protéiques connues selon (Ratner and Miller 2015)**

Parmi les protéines impliquées dans la signalisation on dénombre DDHA1, la protéine 14-3-3 et RAS ; parmi celles impliquées dans la différenciation neuronale on compte VCP, la dihydropyrimidase-related protein 2 (DPYSL2) ; les acteurs de liaisons à la membrane sont le syndecan, les phospholipides, la calvéoline 1 et SPRED1 ; les

protéines impliquées dans le trafic intracellulaire sont la tubuline, la kinésine 1, la protéine contenant un motif riche en leucines pentatricopeptide (PCMRLP), la protéine précurseur de l'amyloïd- $\beta$  (A4) (PPA) ; les protéines d'ubiquitination sont la culline 3, le complexe SCF (Skp, Cullin, F-box containing complex), FAS-associated factor 2 (FAF2) ; la protéine de remodelage du cytosquelette et LIMK2 et la protéine d'adhésion cellulaire est focal adhesion kinase (FAK).

Le rôle principal de NF1 est de réguler RAS, cependant son impact sur l'ensemble des effecteurs de RAS est pour l'instant incomplètement élucidé. La voie la plus étudiée en aval de RAS est la voie RAF/MAPK, qui est activée suite à l'inactivation de NF1 dans de nombreux cancers (G. Bollag et al. 1996). La voie RALGEF (Bodempudi et al. 2009), la voie mTORC1 (Brundage et al. 2014), la voie PI3K/AKT/mTORC1 (Johannessen et al. 2008; Dasgupta et al. 2005) sont également fortement régulées par NF1, comme démontré dans des modèles de cancers caractérisés par une inactivation de NF1. NF1 régule également le niveau de cAMP ce qui pourrait contribuer à la prolifération cellulaire dans un contexte tumoral (Warrington et al. 2010).

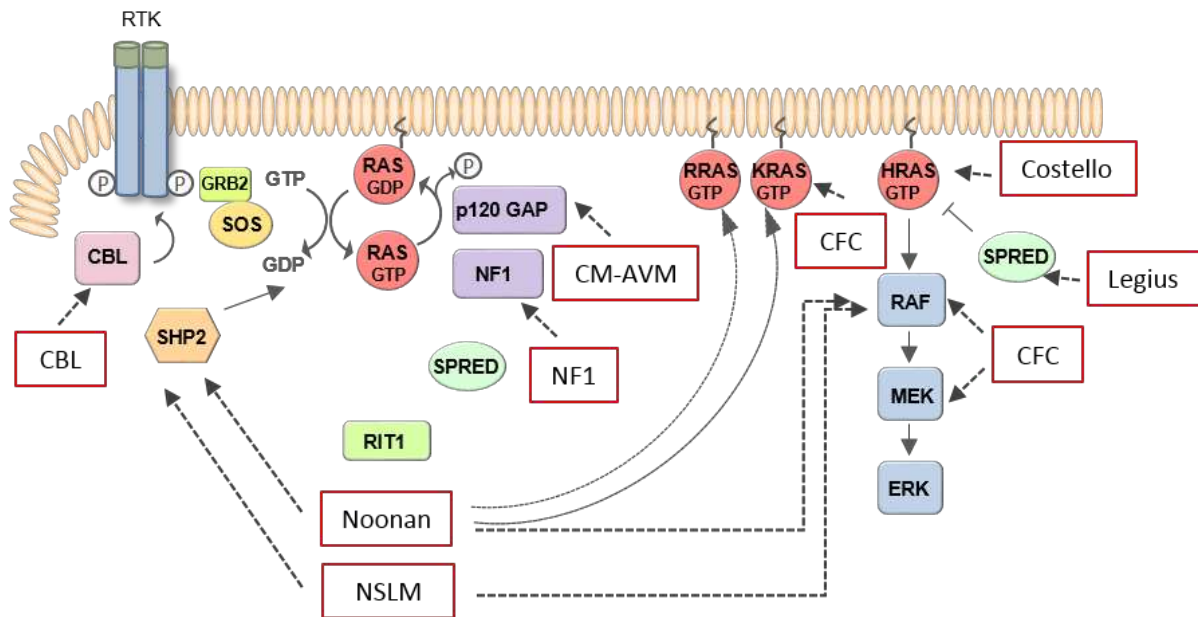
## 2. Régulation de la neurofibromine

NF1 peut être dégradée transitoirement par ubiquitination après activation de récepteurs à facteur de croissance (Hollstein and Cichowski 2013; McGillicuddy et al. 2009). NF1 possède également un domaine SEC14/PH de liaison aux lipides (lipides phosphoinositides) (D'Angelo et al. 2006) qui pourrait servir à sa régulation. Certains auteurs pensent que son activité pourrait être régulée par la composition lipidique de son environnement. NF1 peut être phosphorylée par PKA, et les protéines 14-3-3 peuvent ensuite moduler son activité (Feng et al. 2004). Par ailleurs chez les mammifères, le recrutement de NF1 à la membrane dépend de la protéine SPRED, bien que le signal contrôlant ce recrutement n'ait pas été identifié (Stowe et al. 2012). L'expression de la neurofibromine pourrait également être inhibée par méthylation du gène NF1 dans certains cancers (Rodenhiser et al. 1997; Gutmann et al. 2013). NF1 est aussi la cible de miRNA, et notamment, l'expression de miR-128 dans les neurones et de miR193b dans les carcinomes à cellules squameuses de la tête et du cou ont été décrits comme diminuant les niveaux de l'ARN messager de NF1 et la protéine (Birnbaum et al. 2000; Paschou and Doxakis 2012).

## H. La voie RAS en oncologie

### 1. Mutations germinales de la voie RAS et prédispositions aux cancers

On regroupe sous le nom de « RASopathies » un groupe de syndromes cliniques causés par une hyperactivation de la voie RAS/MAPK en raison de mutations germinales d'acteurs de la voie RAS (Figure 15).



**Figure 15 : Rasopathies selon (Ratner and Miller 2015)**

Noonan signifie syndrome de Noonan ; NF1, neurofibromatos de type 1 ; CM-AVM, syndrome malformations capillaires malformations artéio-veineuses ; CBL, syndrome CBL ; CFC, syndrome cardio-facial ; NSLM, syndrome de Noonan avec multiples lentigines ; Costello, syndrome de Costello ; Légius, syndrome de Légius.

### **La neurofibromatose de type 1**

L'un des plus communs est la neurofibromatose de type 1. Il s'agit d'un syndrome autosomique dominant décrit pour la première fois en 1793 par Tisellius puis en 1882 par Von Recklinghausen et résultant d'altérations du gène *NF1* (V. C. Williams et al. 2009). L'incidence est d'environ 1/3500 personnes. Plus de 1400 mutations ont été décrites, il s'agit de mutations perte de fonction (non-sens, faux-sens, décalage du cadre de lecture, des translocations et des mutations au niveau de sites d'épissage), la moitié des patients atteints possèdent des mutations non héritées. Il n'y a pas de corrélation génotype/phénotype et le phénotype peut être variable au sein d'une même famille. Les symptômes cliniques comprennent à des degrés divers des manifestations cutanées (taches café au lait, taches lenticulaires, neurofibromes cutanés) ; des neurofibromes plexiformes qui peuvent évoluer vers des sarcomes cutanés, des gliomes du nerf optique, une macrocéphalie, des troubles cognitifs, un autisme, des nodules de Lisch ou encore des phéochromocytomes (Hirbe and Gutmann 2014). Le principal déterminant de cette pathologie est bien l'activation de la voie RAS/MAPK, mais d'autres effecteurs régulés par NF1 pourraient intervenir comme les protéines MRAS, RRAS et RRAS2. Une récente étude a montré l'efficacité d'un inhibiteur de MEK (le Selumetinib) dans le traitement des neurofibromes plexiformes des patients atteints de neurofibromatose de type 1 (Dombi et al. 2016). *NF1* a été classé dans les gènes suppresseurs de tumeurs du fait de l'occurrence de cancers chez les

patients présentant des neurofibromatoses avec perte d'hétérozygotie : LMMJ, phéochromocytomes, rhabdomyosarcomes, tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST), xantogranulomes juvéniles, cancers du sein etc (Hirbe and Gutmann 2014). Il est en revanche étonnant de constater que les cancers survenant lors d'altérations somatiques de *NF1* ne sont pas plus fréquents chez les patients souffrant de neurofibromatose de type 1. La neurofibromine étant ubiquitaire, la raison pour laquelle certains tissus sont plus affectés par la perte de *NF1* et plus prédisposés aux cancers n'est pas connue, on pense cependant qu'elle aurait un rôle essentiel dans les tissus concernés.

### **Les autres RASopathies**

Chacune des autres RASopathies possède un phénotype propre (Tajan et al. 2018). Cependant, en raison de l'activation de la voie RAS/MAPK, certaines caractéristiques sont communes et chevauchantes : des anomalies cardio-faciales, des malformations cutanées, cardiaques, musculosquelettiques, oculaires et des déficits neurocognitifs ainsi qu'une prédisposition aux cancers. Le syndrome de Noonan affectant 1/1000 à 1/2500 naissances résulte principalement de mutations de *PTPN11* (50%), *SOS1* (10%), *CRAF* (5-10%), *KRAS* mais aussi *SOS2*, *HRAS*, *RRAS*, *NRAS*, *MRAS*, *RIT1*, *RASA2*, *BRAF*, *MEK1*, *MEK2*, *CBL*, *SHOC2*, etc. (Roberts Lancet 2013, Tartaglia Net Genet 2001). Certains patients possèdent 2 mutations associées. Le syndrome de Légius dont les caractéristiques sont celles de la neurofibromatose de type 1 atténuées, présente des mutations inactivatrices hétérozygotes de *SPRED1* (Stowe et al. 2012; Dunzendorfer-Matt et al. 2016). Le syndrome de Noonan avec multiples lentigines (NSML) anciennement appelé syndrome LEOPARD, provient de mutations spécifiques de *PTPN11* affectant le domaine PTP ou le domaine SH2 ou rarement de mutations de *CRAF* et *BRAF* (Aoki et al. 2016). Le syndrome de Costello est dû exclusivement à des affections de *HRAS* et principalement des mutations hétérozygotes au niveau du codon 12 et est associé à un risque de survenue de rhabdomyosarcomes et de neuroblastomes (Rauen 2007). Le syndrome cardio-facio-cutané (CFC), plus rare, résulte de mutations activatrices de *BRAF*, *KRAS*, *MEK1* ou *MEK2*. Ce dernier n'a jusqu'à présent pas été associé à un risque de cancer (Aoki et al. 2016). Le syndrome de malformations artérioveineuses malformations capillaires (CM-AVM) est causé par des mutations hétérozygotes inactivatrices de *RASA1* codant pour p120-GAP (Aoki et al. 2016; Tajan et al. 2018). Enfin, le syndrome CBL, décrit plus récemment, met en jeu CBL, une ubiquitine ligase E3 régulant négativement les cascades de signalisation transduites par les facteurs de croissance en provoquant la dégradation des récepteurs via son activité ubiquitine ligase. Les enfants atteints présentent des mutations hétérozygotes germinales inactivatrices de *CBL* (Niemeyer et al. 2010; Pérez et al. 2010). Ils sont prédisposés au développement d'une LMMJ, en particulier (mais pas uniquement) en cas de perte d'hétérozygotie (Strullu et al. 2013).

## 2. Implications de RAS dans l'oncogénèse

RAS est un des oncogènes les plus fréquemment mutés dans les cancers humains, 27% des tumeurs présentent des mutations dans l'un de ses trois gènes (Sondka et al. 2018). KRAS est l'isoforme la plus fréquemment mutée (85%) suivie de NRAS (11%) puis HRAS (4%) (Hobbs, Der, and Rossman 2016). Les mutations ponctuelles faux-sens gain de fonction, sont rencontrées dans des hot spots qui interfèrent avec les fonctions physiologiques et la régulation de RAS. Les 3 codons principalement touchés (98% des mutations) ont un rôle dans l'inactivation de RAS par les GAP : la substitution de la glycine sur les codons 12 et 13 provoque un encombrement stérique empêchant l'introduction du doigt d'arginine de la GAP dans le site GTPase tandis que la glutamine en position 61 joue un rôle essentiel dans le mécanisme d'hydrolyse du GTP et son remplacement empêche cette fonction (Scheffzek et al. 1997). Par conséquent, les niveaux cellulaires de RAS-GTP sont considérablement élevés ce qui provoque l'activation des voies de signalisation en aval de manière incontrôlée, alors même que le taux d'échange du GDP médié par les GEFs est augmenté (M. J. Smith, Neel, and Ikura 2013). D'autres mutations existent, comme les mutants A146 qui permettent une dissociation rapide du GDP et donc une accumulation de la forme RAS liée au GTP.

L'isoforme mutée de RAS varie en fonction des différents types de cancer (Tableau 4). Par exemple KRAS est muté dans 97% des adénocarcinomes canaux du pancréas mais aussi principalement dans les cancers du poumon non à petites cellules ainsi que dans les adénocarcinomes coliques, tandis qu'HRAS est principalement muté dans les carcinomes épithéliaux et les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou et que les hémopathies et les mélanomes présentent le plus fréquemment des mutations de NRAS. Ceci suggérerait un rôle oncogénique des différentes isoformes spécifique du tissu ou du type cellulaire. Cependant, la question reste ouverte. Par exemple, To *et al.* ont montré dans un modèle murin de cancer du poumon induit par carcinogènes dans lequel *Hras* était exprimé à un niveau endogène en aval du promoteur de *Kras4b*, que la mutation *Hras*<sup>Q61L</sup> avait un impact oncogénique équivalent à la mutation *Kras*<sup>Q61L</sup> (To et al. 2008). A l'inverse, Haigis *et al.* ont montré que *Kras*<sup>G12D</sup>, et pas *Nras*<sup>G12D</sup>, était capable d'induire un cancer du côlon chez des souris invalidées pour le gène *APC* (Haigis et al. 2008).

Il existe également une variabilité dans la position et le type de substitution (Hobbs, Der, and Rossman 2016). Par exemple, dans les adénocarcinomes canaux du pancréas, la mutation de KRAS survient dans 90% des cas en G12, alors que dans les mélanomes les mutations de NRAS surviennent majoritairement en Q61. Dans un modèle murin, la mutation *Kras*<sup>Q61L</sup> était capable d'induire des mélanomes contrairement à la mutation *Nras*<sup>G12D</sup>. Selon les auteurs de ce travail, cela serait dû à l'abondance de la protéine mutée liée au GTP et non à des propriétés différentes des deux protéines possédant les deux mutations (Burd et al. 2014). On sait cependant, que les mutations du codon Q61



auraient un plus grand effet sur la fonction GTPase intrinsèque lors de la liaison à RAF entraînant une plus intense activation de la voie RAF/MAPK. Cela pourrait expliquer la fréquence plus importante de ces mutations dans les mélanomes que l'on sait dépendants de cette voie et qui possèdent majoritairement des mutations de *BRAF*.

Li, Balmain et Counter, suggèrent dans une revue récente que les mutations de *RAS* seraient sélectionnées afin d'obtenir un niveau de signalisation optimal, dépendant de l'isoforme de *RAS*, de son expression cellulaire, du type de mutation et de ses conséquences fonctionnelles, pour obtenir un niveau d'équilibre idéal à l'initiation et à la croissance tumorale, entre prolifération et sénescence (S. Li, Balmain, and Counter 2018). Entre autres arguments, on peut citer le fait que *KRAS* est un gène composé de codons rares ce qui jouerait sur son niveau d'expression (plus bas que pour les autres isoformes) lui procurant un pouvoir oncogénique plus fort car prévenant la cellule de la sénescence. Voilà pourquoi *KRAS* serait muté plus fréquemment. *NRAS* serait par exemple muté dans des cellules qui nécessiteraient un plus grand niveau de prolifération.

Type de cancer	% <i>RAS</i>	% <i>HRAS</i>	% <i>KRAS</i>	% <i>NRAS</i>
<b>Adénocarcinome du pancréas</b>	97,7	0	97,7	0
<b>Adénocarcinome colorectal</b>	52,2	0	44,7	7,5
<b>Myélome multiple</b>	42,6	0	22,8	19,9
<b>Adénocarcinome pulmonaire</b>	32,2	0,3	30,9	0,9
<b>Mélanome</b>	29,1	1	0,8	27,6
<b>Carcinome corps de l'endomètre</b>	24,6	0,4	21,4	3,6
<b>Carcinome de la thyroïde</b>	12,5	3,5	1	8,5
<b>Adénocarcinome gastrique</b>	12	0	11,4	0,9
<b>LAM</b>	11,4	1,6	3,1	6,7
<b>Cancer de la vessie</b>	10,6	5,9	3,1	1,4
<b>Cancer du cou et de la tête</b>	5,5	4,7	0,5	0,3

**Tableau 4 : Fréquence des mutations de *RAS* et des différents isoformes parmi les cancers les plus fréquemment mutés selon (Cox et al. 2014)**

%*RAS* : pourcentage total des différentes mutations des isoformes de *RAS*, % *HRAS*/*KRAS*/*NRAS* : pourcentage total de mutations de chaque isoforme de *RAS*.

Dans différents types de cancer, de nombreux arguments suggèrent que les mutations de *RAS* seraient des événements précoces dans l'oncogenèse. En effet, des mutations de *KRAS* et *NRAS* ont été observées dans des lésions pré-cancéreuses du pancréas, du poumon et de la peau chez l'homme (Miller and Mihm 2006; Wistuba and Gazdar 2006; Löhr et al. 2005). De plus, l'introduction de mutations oncogéniques de *Kras*, *Nras* et *Hras* peut induire des états pré-tumoraux ou des lésions de bas grades dans de nombreux tissus qui peuvent progresser vers des tumeurs agressives, avec ou sans apparition de néo-mutations. On peut citer les adénocarcinomes coliques (Sansom et al. 2006) et les adénocarcinomes de l'endomètre (Dinulescu et al. 2005). Les mutations de *RAS* sont donc fréquemment associées à des mutations d'autres gènes et notamment des suppresseurs de tumeurs

comme par exemple *TP53* (Hingorani et al. 2005). Cependant, malgré son apparition précoce, de nombreux modèles *in vitro* et *in vivo* ont démontré que l'expression continue de RAS muté était nécessaire à la maintenance tumorale (Brummelkamp, Bernards, and Agami 2002; Chin et al. 1999). Dans d'autres modèles comme les LAM, elles pourraient survenir plus tardivement.

Le pouvoir oncogénique des mutations de *RAS* est bien démontré et passe par l'activation des différentes voies de signalisation. En dehors de la très étudiée voie RAF/MAPK, on peut aussi noter l'implication des voies PI3K/AKT, RALGDS, TIAM1, PLC $\epsilon$  (Khosravi-Far et al. 1996). En fonction du tissu, de l'isoforme mutée, du type de mutation, certaines de ces voies peuvent à elles-seules initier la transformation oncogénique ou participer à son maintien, mais la plupart du temps, elles coopèrent entre elles (Yuan et al. 2018).

L'importance de la voie PI3K dans l'oncogenèse médiée par RAS a été montrée dans des modèles murins présentant une protéine p110 $\alpha$  mutée sur son RBD mais conservant son activité kinase. On a observé chez les souris croisées avec des souris *Kras* LA2 (un modèle de souris possédant un allèle de *Kras*<sup>G12D</sup> ne s'exprimant qu'après un événement de recombinaison spontanée et induisant l'apparition d'adénomes et d'adénocarcinomes pulmonaires) une réduction de formation de cancer du poumon de 95% (Johnson et al. 2001; Gupta et al. 2007). De façon similaire, avec ces mêmes souris p110 $\alpha$  mutantes, dans un modèle de carcinogenèse cutanée qui consiste en l'utilisation du mutagène 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) provoquant des mutations dans le gène murin *Hras*, il a pu être observé une réduction quasi complète des tumeurs formées (Gupta et al. 2007). De même, l'inactivation de *Pik3r1* et *Pik3r2* qui codent 2 isoformes de la sous-unité régulatrice p85 des PI3K de classe 1A (dans un modèle de souris *Pik3r2* -/- avec un allèle *Pik3r1* floxé inducible) abroge les cancers du poumon induits par la mutation *Kras*<sup>G12D</sup> (Engelman et al. 2008). Cependant, l'inhibition de la voie PI3K seule ne permet pas la régression complète des tumeurs induites par les mutations de *RAS*, d'autres signaux sont donc requis en parallèle pour le maintien de la tumeur (Engelman et al. 2008). Des mutations de *PI3K* coexistent avec les mutations de *RAS* dans les cancers du côlon, du poumon et de l'endomètre, ce qui indique qu'en renforçant la signalisation PI3K-AKT, elles participent à la transformation oncogénique (L. Wang et al. 2014). La voie PI3K joue un rôle important dans la survie des cellules tumorales mais aussi dans la régulation du cycle cellulaire (Luo, Manning, and Cantley 2003), les mécanismes d'invasion tumorale, l'évitement de l'anoikis (mort cellulaire après privation en matrice extracellulaire) et l'échec de l'immuno-surveillance anti-tumorale (Krygowska and Castellano 2018).

RALGDS semble également tenir un rôle important dans l'oncogenèse induite par l'activation de la voie RAS (Kashatus 2013). Hamad *et al.* ont montré qu'un mutant de RAS ne pouvant se lier qu'à RALGEF était suffisant pour induire la transformation de cellules humaines (Hamad et al. 2002), et une forme

de RALGEF constitutivement active est également suffisante pour induire des métastases et promouvoir l'invasion (Ward et al. 2001). Gonzalez-Garcia *et al.* ont confirmé la dépendance des tumeurs induites par RAS à la signalisation RALGDS dans un modèle de carcinogenèse médiée par le carcinogène topique DMBA dans des souris KO RALGDS (González-García et al. 2005). La suppression de RALGDS entraînait une apparition retardée et une incidence réduite des papillomes qui ne progressaient pas vers des métastases. L'étude des tumeurs a montré une prolifération cellulaire identique et un taux d'apoptose plus élevé dans les papillomes des souris KO pour RALGDS en comparaison aux sauvages, suggérant un rôle de Ralgds dans la régulation de l'apoptose. De plus, des mutations des RALGEFs existent dans les cancers humains, ce qui constitue une preuve supplémentaire de leur implication dans l'oncogenèse.

La voie TIAM-RAC1-PAK est également impliquée dans le développement et la maintenance des tumeurs médiées par RAS. PAK1 est nécessaire à l'activation de la voie RAF-MAPK et PI3K en aval de RAS, en phosphorylant CRAF et MEK et en servant d'échafaudage à AKT et PDK1 respectivement. Dans un modèle murin de cancer cutané médié par *Kras* oncogénique, la délétion de *Pak1* entraînait une réduction de la tumorigenèse et de la progression tumorale (Chow et al. 2012) comme cela avait été montré dans d'autres modèles *in vitro* (Tang et al. 1997).

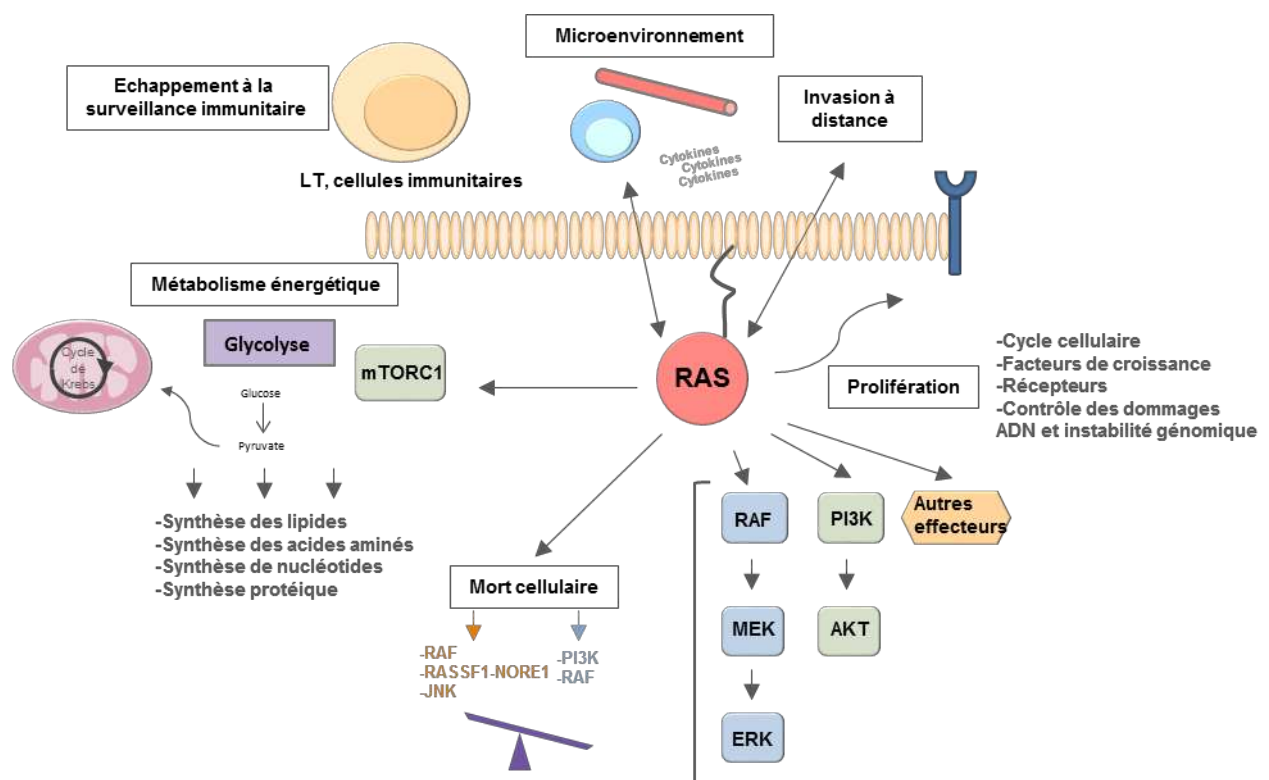


Figure 16 : Conséquences des mutations de RAS, activation et régulation de nombreux mécanismes caractéristiques du cancer

RAS oncogénique est impliquée dans d'importantes voies oncogéniques : 1) une intense prolifération induite par l'activation des voies de signalisation RAF/MAPK, PI3K/AKT et autres régulant le cycle cellulaire et la transcription de gènes essentiels à la prolifération ; 2) régulation de la mort cellulaire grâce à l'inhibition de protéines pro-apoptotique et l'activation de protéines anti-apoptotiques en aval de plusieurs effecteurs de RAS ; 3) perturbation du métabolisme énergétique avec reprogrammation des grandes voies comme la glycolyse anaérobie, la phosphorylation oxydative et le cycle de Krebs ; 4) échappement à l'immunosurveillance en dérégulant des molécules nécessaires à l'activation des cellules immunitaires ou en surexprimant des molécules participant à l'anergie du système immunitaire ; 5) action sur le microenvironnement avec notamment l'activation de l'angiogenèse et l'interaction avec les cellules du système immunitaire ; 6) l'invasion à distance et l'activation des mécanismes favorisant l'émergence des métastases.

L'activation oncogénique de RAS à elle-seule, dépeint les nombreuses caractéristiques du cancer telles que décrites par Hanahan et Weinberg (D. Hanahan and Weinberg 2000; Douglas Hanahan and Weinberg 2011). Pylayeva-Gupta *et al* ont listé ces caractéristiques (Pylayeva-Gupta, Grabocka, and Bar-Sagi 2011) (Figure 16).

- La première des caractéristiques est la prolifération. Il a été montré très tôt que *RAS* entraînait une prolifération accrue indépendante des facteurs de croissance et avait la capacité de transformer des fibroblastes (Stacey and Kung 1984). Ces capacités de prolifération semblent essentiellement dépendre de la voie RAF/MAPK (Drosten et al. 2010). En dehors de l'activation des voies de signalisation de nombreux mécanismes peuvent expliquer cette prolifération accrue : la transcription de facteurs de croissance (McCarthy et al. 1995) et la régulation des récepteurs aux facteurs de croissance, la stimulation des intégrines favorisant la croissance (Woods et al. 2001), l'inhibition de la voie du TGF $\beta$  (Massagué 2000), l'activation de facteurs de croissance en aval des voies PI3K, RAF et RALGDS entraînant la transcription de gènes favorisant le cycle cellulaire comme la cycline D1 (Gille and Downward 1999). La cycline D1 est un acteur essentiel de la transformation oncogénique médiée par RAS, car son invalidation empêche le développement de tumeurs mammaires induite par *RAS* (Q. Yu, Geng, and Sicinski 2001). Les mutations oncogéniques entraînent également l'inhibition des inhibiteurs de kinases dépendantes des cyclines (CKI) comme p27 et p21 favorisant aussi le cycle cellulaire (Sa and Stacey 2004). Cette activation permanente de la croissance cellulaire entraîne un stress répliatif, qui, en fonction des capacités des cellules à activer les voies de réparation des dommages à l'ADN (certains acteurs de la voie sont inactivés en situation oncogénique), peut conduire à la sénescence ou favoriser l'instabilité génomique.
- La deuxième grande caractéristique de la stimulation oncogénique médiée par les mutations de RAS est la résistance à l'apoptose (Cox and Der 2003; Balmano and Cook 2009). Cette dernière est médiée par différents effecteurs de RAS. La voie PI3K-AKT entraîne l'inhibition de protéines pro-apoptotiques comme BAK-1 et la phosphorylation de BAD par AKT. Par ailleurs, elle augmente l'expression des IAP (IAP pour *inhibitor of apoptosis protein*) par l'activation de

NFκB. RAF augmente les protéines anti-apoptotiques BCL-2 et ARC et diminue la protéine pro-apoptotique PAR4. L'activation de ERK en aval des mutations de RAS entraîne la phosphorylation puis dégradation de BAD et BIM (Sheridan, Brumatti, and Martin 2008). Par ailleurs, RAS induit l'inactivation épigénétique de CD95. La voie NORE1 RASSF1 favorisant l'apoptose est souvent régulée négativement dans les cancers. Dans un modèle murin de mélanome induit par *Hras*<sup>G12V</sup> inductible à la doxycycline, une régression tumorale et une apoptose massive est retrouvée en l'absence d'expression de la mutation montrant l'importance de la régulation de l'apoptose induite par *Hras*<sup>G12V</sup> (Chin et al. 1999).

- RAS joue également un rôle important dans le métabolisme énergétique (Kimmelman 2015). Cependant, de la même manière que dans d'autres processus, ses actions diffèrent en fonction du type cellulaire, de l'isoforme mutée et du type de mutation (Dard et al. 2018). RAS participerait dans de nombreux modèles au shift métabolique vers la glycolyse tel que décrit par Warburg, qui bien que moins efficiente dans la génération d'ATP, permet à la cellule de produire tous les précurseurs nécessaires à la réplication des composants de la cellule dans une optique de croissance et ainsi de privilégier les voies anaboliques. Ceci passerait par la traduction de HIF1α après activation de mTORC1 en aval de RAS et PI3K et sa stabilisation par ERK et AKT (Kikuchi et al. 2009; Lim et al. 2004; Blum et al. 2005). En effet, tandis que la voie des MAPK serait responsable de la phosphorylation du domaine de transactivation d'HIF1α, GSK3 en aval d'AKT phosphorylerait HIF1α sur son domaine de dégradation pour le stabiliser (Sodhi et al. 2001). HIF1α induit la transcription du transporteur du glucose GLUT1 et des enzymes glycolytiques clés : hexokinases, phosphofructokinase et lactate deshydrogénase (Chiaradonna et al. 2006; C. Chen et al. 2001). HIF1α induit aussi l'expression de la pyruvate kinase deshydrogenase 1 (PDK1) réduisant l'entrée du pyruvate dans le cycle de Krebs et favorisant la fermentation lactique (Papandreou et al. 2006). Ce shift vers la glycolyse a été particulièrement souligné dans des modèles de cancer colorectal (Yun et al. 2009), de mélanomes mutés *BRAF* (Haq et al. 2013), de fibroblastes murins transformés par *HRAS*<sup>Q61L</sup> (Dianer Yang et al. 2010), de cancer du pancréas possédant des mutations de *KRAS* (Ying et al. 2012) entraînant en particulier une activation de la voie non oxydative des pentoses phosphates et de la biosynthèse de l'hexosamine, ou dans un modèle de cancer du sein médié par une mutation de *HRAS* (W. Zheng et al. 2015). RAS est donc impliqué dans une reprogrammation anabolique. Les voies PI3K et mTORC1 qui sont en aval de RAS induisent également l'activation de nombreuses voies métaboliques comme la biosynthèse des lipides, la glycolyse ou la voie des pentoses phosphates. D'un autre côté, d'autres modèles ont souligné l'importance de RAS dans la stimulation de la phosphorylation oxydative. On peut

citer, des cellules épithéliales bronchiques immortalisées mutées *HRAS*<sup>G12V</sup> (Telang et al. 2007), des fibroblastes embryonnaires murins (MEFs) exprimant *HRAS*<sup>V12/E1A</sup> (au moins initialement) (de Groof et al. 2009) ou des lignées de cancer colorectal dans lesquelles la phosphorylation oxydative semble indispensable, de même que la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Weinberg et al. 2010). La voie RAS-MAPK jouerait à ce titre, un rôle important dans la biogenèse mitochondriale. En effet, Fisher *et al.* ont montré une régulation de PGC1 $\alpha$  (pour *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 $\alpha$* ) par la protéine d'échafaudage KSR1 dans un modèle de mutation de *HRAS*<sup>G12V</sup> et ce dernier favorise la biogenèse mitochondriale et la phosphorylation oxydative (Fisher et al. 2011). Dans les mélanomes avec notamment des mutations de *BRAF* ou *NRAS*, PGC1 $\alpha$  est aussi responsable d'une augmentation de la biogenèse mitochondriale et de la phosphorylation oxydative (Gopal et al. 2014). Il a aussi été montré dans les cancers du pancréas induits par *KRAS*<sup>G12D</sup> que la voie de la glutamine empruntait un chemin non canonique avec la transformation du glutamate par des transaminases afin d'augmenter la production de NADPH et maintenir le statut redox de la cellule (Son et al. 2013). Par ailleurs, RAS stimule l'autophagie qui favorise la croissance tumorale (Guo and White 2013; M.-J. Kim et al. 2011) grâce au recyclage de protéines et d'organelles dont les produits de dégradation pourront être réutilisés pour différentes voies bioénergétiques. Ainsi, Lee *et al.* ont démontré lors d'un crible siRNA que les cellules mutées *KRAS* sont dépendantes d'une voie « non oncogénique » qu'est l'autophagie et qu'en ciblant simultanément RAF et cette voie, on aboutit à la mort des cellules tumorales (C.-S. Lee et al. 2019). La macropinocytose décrite dans les années 1980 (Bar-Sagi Science 1986), est également un moyen pour les cancers *RAS* médiés de se fournir en nutriments essentiels à la croissance cellulaire et d'alimenter le cycle de Krebs (Commisso et al. 2013).

- RAS, dans un contexte oncogénique, agit également sur le microenvironnement en favorisant notamment l'angiogenèse via la transcription de *VEGFA* via HIF1 $\alpha$  ou COX2 (P. J. Ross et al. 2001). RAS oncogénique est également connue pour stimuler la transcription de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL8, l'IL6 ou CXCL1, qui recrutent des cellules immunitaires, elles-mêmes stimulant l'angiogenèse. RAS inhibe des régulateurs négatifs de la néo-vascularisation, augmente la viabilité des cellules endothéliales et stimule la transcription de métalloprotéases qui participent au remodelage de la matrice extracellulaire.
- La protéine RAS oncogénique participe également à l'échappement à la surveillance immunitaire anti-tumorale. Elle réduit l'expression de surface des molécules de présentation de l'antigène du complexe majeur d'histocompatibilité (Seliger et al. 1998). Il existe aussi une réduction du nombre de lymphocytes infiltrant la tumeur (Loi et al. 2016). La réponse anti-tumorale est également modifiée, avec une anergie des lymphocytes T, un recrutement de

lymphocytes T régulateurs et de cellules myéloïdes suppressives (Clark et al. 2007; Tran Thang et al. 2010) et la voie PI3K semble jouer un rôle important dans ce processus (Gyori et al. 2017). De plus, la signalisation oncogénique RAS est responsable d'une surexpression de PD-L1 grâce à une stabilisation de son ARNm (Coelho et al. 2017).

- RAS promeut également l'invasion tumorale et la propagation de métastases. Pour ce faire, plusieurs étapes sont nécessaires : la dissociation des cellules tumorales de la tumeur primitive, l'invasion de la matrice extracellulaire, l'angiogenèse, l'intravasation dans les systèmes vasculaire ou lymphatique, puis l'extravasation et la prolifération à distance. Ceci est réalisé par la perturbation des contacts cellules-cellules, par une diminution de l'attachement à la matrice extracellulaire grâce à l'inhibition des intégrines, par un remodelage du cytosquelette et par une dégradation de la matrice extracellulaire. Les voies MAPK, PI3K, RALGDS et RHO sont mises en jeu pour réguler ces mécanismes et permettre ce processus d'invasion tumoral. On peut noter par exemple, que les protéines RHO/RAC sont activées par PI3K en aval de RAS et permettent la réorganisation du cytosquelette et de la membrane (P. Rodriguez-Viciana et al. 1994; Haga and Ridley 2016) et l'inhibition de Reelin par PI3K participe à la migration de la cellule tumorale (Castellano et al. 2016). La voie PI3K/AKT entraîne aussi la production de métalloprotéinases (D. Kim et al. 2001; Park, Zeng, and Glazer 2001), et cela a également été décrit via la liaison entre p110 $\alpha$  et SHOC2 (Kaduwal et al. 2015).

### 3. Autres mutations de la voie RAS en oncologie

De nombreux autres gènes de la voie de signalisation sont également mutés dans les cancers humains. *BRAF* est muté dans 20% des cancers humains et *PIK3CA* dans 12% selon la base de données COSMIC. Les mutations de *BRAF* sont fréquentes dans les mélanomes, les cancers papillaires de la thyroïde et les cancers colorectaux et peuvent être regroupées en 3 classes (Yaeger and Corcoran 2019). La première classe ne contient que la mutation ponctuelle *BRAF*<sup>V600E</sup> qui est la plus fréquente. Elle induit l'expression d'un monomère de BRAF constitutivement actif indépendamment de RAS et conduisant à l'activation et à la phosphorylation de ERK. La classe II comprend des mutations entraînant une dimérisation de BRAF indépendante de RAS et activant MEK et ERK. Enfin, les mutations de classe III sont amplificatrices et nécessitent la dimérisation avec BRAF WT et une activation de RAS par un RTK. Il existe aussi des fusions et des délétions courtes de *BRAF* et les mutations de *CRAF* et *ARAF* sont beaucoup plus rares. De manière analogue à *RAF*, les mutations de MEK existant en cancérologie humaine, beaucoup plus rares, peuvent être dépendantes ou non du signal d'amont (Yaeger and Corcoran 2019). L'inactivation de certaines GAP par mutations ou délétion miment l'action des mutations ponctuelles de *RAS* qui le rendent insensible à l'action de la GAP. Bien qu'il existe de nombreuses GAPs, la neurofibromine semble avoir une action essentielle à la régulation de RAS dans

de nombreux tissus. Des mutations inactivatrices mais aussi, des inactivations transcriptionnelles et des réarrangements conduisant à des délétions cryptiques ou larges sont donc fréquentes en oncologie humaine (Y. Li et al. 1992; Boudry-Labis et al. 2013; Side et al. 1997). On retrouve des délétions et des mutations ponctuelles dans les glioblastomes (18% dans le TCGA), les adénocarcinomes du poumon (11%), les mélanomes, les mélanomes desmoplastiques (>50%) (Shain et al. 2015), les myxofibrosarcomes et liposarcomes pléomorphes (Barretina et al. 2010) ou les leucémies aiguës myéloïdes (7-10%). SPRED1 qui est un partenaire important de la neurofibromine peut également être muté dans les adénocarcinomes du poumon, les mélanomes ou d'autres cancers. Des mutations de p120GAP ou RASA2 sont également présentes dans des cancers humains. Par ailleurs, SHP2 est la première phosphatase à avoir été reconnue comme étant un oncogène (R. J. Chan and Feng 2007). Les mutations de *PTPN11* sont activatrices et ont été reconnues comme responsables de la formation d'un oncogène dans 41 types de cancers (M. T. Chang et al. 2016). Elles entraînent notamment une activation de la voie des RAF/MAPK. Chang *et al.* ont retrouvé 4 mutations principales dans 119 tumeurs : Q510, A72, E76 et G503. Cependant, de nombreuses autres mutations ont été décrites, on peut également noter qu'elles sont, dans la majorité des cas, différentes des mutations germinales et possèdent une activité phosphatase plus intense. Elles sont généralement retrouvées au niveau du domaine N-SH2 (qui régule le domaine catalytique) (A72, E76) ou au niveau du domaine catalytique lui-même (Q510, G503). Les mutations de *PTPN11* sont fréquentes dans les LMMJ, les SMD, les LAM et peuvent également survenir dans les cancers solides comme les neuroblastomes, les adénocarcinomes pulmonaires (Grossmann et al. 2010). Il a également été montré un rôle des mutations de *PTPN11* survenant dans les cellules souches mésenchymateuses dans les mécanismes de leucémogénèse (Dong et al. 2016).

### **I. Cibler la voie RAS**

Depuis 50 ans, des chercheurs du monde entier cherchent un moyen pharmacologique d'inhiber RAS qui, aux vues de la large distribution des mutations de *RAS* dans les cancers humains, pourrait apporter un bénéfice immense à la recherche contre le cancer (Ryan and Corcoran 2018; Cox et al. 2014; Stephen et al. 2014). RAS est toujours considéré comme impossible à cibler directement en raison notamment, de l'absence de site de liaison potentiel à une drogue (mise à part le site de liaison nucléotidique) et de son affinité de l'ordre du picomolaire pour le GTP. Cependant, de nombreuses avancées ont été faites ces dernières années par plusieurs équipes, et on peut noter la création de la *National Cancer Institute RAS initiative* en 2013, porteuse du projet de trouver la solution à ce problème (Ledford 2015). Il existe plusieurs axes de recherche pour cibler RAS schématisés sur la Figure 17:



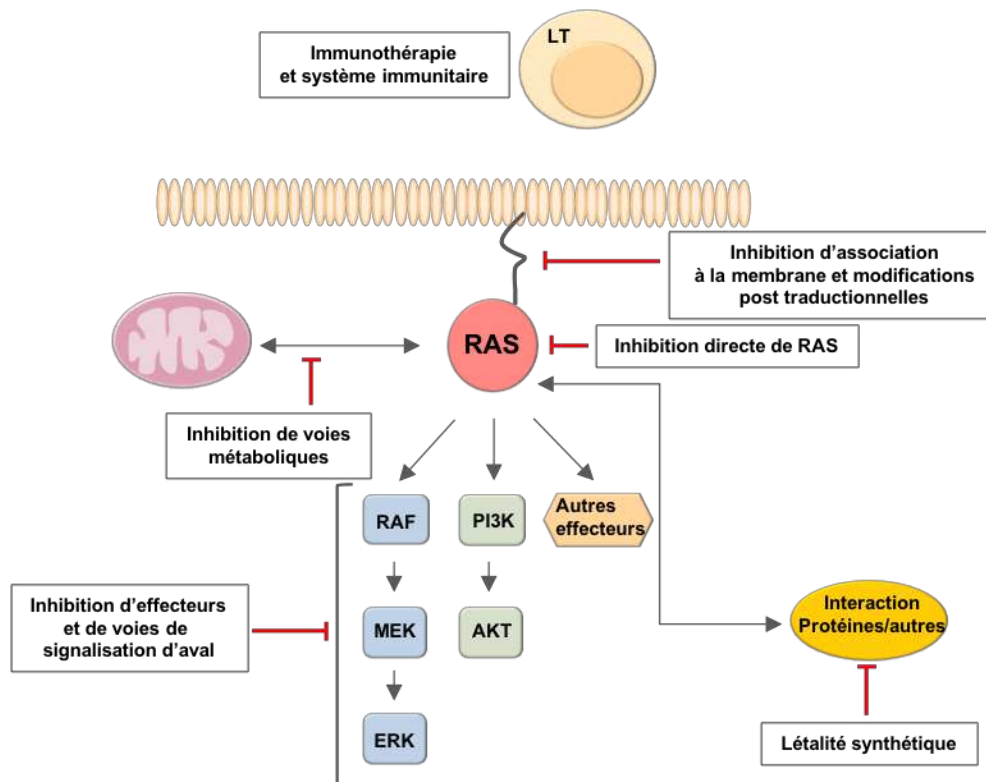


Figure 17 : Cibles thérapeutiques pour inhiber la voie RAS dans les cancers humains selon (Ryan and Corcoran 2018)

### 1. Cibler les modifications post traductionnelles

Les inhibiteurs de farnésyltransférase (FTI) ont fait partie des premiers traitements à être développés. En effet, RAS doit obligatoirement subir les modifications post traductionnelles permettant son ancrage à la membrane plasmique pour être actif. Deux de ces inhibiteurs, le tipifarnib et le lonafarnib ont été testés dans de nombreux cancers (cancer du pancréas, cancer du poumon non à petites cellules, cancer colo-rectal et LAM), y compris dans des phases III. Cependant, les résultats sont décevants, en particulier dans les cancers médiés par KRAS et NRAS (Berndt, Hamilton, and Sebti 2011). Dans les LAM les taux de réponses globaux chez des patients non traités sont de l'ordre de 20% (Erba et al. 2014). Ceci a pu être expliqué par le fait que NRAS et KRAS pouvaient être géranylgeranylés en l'absence de farnésylation, contrairement à HRAS qui était l'isoforme la plus étudiée et qui avait été largement utilisée dans les tests précliniques (Whyte et al. 1997) . Ces inhibiteurs restent néanmoins des options prometteuses dans les cancers médiés par *HRAS* oncogénique. Parallèlement, d'autres stratégies ont été développées comme les inhibiteurs doubles de farnésyl et géranylgeranyl transférases, ou de RCE1 et ICMT (M. Liu et al. 2010; Winter-Vann and Casey 2005). Cependant RCE1 et ICMT semblent posséder des rôles cruciaux dans la physiologie normale de nombreuses protéines et leurs inhibiteurs seraient de fait, trop toxiques. De plus, des modèles murins déficients pour *Rce1*

ou *lcmt* ont montré une progression de la croissance tumorale plutôt qu'une inhibition (Wahlstrom et al. 2007). La palmitoylation est un processus qui peut être également ciblé, et Xu *et al.* ont montré que des inhibiteurs de palmitoylase pouvaient représenter une stratégie efficace dans les LAM avec mutations de *NRAS* (J. Xu et al. 2012). Les inhibiteurs de la PDE $\delta$  qui est impliquée dans la translocation de RAS du Golgi à la membrane, semblent prometteurs (G. Zimmermann et al. 2013). D'autres événements post traductionnels tels que la mono ubiquitination de K147 de KRAS, l'acétylation de K104 de KRAS ou la nitrosylation de la C118 de HRAS font également l'objet de recherche (Stephen et al. 2014).

## 2. Cibler directement RAS

Comme expliqué précédemment, cibler directement RAS est techniquement compliqué et semble peu envisageable au vu des rôles physiologiques essentiels de RAS. Pour tenter de reproduire le succès des inhibiteurs compétitifs de l'ATP, il a été initialement tenté de produire des inhibiteurs compétitifs du GTP. Cependant, alors que l'ATP se lie aux protéines kinases avec une affinité de l'ordre du micromolaire, RAS se lie au GTP avec une affinité de l'ordre du picomolaire. De nombreux inhibiteurs avaient été sélectionnés, comme le SCH-53239 (compétiteur du GTP), le SCH-54292 (composé se liant à la région switch 2), les analogues du sulindac, de petites molécules inhibant la liaison à RAS (MCP1), des inhibiteurs de GEF comme le peptide HBS3 ou le DCAI, ou des inhibiteurs de la liaison à CRAF mais aucun n'a pu fournir de résultat suffisant pour poursuivre son développement (Cox et al. 2014). Dans ce contexte, et plus récemment, il a été développé des thérapies ciblées sur les mutants de RAS et la protéine KRAS-G12C est la cible la plus prometteuse. Elle est présente dans 44% des adénocarcinomes pulmonaires mutés *KRAS*, 11% des cancers colorectaux mutés *KRAS* et 3% des cancers du pancréas. KRAS-G12C, contrairement aux autres mutants de KRAS a la propriété de toujours cycler entre la forme inactive liée au GDP et active liée au GTP. Le groupement thiol de la cystéine en fait une cible intéressante pour des inhibiteurs covalents et il a récemment été trouvé une poche allostérique en dessous de sa région switch 2 (Ostrem et al. 2013). Ainsi des inhibiteurs ont été développés piégeant la protéine dans sa forme inactive et empêchant la transduction du signal en aval (Lito et al. 2016; Patricelli et al. 2016). Dernièrement l'ARS-1620 a prouvé son efficacité *in vitro* et dans des modèles de xénogreffe *in vivo* (Janes et al. 2018). Afin de ne pas restreindre les traitements à une seule mutation, des inhibiteurs pan RAS ont été développés comme RAS-IN-3144 (Welsch et al. 2017), ou des oligonucléotides anti-sens comme l'AZD4785 qui fait l'objet d'un essai de phase I dans des cancers pulmonaires possédant des mutations de *KRAS* (S. J. Ross et al. 2017). Le rigosertib semblait également efficace dans les cancers médiés par RAS (Athuluri-Divakar et al. 2016) mais son action passerait surtout par la déstabilisation des microtubules (Jost et al. 2017) et non par une interaction spécifique avec le RBD. Des inhibiteurs directs de la région switch-2 sont également en développement (Gentile

et al. 2017). De manière analogue à RAF, il existe de plus en plus de preuves que la dimérisation de RAS serait importante pour la transduction du signal (Santos 2014), des inhibiteurs voient donc également le jour (Ambrogio et al. 2018). Une alternative envisagée par certaines équipes de recherche, serait de cibler l'interface RAS-protéine qui aurait l'avantage de présenter plus de poches de liaison.

### 3. Utiliser la létalité synthétique

Afin de mieux aborder et mieux cibler les conséquences des mutations de *RAS*, une stratégie a été de réaliser des criblages afin d'identifier des cibles de létalité synthétique de *RAS*, dont les résultats surtout pour l'interférence ARN sont assez décevants (Downward 2015). Les nombreuses études n'avaient identifié que peu de cibles communes et certaines se sont avérées être des artéfacts techniques. Les cibles identifiées intervenaient dans différents processus cellulaires comme le cycle cellulaire et les mitoses, la survie, les programmes transcriptionnels communs, etc. De ce fait, les criblages CRISPR Cas9 qui ont l'avantage d'avoir moins d'effets non spécifiques ont été utilisés (Anderson et al. 2017; T. Wang et al. 2017). Par exemple, Wang *et al.* en utilisant un crible CRISPR dans des lignées de LAM dépendantes de leur mutation *RAS* identifient le gène *PRXE1*, qui active une protéine de la famille RACGTP et donc PAK, comme une cible potentielle de létalité synthétique (T. Wang et al. 2017). Lee *et al.* quant à eux, montrent grâce à un crible siRNA que RAF est la voie essentielle en aval de *RAS* dans des lignées de carcinomes colique et pancréatique et que cibler l'autophagie serait prometteur (C.-S. Lee et al. 2019).

### 4. Cibler le métabolisme

Des travaux récents montrent, comme expliqué plus haut, l'implication de *RAS* dans les changements métaboliques opérés dans la cellule tumorale. Ils servent donc d'inspiration pour le développement de nouveaux traitements, comme par exemple la chloroquine qui bloque l'autophagie requise dans les cancers médiés par *RAS* (S. Yang et al. 2011) et des essais cliniques sont en cours. Cibler la voie de la glutamine est également une piste intéressante (Jacque et al. 2015; Gross et al. 2014), de même que la vitamine C qui induirait un stress oxydatif (Yun et al. 2015).

### 5. Agir sur les voies de signalisation en aval

Cibler les effecteurs de *RAS* est un axe de recherche majeur dans les cancers mutés *RAS*. En particulier, la voie RAF-MAPK dont le rôle est essentiel, a fait l'objet de développement de nombreux inhibiteurs. Cependant elle apparaît au centre d'un réseau de signalisation complexe doté de multiples entrées et sorties avec des mécanismes de réentrées et de rétrocontrôles, de multiples protéines d'échafaudage

qui régulent de manière dynamique l'activité de signalisation et ERK. Il était donc prévisible que ces inhibiteurs ne donnent pas entière satisfaction, en particulier utilisés en monothérapie.

Les mutations de *BRAF* sont fréquentes en cancérologie humaine (19%), soulignant l'importance de cette voie. De plus, les mutations de *RAF* et *RAS* ont montré une redondance fonctionnelle (Collisson et al. 2012); dans un modèle murin de cancer du pancréas, la mutation *Braf*<sup>V600E</sup> reproduisant les effets de la mutation *Nras*<sup>G12D</sup>, contrairement à la mutation *Pik3ca*<sup>H1047R</sup>. Les inhibiteurs de BRAF vemurafenib et dabrafenib ont montré une grande efficacité dans les cancers mutés *BRAF* et sont utilisés en pratique clinique courante. Cependant des mécanismes de résistance ont émergé (amplification d'un RTK, de *BRAF*<sup>V600E</sup>, apparition de néo-mutations de *RAS* ou d'effecteurs en aval de la voie, etc.) et ils se sont avérés inefficaces, et ayant même un effet paradoxal pro-tumoral dans les cancers avec mutation activatrice de la voie (comme *RAS*) sans mutation de *BRAF* (Callahan et al. 2012). Cet effet est également à l'origine du développement de cancers épidermoïdes de la peau des patients traités par Vemurafenib. Les mécanismes à l'origine de cette activation paradoxale ont fait l'objet de plusieurs hypothèses et explications comme celle selon laquelle les inhibiteurs de *BRAF* transactiveraient des dimères de RAF WT ou celle selon laquelle ils empêcheraient l'autophosphorylation inhibitrice de RAF WT (Poulikakos et al. 2010; Holderfield et al. 2013).

De nombreux inhibiteurs de MEK ont également été développés, la plupart étant des inhibiteurs allostériques ce qui en fait des molécules très sélectives. On peut noter le trametinib, le cobimetinib ou le binimetinib qui ont été approuvés par la FDA dans le traitement des mélanomes *BRAF* mutés, le selumetinib étant lui, encore en développement dans des essais de phase III. Ces inhibiteurs fonctionnent bien en monothérapie dans les cancers mutés *BRAF* mais sont moins efficaces dans les cancers avec mutations de *RAS*, comme les cancers du poumon non à petites cellules (Jänne et al. 2017). Le trametinib a été utilisé dans des modèles murins pour le traitement des LAM avec mutations de *Nras*<sup>G12D</sup> (Burgess et al. 2014) et montré une survie prolongée des souris traitées. Il a également été utilisé dans une étude de phase I-II chez l'homme, chez des patients atteints de LAM ou SMD de haut risque avec des mutations de *NRAS* ou *KRAS* et permis l'obtention d'un taux de réponse globale de 27% (Borthakur et al. 2016). Des mécanismes de résistances à ces inhibiteurs existent, notamment par le renforcement de l'activité de RTK (Duncan et al. 2012; Lake, Corrêa, and Müller 2016), ou l'amplification des activateurs de la voie en amont (Little et al. 2011) en raison de la levée des rétrocontrôles, ce qui empêche l'extinction complète du signal ERK nécessaire à l'activité thérapeutique (Gideon Bollag et al. 2010). Par ailleurs, ils empêchent l'expression des DUSP nécessaires à l'inhibition de la voie. Des inhibiteurs de ERK ont aussi été développés comme l'inhibiteur allostérique et compétitif de l'ATP MK-8353 ou l'inhibiteur compétitif de l'ATP ulixertinib. Dans des études précliniques ils ont montré leur efficacité sur des modèles de cancer du pancréas (Morris et al. 2013), mais des résistances peuvent également survenir. Des stratégies d'inhibition verticale ont vu le

jour, associant plusieurs inhibiteurs de la voie MAPK et ont montré des résultats prometteurs dans différents modèles. On peut noter l'association d'un inhibiteur de BRAF et d'un inhibiteur de MEK dans les mélanomes *BRAF*<sup>V600E</sup> mutés (Long et al. 2014), l'association d'inhibiteurs de BRAF, EGFR et MEK chez des patients présentant des cancers colorectaux avec mutation *BRAF*<sup>V600E</sup> (Corcoran et al. 2018), ou encore l'association entre un inhibiteur de MEK et un inhibiteur de ERK dans des lignées de mélanome mutées *NRAS* (Rebecca et al. 2014). Afin de surmonter les résistances aux inhibiteurs de RAF ou de MEK, des inhibiteurs de pan RAF sont également en développement. Les inhibiteurs de MEK ayant montré plutôt une réponse cytostatique (en particulier dans les cancers *KRAS* mutés), il a été proposé de les combiner à d'autres molécules (Okumura and Jänne 2014). Tout d'abord, l'association aux inhibiteurs de PI3K semble logique car ciblant deux voies effectrices de RAS. *In vitro* la combinaison d'un inhibiteur de MEK et d'un inhibiteur de PI3K semble prometteuse dans des modèles de cancer du poumon *KRAS* muté ou dans des modèles de mélanome *NRAS* mutés (Engelman et al. 2008; Posch et al. 2013). Cependant l'efficacité semble limitée dans les essais cliniques (Chung et al. 2017). Les inhibiteurs de PI3K en monothérapie ont quant à eux, des résultats décevants dans les cancers mutés *RAS*. Une association avec des inhibiteurs des cyclines dépendantes kinases 4 et 6 (CDK4/6) a également été proposée dans des cancers du pancréas ou colorectaux (Ziemke et al. 2016). Les inhibiteurs de BCL-2 et BCL-XL ont aussi montré une efficacité préclinique avec l'induction d'une franche apoptose (Corcoran et al. 2013; Horn et al. 2016). Cibler les voies RALGDS et RAC seraient également intéressants mais s'avère compliqué à mettre en œuvre.

#### 6. Agir sur la voie de signalisation en amont

Enfin, les cancers médiés par RAS conservent différents degrés de dépendance au signal d'amont, et en particulier, les récepteurs à tyrosine kinase recrutent des GEFs et activent les formes WT de RAS ainsi que MRAS et RRAS. Il peut donc s'avérer efficace de cibler les récepteurs à tyrosine kinase à l'aide d'inhibiteurs déjà disponibles. Cependant, la redondance de signalisation de différents RTK fait qu'ils peuvent se substituer l'un l'autre pour réactiver la voie des MAPK en aval. Dans ce contexte, il a été récemment découvert que SHP2 jouait un rôle majeur dans la signalisation RAS induite par les RTKs et bien que le mécanisme soit imparfaitement compris, elle agirait plutôt sur l'échange de nucléotides de RAS que sur l'inhibition des GAP, dans un complexe multiprotéique en association avec SOS (Nichols et al. 2018). Ainsi, pour certains cancers qui conservent une dépendance à la signalisation d'amont, dits « semi-autonomes » (tumeurs mutées *KRAS*<sup>G12</sup>, tumeurs ayant des altérations de *NF1*, tumeurs ayant des amplifications de *KRAS* sans mutations ou tumeurs avec mutations de *BRAF* de classe III), inhiber la phosphatase SHP2 grâce à des inhibiteurs allostériques, en association ou non avec d'autres inhibiteurs de la voie semble très prometteur (Nichols et al. 2018; G. S. Wong et al. 2018; Mainardi et

al. 2018; Fedele et al. 2018; Bivona 2019). Un essai thérapeutique de phase I pour différents cancers solides est donc actuellement ouvert (NCT03518554).

### 7. Activer le système immunitaire

A l'ère du développement de l'immunothérapie dans le traitement des cancers, et connaissant les effets des mutations de *RAS* sur le microenvironnement des cancers médiés par *RAS*, ces derniers sont de bons candidats pour ces nouvelles thérapies. La réinjection de lymphocytes T spécifiques de *KRAS*<sup>G12C</sup> chez un patient présentant un carcinome colique a montré une efficacité clinique (Tran et al. 2016) et un essai avec un vaccin TG01 spécifique de *KRAS*<sup>G12D</sup> en association avec du GM-CSF est également prometteur dans des adénocarcinomes pancréatiques (Palmer et al. 2017). Les inhibiteurs du checkpoint (inhibiteur de PD-1 et inhibiteur de CTLA-4) sont également en développement : en association avec des inhibiteurs de BRAF dans des modèles précliniques de mélanome (Cooper et al. 2014), en association avec des inhibiteurs de MEK dans des modèles précliniques de cancers colorectaux (Ebert et al. 2016), et dans un essai clinique de phase Ib (Bendell et al. 2018).

## III. La voie RAS et ses partenaires dans les leucémies aiguës myéloïdes

### A. **Épidémiologie et architecture clonale**

#### 1. Les mutations de RAS

Les mutations *RAS* ont été retrouvées dans des hémopathies myéloïdes pour la première fois en 1987 (Janssen et al. 1987). Les mutations de *NRAS* sont retrouvées dans 6 à 15% des LAM et impliquent plus fréquemment le codon 12 (Bacher et al. 2006; Papaemmanuil et al. 2016; Cancer Genome Atlas Research Network 2013) mais aussi les codons 13 et 61 (Tableau 5). Les mutations de *KRAS* sont retrouvées dans 4 à 5% des LAM et sont le plus fréquemment des substitutions au niveau des codons 12, 13 et 61 (Papaemmanuil et al. 2016; Cancer Genome Atlas Research Network 2013) (Tableau 5). Cependant, le séquençage d'exome a mis en évidence des mutations ponctuelles sur d'autres codons comme les mutations *NRAS*<sup>G60E</sup>, *KRAS*<sup>V14L</sup>, *KRAS*<sup>T74P</sup> et *KRAS*<sup>A146T</sup> dans une étude portant sur 329 LAM et 32 leucémies myélomonocytaires chroniques (LMMC) (Tyner et al. 2009). Papaemmanuil *et al.* ont également identifié des mutations sur les codons 27, 58, 117 et 146 de *KRAS*. Plusieurs mutations de la voie RAS peuvent être présentes chez un même patient mais elles évoluent la plupart du temps dans des sous-clones différents (Papaemmanuil et al. 2016; Hirsch et al. 2016; Bashey et al. 1992). Ce phénomène est appelé interférence clonale. Il a été récemment montré que dans les LAM CBF qui possèdent pour 1/3 d'entre elles des mutations de gènes intervenant dans la signalisation (récepteurs à tyrosine kinase, transduction du signal ou voie RAS), la présence d'une interférence clonale était

associée à une moins bonne survie sans progression (Itzykson et al. 2018). Par ailleurs, une perte d'hétérozygotie peut être observée dans certains sous clones (Bashey et al. 1992). Parmi les sous-groupes de la classification établie par Papaemmanuil, les mutations de *NRAS* apparaissent fréquemment associées aux LAM avec mutation de *NPM1*, aux LAM avec anomalies de la chromatine ou de l'épissage, aux LAM avec inv(16), aux LAM avec mutations bi-alléliques de *CEBPA*, aux LAM avec inv(3) ou t(3;3) et aux LAM avec gène de fusion avec *KMT2A*. Les mutations de *KRAS* sont, elles, associées aux inv(3) ou t(3;3) et aux LAM avec t(6;9) tandis que les mutations de *PTPN11* sont associées aux LAM avec mutations de *NPM1* ou aux inv(3) et t(3;3). Selon le TCGA, la cohorte Beat et d'autres auteurs, les mutations de *KRAS* et *NRAS* sont mutuellement exclusives des mutations de *FLT3* *ITD* (Cancer Genome Atlas Research Network 2013; Illmer et al. 2005). Pour plusieurs auteurs, elles sont également sous représentées dans le sous-groupe de patients présentant des caryotypes complexes (Papaemmanuil et al. 2016; Bacher et al. 2006), mais aussi aneuploïdies ou mutations de *TP53* (Papaemmanuil et al. 2016).

	<b>NRAS</b>	<b>KRAS</b>	<b>HRAS</b>	<b>PTPN11</b>	<b>NF1</b>
<b>LAM</b>	6-15%	4-5%	0	5-8%	1-5,1% mutations 3,5-10,5% délétions
<b>SMD</b>	4-5%	2-5%	0	1-5%	1-2% délétions
<b>LMMJ</b>	15-20%	15%	0	35%	1-4% mutations/délétions
<b>LMMC</b>	16%	16%	0	0	4-6% altérations

**Tableau 5 : Pourcentage des mutations de KRAS, NRAS, HRAS, PTPN11 et NF1 dans les LAM, SMD, LMMJ, LMMC.**

LAM signifie leucémie aiguë myéloïde ; LMMC, leucémie myéломocyttaire chronique ; LMMJ, leucémie myéломocyttaire juvénile ; SMD, syndrome myéلودysplasique.

## 2. Les altérations de NF1

Dans les LAM, deux types d'altérations de *NF1* sont décrites : des mutations mais aussi des délétions cryptiques au niveau du locus 11q11.2 (Suela et al. 2007). Les premières études se sont d'abord intéressées aux délétions de *NF1* en utilisant des techniques variées. Suela *et al.* ont retrouvé 5.8% de délétions incluant *NF1* par CGH array sur 120 LAM *de novo*, Parkin *et al.* ont retrouvé 10.5% de délétions sur 95 patients, Haferlach *et al.* ont identifié 7.3% de délétions sur 315 patients par FISH (dont la moitié n'était pas détectable sur l'analyse du caryotype) et Boudry-Labis *et al.*, par une technique de CGH array puis qPCR et FISH, ont identifié 3.5% de délétions cryptiques 17q11, incluant

*NF1*, parmi 485 LAM (Suela et al. 2007; Parkin et al. 2010; Boudry-Labis et al. 2013; Haferlach et al. 2012). Il ressort des deux dernières études que les délétions vont de 0.46 à 2.7Mb et sont détectables par FISH et non par caryotype conventionnel ; les plus larges pouvant inclure d'autres gènes que *NF1*. Par ailleurs, certains patients ont une diminution de l'expression de *NF1* qui peut indiquer un autre type de régulation négative de la protéine comme une régulation transcriptionnelle par méthylation du promoteur. Les délétions de *NF1* étaient plus fréquemment associées à un caryotype défavorable dans l'étude de Boudry-Labis *et al* et étaient également retrouvées en association avec des inv(16), des inv(3) et en cooccurrence avec des mutations de *RAS* dans l'étude d'Haferlach. *NF1* étant décrit comme un suppresseur de tumeur, ces deux études ont recherché des mutations associées du 2<sup>ème</sup> allèle, retrouvées dans la première sur 20% et dans la seconde sur 51.7% des patients analysés (Boudry-Labis et al. 2013; Haferlach et al. 2012) . Alors qu'initialement décrites comme des évènements rares (1 à 2%) (Papaemmanuil et al. 2016; Cancer Genome Atlas Research Network 2013), les mutations de *NF1* ont été retrouvées chez 5,1% des patients dans une large cohorte de 1021 patients (Eisfeld et al. 2018). Elles comprenaient majoritairement des mutations faux sens (29/52), décalage du cadre de lecture (21/52) mais aussi non-sens (8/52) et une insertion/délétion en phase. Cette équipe a identifié un hotspot au niveau de l'acide aminé T676 (27% des mutations) (ou I679 pour (Vandepoele, Van der Meulen, and Denys 2018)). Trois patients avaient entre 2 et 5 mutations, et la VAF de tous les échantillons était en médiane de 39% suggérant que cet évènement est potentiellement précoce dans l'oncogenèse. Pour plusieurs patients la VAF  $\geq 70\%$  suggéraient une perte d'hétérozygotie qui a été confirmée par l'analyse des *copy number variation* (CNV). L'analyse des VAFs d'autres gènes mutés leur a permis de conclure que dans une petite moitié des cas la mutation de *NF1* était présente dans le clone majoritaire, et que dans la seconde moitié elle était sous clonale. Par ailleurs, les mutations de *NF1* étaient associées aux cytogénétiques suivantes : caryotype normal, caryotype complexe, trisomie 8, inv(16) et inv(3). Les caryotypes complexes étaient plus fréquents que chez les patients non mutés *NF1*. Les mutations de *NF1* étaient le plus souvent associées à des mutations de gènes de la méthylation, de kinases et de *NPM1*.

Moison *et al.* se sont récemment penchés sur l'études des LAM avec caryotypes complexes, et on retrouvés significativement plus de mutations de *NF1* chez les patients présentant des caryotypes complexes que ceux ayant des caryotypes normaux (Moison et al. 2019). Ils retrouvent par ailleurs, de très fréquentes mutations d'autres acteurs de la voie chez les patients qui avaient un caryotype complexe, ce qui n'était pas le cas dans la cohorte de Papaemmanuil (Papaemmanuil et al. 2016).

### 3. Les mutations de *PTPN11*

Les mutations de *PTPN11* associées aux LAM surviennent également dans le domaine N-SH2 et dans le domaine phosphatase (Tartaglia et al. 2003). Elles sont différentes des mutations germinales de



*PTPN11* observées dans les syndromes de Noonan et possèdent une activité enzymatique plus intense suggérant qu'un plus haut niveau d'activation de SHP2 est requis pour la leucémogénèse (Mohi et al. 2005). Les codons les plus fréquemment mutés sont : les codons 60, 61, 72, 76, 502 et 503 (Papaemmanuil et al. 2016). Elles sont dans la classification de Papaemmanuil, fréquemment associées aux sous-groupes LAM avec mutation de *NPM1* ou avec *inv(3) / t(3;3)*. Il a également été observé qu'elles pouvaient être associées à des translocations impliquant l'oncogène MLL. Chen *et al.* ont montré dans des modèles murins et humains que les protéines mutantes de *PTPN11* pouvaient coopérer avec la protéine de fusion MLL-AF9 pour induire le phénotype leucémique (L. Chen et al. 2015). Elles surviennent chez 4 à 8% des patients (Watkins et al. 2004; Cancer Genome Atlas Research Network 2013; Papaemmanuil et al. 2016) (Tableau 5). Outre les mutations activatrices de *PTPN11*, il semblerait que l'expression de SHP2 soit augmentée dans la majorité des LAM, corrélant avec les capacités prolifératives des différents échantillons (R. Xu et al. 2005) et son activité est requise en aval de mutations de différents récepteurs à tyrosine kinase comme KIT, FLT3 et PDGFR $\alpha$  (Nabinger et al. 2013; Mali et al. 2012; Noël et al. 2014).

## **B. Le rôle de RAS dans la leucémogénèse**

### **1. Le cas des LMMJ**

Les leucémies myélomonocytaires juvéniles sont des syndromes myéloprolifératifs-myélodysplasiques de l'enfant touchant principalement les enfants de moins de 2 ans, caractérisés par l'existence d'une splénomégalie, d'adénopathies, de fièvre, des signes respiratoires et cutanés, d'une monocytose sanguine et évoluant dans 1/3 des cas vers une leucémie aiguë myéloïde. On compte 10 nouveaux cas par an en France chaque année. Il s'agit d'une maladie de la cellule souche hématopoïétique caractérisée par une dérégulation de la signalisation RAS en raison de mutations de *RAS* (*NRAS* et *KRAS*) ou de régulateurs de RAS (*PTPN11*, *NF1*, *CBL*). Il en résulte une hypersensibilité des progéniteurs myéloïdes au GM-CSF avec l'existence d'une pousse spontanée des progéniteurs myéloïdes et une signalisation pSTAT5 caractéristiques (Emanuel et al. 1991; Gandre-Babbe et al. 2013; Kotecha et al. 2008). Dans 25 à 30% la maladie est dite « syndromique », survenant chez des patients présentant des RASopathies : neurofibromatose de type 1 avec perte d'hétérozygotie (Shannon et al. 1994), syndrome de Noonan avec mutation activatrice de *PTPN11* (Schubbert, Shannon, and Bollag 2007) ou syndrome CBL avec pour certains, une disomie uniparentale à l'origine d'une perte d'hétérozygotie (Pérez et al. 2010). Dans les autres cas, environ 30% ont des mutations somatiques de *NRAS* ou *KRAS* et entre 30 à 40% possèdent des mutations acquises de *PTPN11*. Des anomalies cytogénétiques peuvent être présentes au diagnostic, dont principalement des monosomies 7.

Récemment, il a été mis en évidence que des mutations somatiques pouvaient être associées à la mutation initiale dans 15 à 50% des cas, et notamment dans les LMMJ non syndromiques ou secondaires à une neurofibromatose de type 1 (Caye et al. 2015; Stieglitz et al. 2015; Murakami et al. 2018). Ces mutations concernent des gènes impliqués dans la transduction du signal ou des régulateurs de RAS (par exemple RRAS, SH2B3, JAK3, SETBP1), des facteurs de transcriptions (GATA2, RUNX1), des régulateurs épigénétiques (ASXL1 et membres du PRC2) et peuvent survenir dans des sous-clones. Les mutations secondaires semblent dépendre de la mutation initiatrice. Par ailleurs, le paradigme de mutuelle exclusivité des mutations de RAS autrefois établi s'avère faux, une deuxième mutation de la voie RAS survient dans 6 à 17% des cas et en particulier dans les LMMJ associées à *NF1*. A l'exclusion des mutations de *NF1*, ces deux mutations semblent être parfois présentes dans le clone initiateur. Ceci suggère un effet dose dépendant des mutations de RAS témoin de l'agressivité de la maladie, se traduisant d'ailleurs par un pronostic moins bon chez les patients présentant plus d'une mutation. Les mutations du complexe PRC2 sont associées dans 33% des cas de JMML sporadique et dans 63% des LAM avec altération de *NF1* indiquant qu'il existe un rôle de la régulation épigénétique dans cette maladie (Caye et al. 2015). Dans d'autres modèles comme les sarcomes dérivant des neurofibromes plexiformes, les altérations du complexe PRC2 (associées aux inactivations de *NF1*) n'avaient pas d'impact direct sur la voie RAS mais induisaient la transcription de gènes en aval de ERK, renforçant le principe d'effet dose de la signature RAS sur le signal oncogénique (De Raedt et al. 2014; W. Lee et al. 2014). Murakami *et al.* ont quant à eux, identifié un profil d'expression génique (correspondant également à un profil hyperméthylé) dans un sous-groupe de patients s'apparentant à un profil « AML-like » c'est à dire ressemblant à celui de patients ayant des LAM (Murakami et al. 2018). La LMMJ est donc une maladie où l'activation de RAS par une mutation d'un acteur de la voie est l'événement fondateur, pouvant être renforcé par une deuxième mutation de la voie survenant parfois en même temps dans le clone fondateur, et fréquemment associées à une mutation touchant un gène du complexe PRC2.

## 2. Rôle de la voie RAS dans l'initiation de la LAM grâce à l'expérience des modèles murins

### ***Mutations isolées de RAS ou des acteurs de la voie***

Contrairement à la LMMJ où les mutations de RAS ou d'effecteurs de la voie semblent être l'événement fondateur de la maladie (Caye et al. 2015; Murakami et al. 2018), l'existence de mutations de RAS dans diverses hémopathies myéloïdes laisse supposer qu'elles pourraient être des événements secondaires qui coopèrent avec un éventail de lésions génétiques initiatrices. En accord avec cette hypothèse, certaines LAM contiennent des sous-clones avec des mutations de RAS indépendantes, et

les mutations *RAS* détectées lors du diagnostic peuvent disparaître avec le temps chez les patients présentant une maladie persistante ou en rechute (Bacher et al. 2006; Jingfang Zhang et al. 2017).

Dans le but d'étudier le rôle des mutations de *RAS* dans la leucémogénèse, de nombreux modèles murins ont été créés permettant notamment l'expression conditionnelle d'allèles oncogéniques de *Ras* (Tableau 6).

Johnson *et al.* dans un modèle de recombinaison spontanée, puis Guerra *et al.* dans un modèle CMV-Cre, ont introduit des mutations oncogéniques de *Kras* au locus endogène de *Kras* qui ont permis d'induire une expression tissulaire généralisée de *Kras* oncogénique et ont démontré ainsi l'implication de *Kras* dans le développement des cancers du poumon (les souris ayant développé principalement des cancers du poumon) (Johnson et al. 2001; Guerra et al. 2003). Dans le premier modèle quelques souris ont développé des lymphomes thymiques, tandis que dans le second aucune maladie du tissu hématopoïétique n'avait été constatée. Afin de contrôler l'expression de la protéine oncogénique dans un tissu restreint, d'autres modèles murins ont donc été utilisés, et notamment des transgènes avec une Cre recombinase sous le promoteur Mx inducible par l'interféron, permettant d'induire l'expression d'un allèle mutant *Kras*<sup>G12D</sup> au sein du tissu hématopoïétique. Après injections de polyinosinic-polycytidylic acid (pI-pC), les souris porteuses de la mutation *Kras*<sup>G12D</sup> hétérozygote au niveau de son locus endogène, développent un syndrome myéloprolifératif agressif ressemblant à une LMMJ ou à une LMMC et meurent rapidement (Braun et al. 2004; I. T. Chan et al. 2004). Pour s'affranchir de l'effet de l'interféron, Zhang *et al.* utilisent un modèle de transplantation de moelle de souris ayant une mutation *Kras*<sup>G12D</sup> à des souris receveuses syngéniques; ils observent des SMP, des LALT ainsi que des lymphomes T. Ils suggèrent également que la mutation de *Kras* seule ne peut pas induire de maladie, qu'elle survient dans des cellules souches hématopoïétiques et qu'un second événement est nécessaire à l'échelle des progéniteurs (Jing Zhang et al. 2009). Le rôle de la mutation de *Kras* serait quant à lui, de promouvoir la survie cellulaire et la croissance mais la protéine oncogénique serait également impliquée dans le défaut de différenciation des progéniteurs (Jing Zhang et al. 2007; Braun et al. 2006) et dans l'instabilité génomique. Dail *et al.* associent au modèle *Kras*<sup>G12D</sup> hétérozygote inducible, de la mutagenèse insertionnelle grâce à l'injection d'un rétrovirus et obtiennent des souris présentant majoritairement des LALT, mais aussi des LAM (Dail et al. 2010).

Des modèles animaux obtenus après transduction rétrovirale de *Nras*<sup>G12D</sup> dans les cellules de moelle osseuse transplantées à des souris receveuses irradiées ont permis de reproduire LMMC et LAM (Parikh, Subrahmanyam, and Ren 2006, 2007; MacKenzie et al. 1999). Cependant l'absence de contrôle du niveau d'expression de l'oncogène les rend difficilement interprétables. Des modèles similaires à ceux utilisés pour *Kras* ont donc été développés. Les souris porteuses de la mutation *Nras*<sup>G12D</sup>

hétérozygote, localisée au niveau du locus endogène, et inductible, développent une maladie beaucoup plus tardivement, moins agressive et ont une survie prolongée en comparaison aux syndromes myéloprolifératifs *Kras*<sup>G12D</sup> (Q. Li et al. 2011). L'association de ce phénotype à une injection du rétrovirus MOL4070LTR induit une leucémie aiguë chez les souris et a permis aux auteurs de ce travail d'identifier des partenaires oncogéniques potentiels à *Nras*. Ils retrouvent notamment une implication d'*Evi1*, or, dans les LAM humaines, on sait que les t(3;3) et inv(3) sont effectivement régulièrement associées à des mutations de *NRAS* (Papaemmanuil et al. 2016). Wang *et al.* ont également étudié la mutation *Nras*<sup>G12D</sup> dans un modèle de transplantation de moelle *Nras*<sup>G12D</sup> à des souris receveuses et ont observé le développement après une certaine latence, de SMP avec parfois l'acquisition de disomies uniparentales, mais en revanche aucune leucémie aiguë myéloïde (J. Wang et al. 2010). Des modèles murins de mutations *Nras*<sup>G12D</sup> homozygotes ou de mutation *Nras*<sup>Q61L</sup> ont montré le développement de maladies intermédiaires entre les deux modèles décrits précédemment (*Kras*<sup>G12D</sup> ou *Nras*<sup>G12D</sup> hétérozygotes inductibles) (J. Wang et al. 2011; J. Xu, Haigis, Firestone, McNerney, Li, Davis, Chen, Nakitandwe, Downing, Jacks, Beau, et al. 2013; Kong et al. 2016).

Ces différents modèles suggèrent que les mutations de *RAS* sont susceptibles d'induire un syndrome myéloprolifératif en association ou non à des événements secondaires. Cependant, elles sont insuffisantes à induire par elles-mêmes une leucémie aiguë myéloïde, cela nécessitant vraisemblablement la survenue d'un événement secondaire.

Ces résultats suggèrent également que la protéine KRAS mutée serait un oncogène plus puissant que la protéine NRAS mutée. Afin d'expliquer cette différence, Chang YI *et al.* proposent un modèle d'oncogenèse dans lequel KRAS WT aurait un rôle suppresseur de tumeur. Le rôle de *Kras* WT dans l'hématopoïèse murine normale a été étudié par Damnernasawad *et al.*, dans un modèle murin d'inactivation génétique inductible dans la moelle osseuse (Darnernsawad et al. 2016). La perte de *Kras* entraînait une réduction de l'activation de ERK1/2 induite par la thrombopoïétine et le GM-CSF dans les CSH, les progéniteurs multipotents, et les cellules myéloïdes différenciées. Cela induisait une réduction de l'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques, un biais de différenciation envers le compartiment myéloïde et une diminution de la survie des cellules myéloïdes différenciées (Darnernsawad et al. 2016). Les souris développaient au bout de plusieurs mois une splénomégalie et présentaient une augmentation du compartiment des neutrophiles, suggérant qu'elles seraient prédisposées aux hémopathies myéloïdes. La même équipe, a démontré dans une étude que *Kras* oncogénique et pas *Nras* oncogénique conduit à une activation croisée de Ras WT dans les cellules médullaires, et que la perte de *Kras* WT favorise davantage l'activation de toutes les isoformes de Ras (Kong et al. 2016). Jeng *et al.* ayant montré que l'activation des formes de Ras WT passerait par la stabilisation de Sos par *Kras* muté sur un site éloigné du site catalytique, Chang YI *et al.* suggèrent que

la perte de *Kras* WT favoriserait l'activation par Sos de *Nras* WT, *Hras* WT et des formes de *Kras* muté liées au GDP (Jeng, Taylor, and Bar-Sagi 2012; Y.-I. Chang et al. 2017). En effet, la perte de *Kras* WT augmenterait les possibilités de liaison des autres isoformes au site actif de Sos. Sos serait donc indispensable à la leucémogénèse induite par *Kras*<sup>G12D</sup>, et, la capacité d'activer les formes de Ras WT spécifique à *Kras* expliquerait son plus grand pouvoir oncogénique (You X Blood 2018). Sans rentrer dans le détail mécanistique, l'équipe de Shannonn retrouve également un rôle suppresseur de tumeur de l'allèle WT de *Kras*, qui, perdu, augmente la tumorigénicité des cellules de leucémie murines et également la sensibilité aux inhibiteurs de MEK (Burgess et al. 2017). Dans les modèles *Nras* bien qu'un effet dose de l'oncogène puisse être souligné, notamment grâce au modèle homozygote qui montre une plus grande agressivité de la maladie, l'allèle WT semblerait ne pas avoir de rôle suppresseur de tumeur (J. Xu, Haigis, Firestone, McNerney, Li, Davis, Chen, Nakitandwe, Downing, Jacks, Le Beau, et al. 2013).

Des modèles impliquant *Nf1* ont également été développés. Les souris porteuses d'une invalidation homozygote de *Nf1* ne sont pas viables et meurent d'anomalies cardiovasculaires au stade E13. Lorsque la délétion est hétérozygote, elles présentent des SMP dans 10% des cas (Jacks et al. 1994), et quand on reconstitue la moelle de souris receveuse avec des cellules souches hématopoïétiques de foie fœtal d'embryons invalidés de manière homozygote, on induit également un SMP ressemblant à une LMMJ. Le *et al.* ont par ailleurs, généré des KO homozygotes inductibles à l'aide du transgène *Mx1-Cre* permettant d'obtenir une délétion de *Nf1* dans les cellules hématopoïétiques (Le et al. 2004). Les souris présentaient également des syndromes myéloprolifératifs conduisant au décès prématuré des animaux. Ce modèle confirme ainsi le rôle de la voie RAS dans son ensemble dans l'induction de ces pathologies. Les pathologies induites étaient cependant moins agressives que les SMP induits par *Kras*<sup>G12D</sup>. Une des explications pourrait être que le niveau de Ras-GTP serait inférieur dans les cellules déficientes en *Nf1* par rapport aux cellules exprimant *Kras* oncogénique car l'absence de *Nf1* supprime son interaction avec les protéines Ras sans affecter leurs activités GTPase intrinsèques.

Les souris présentant une mutation hétérozygote *Ptpn11*<sup>D61G/+</sup> présentent un phénotype de syndrome de Noonan associé au développement d'un syndrome myéloprolifératif modéré (Araki et al. 2004). De plus, l'expression inductible d'une forme mutante *Ptpn11*<sup>D61Y/+</sup> chez la souris entraîne le développement d'un syndrome myéloprolifératif fatal et déplete le compartiment des cellules souches hématopoïétiques médullaires quiescentes (G. Chan et al. 2009). Xu *et al.* ont élaboré des modèles murins avec activation de Shp2 grâce à la mutation *Ptpn11*<sup>E76K/+</sup>. La mutation provoque une létalité embryonnaire, mais exprimée uniquement dans le tissu hématopoïétique, elle entraîne le développement de SMP qui évoluent vers des LAM, LALT et LALB (D. Xu et al. 2011).

Allèle	Type de modèle	Génotype	Phénotype (s)	Références
<b>Kras<sup>G12D</sup></b>	« Knock in » conditionnel hétérozygote	<i>Mx1-Cre ; Kras<sup>G12D/+</sup></i>	SMP agressif	(Braun et al. 2004; I. T. Chan et al. 2004; You et al. 2018)
<b>Kras<sup>G12D</sup></b>	Transfert adoptif de moelle avec « Knock in » conditionnel hétérozygote à des receveuses irradiées	<i>Mx1-Cre ; Kras<sup>G12D/+</sup></i>	SMP, lymphomes T et LALT	(Jing Zhang et al. 2009; Sabnis et al. 2009)
<b>Kras<sup>G12D</sup></b>	« Knock in » conditionnel hétérozygote + mutagenèse insertionnelle par rétrovirus	<i>Mx1-Cre ; Kras<sup>G12D/+</sup></i>	LALT, LAM	(Dail et al. 2010)
<b>Kras<sup>G12D</sup></b>	« Knock in » conditionnel hétérozygote Kras, « Knock out » conditionnel homozygote Nf1	<i>Mx1-Cre ; Kras<sup>G12D/+</sup> ; Nf1<sup>flox/flox</sup></i>	LAM	(Cutts et al. 2009)
<b>Nras<sup>G12D</sup></b>	Transduction rétrovirale/ Transplantation	Cellules WT exprimant <i>Nras<sup>G12D/+</sup></i> exogène	LMMC, LAM	(Parikh, Subrahmanyam, and Ren 2006, 2007)
<b>Nras<sup>G12D</sup></b>	« Knock in » conditionnel hétérozygote	<i>Mx1-Cre ; Nras<sup>G12D/+</sup></i>	SMP indolent, SMD	(Q. Li et al. 2011)
<b>Nras<sup>G12D</sup></b>	« Knock in » conditionnel homozygote	<i>Mx1-Cre ; Nras<sup>G12D/G12D</sup></i>	SMP agressif	(J. Wang et al. 2011)
<b>Nras<sup>G12D</sup></b>	« Knock in » conditionnel hétérozygote + mutagenèse insertionnelle par rétrovirus	<i>Mx1-Cre ; Nras<sup>G12D/+</sup></i>	SMP, LAM	(Q. Li et al. 2011)
<b>Nras<sup>Q61L</sup></b>	« Knock in » conditionnel hétérozygote	<i>Mx1-Cre ; Nras<sup>Q61L</sup></i>	SMP agressif	(Kong et al. 2016)
<b>Nras<sup>G12D</sup></b>	Transfert adoptif de moelle avec « Knock in » conditionnel hétérozygote à des receveuses irradiées	<i>Mx1-Cre ; Nras<sup>G12D/+</sup></i>	SMP	(J. Wang et al. 2010)
<b>Nras<sup>G12D</sup></b>	« Knock in » conditionnel hétérozygote Nras, « Knock out » p53	<i>Mx1-Cre ; Nras<sup>G12D/+</sup> ; p53<sup>-/-</sup></i>	LAM	(Jingfang Zhang et al. 2017)
<b>Nf1<sup>+/-</sup></b>	« Knock out » germinal hétérozygote	<i>Nf1<sup>+/-</sup></i>	SMP	(Jacks et al. 1994)
<b>Nf1<sup>-/-</sup></b>	Transfert de foie fœtal « Knock out » germinal homozygote à des souris irradiées	<i>Nf1<sup>-/-</sup></i>	LMMJ	(Largaespada et al. 1996)
<b>Nf1<sup>-/-</sup></b>	« Knock out » conditionnel homozygote	<i>Mx1-Cre, Nf1<sup>flox/flox</sup></i>	SMP	(Le et al. 2004; T. Chang et al. 2013)
<b>Nf1<sup>-/-</sup></b>	Transduction de shARN pour Nf1 et Spry4 dans des cellules p53 <sup>-/-</sup> et transplantations à des souris receveuses	shARN <i>Nf1</i> ; shARN <i>Spry4</i> ; <i>p53<sup>-/-</sup></i>	LAM	(Z. Zhao et al. 2015)

<i>Nf1</i> <sup>+/-</sup>	« Knock out » conditionnel hétérozygote de <i>Nf1</i> et <i>Asx1</i>	<i>Mx1-Cre</i> ; <i>Nf1</i> <sup>+/-</sup> ; <i>Asx1</i> <sup>+/-</sup>	LAM	(P. Zhang et al. 2018)
<i>Nf1</i> <sup>-/-</sup>	« Knock out » conditionnel homozygote + mutagenèse insertionnelle par rétrovirus	<i>Mx1-Cre</i> , <i>Nf1</i> <sup>flox/flox</sup>	SMP, LAM	(Lauchle et al. 2009)
<i>Ptpn11</i> <sup>E76K/+</sup>	« Knock in » conditionnel	<i>Mx1-Cre</i> , <i>Ptpn11</i> <sup>E76K/+</sup>	SMP, LAM, LALT, LALB	(D. Xu et al. 2011)

**Tableau 6 : Principaux modèles murins d'hémopathies caractérisées par des mutations de *KRAS*, *NRAS*, *NF1* ou *PTPN11***

LAL signifie leucémie aiguë lymphoblastique ; LAM, leucémie aiguë myéloïde ; SMP, syndrome mélodysplasique.

### **Coopération entre les mutations de RAS et d'autres oncogènes ou suppresseurs de tumeurs**

Partant du constat qu'une mutation isolée d'un des gènes *Ras* n'était pas suffisante pour induire une leucémie aiguë myéloïde dans les modèles murins, plusieurs équipes ont cherché des partenaires à associer à *Nras* et *Kras*. A partir de données cliniques chez l'homme montrant la cooccurrence de mutations de *NRAS* avec des pertes de *TP53* dans les LAM, Zhang *et al.* ont élaboré un modèle murin inducible *Nras*<sup>G12D</sup> hétérozygote *p53* KO dans lequel les souris développaient rapidement des LAM, et les souris receveuses de moelle secondaires également. Dans ce modèle, la mutation *Nras*<sup>G12D</sup> coopère donc avec la perte de *TP53* pour induire une leucémie aiguë myéloïde (Jingfang Zhang et al. 2017). Omidvar *et al.* ont établi un modèle de leucémogénèse à multi étapes en utilisant la coopération de *NRAS*<sup>G12D</sup> et de BCL-2 humain : si l'expression de BCL-2 est constitutive sous le promoteur MRP8 le modèle est une LAM, tandis que BCL-2, sous le promoteur conditionnel MMTVtTA entraîne un SMD de haut risque (Omidvar et al. 2007).

Zhao *et al.* en constatant que la phosphorylation de Erk et de la protéine ribosomale S6 était bien plus importante dans les modèles *Kras*<sup>G12D</sup> avec perte de *p53* (par technique de shARN) que sans anomalie de *p53*, ont identifié *Spry4* comme étant surexprimé en l'absence d'anomalie *p53* et exerçant un rétrocontrôle négatif sur la voie (Z. Zhao et al. 2015). *SPRY4* est localisé sur le chromosome 5 qui est fréquemment délété dans les leucémies aiguës mais rarement en association avec des mutations de *RAS*. Dans le but de reproduire ce qui se passe dans certaines LAM avec délétion 5q, ils ont établi un modèle où la perte de *Trp53* associée à celle de *Nf1* (tous les deux localisés sur le chromosome 17, lui aussi fréquemment délété en présence d'une délétion 5q) et de *Spry4* induisaient des LAM chez les souris. Ils ont donc montré que la perte de plusieurs régulateurs négatifs de la voie RAS conduisait à une leucémie aiguë myéloïde (Z. Zhao et al. 2015).

De manière analogue, en constatant la coexistence des mutations d'*ASXL1* et des altérations de la voie RAS dans les LAM humaines, Zhang *et al.* ont élaboré un modèle de souris haploinsuffisantes pour *Nf1* et *Asx1* et ont constaté que les souris développaient des LAM et ce, sans nécessité de perte

d'hétérozygotie (le double *knock out* ne faisait qu'induire des maladies plus rapides) ni mutation additionnelle (P. Zhang et al. 2018) . Le succès de cette association dans l'induction des LAM serait dû à un gain de fonction permettant une augmentation de la marque répressive H3K4me3 et l'activation d'un programme transcriptionnel MYC BRD4 (P. Zhang et al. 2018). Lauchle *et al.* se sont servis du modèle *Nf1* KO homozygote inducible et de l'injection rétrovirale de MOL4070LTR afin de réaliser de la mutagenèse insertionnelle, ce qui a conduit à l'induction de LAM chez les souris qui en l'absence du rétrovirus présentent des SMP. Ce modèle leur a permis de tester des inhibiteurs de MEK, et chez les souris résistantes, d'identifier des gènes impliqués dans la résistance : *Rasgrp* (la protéine est surexprimée) et *Mapk14* (la protéine est sous exprimée) qui code pour p38 $\alpha$  (Lauchle et al. 2009). Cutts *et al.* quant à eux, ont observé qu'un modèle de KO inducible de *Nf1* associé à une induction hétérozygote de *Kras*<sup>G12D</sup> induisait également une leucémie aiguë (Cutts et al. 2009). Cela paraît contrintuitif étant donné que *Kras*<sup>G12D</sup> est insensible aux GAP. Cependant il a été récemment mis en évidence, notamment dans les LMMJ que plus la signalisation RAS était activée, plus le signal oncogénique était fort (par l'existence de co-mutation de la voie RAS par exemple). Dans ce contexte la délétion de *Nf1* pourrait par exemple activer les formes de *Ras* WT résiduelles.

Comme il a été montré que les mutations de *PTPN11* pouvaient être co-occurentes de translocations de *KMT2A*, des modèles murins de transplantation à des souris C57Bl6 de cellules possédant une association entre MLL-AF9 avec *Ptpn11*<sup>E76K</sup> ou une association entre MLL-AF10 et *Ptpn11*<sup>G503A</sup> ont montré une progression plus rapide vers la leucémie aiguë ainsi qu'une fréquence accrue de cellules souches leucémiques (J.-F. Fu et al. 2017; L. Chen et al. 2015).

### 3. Rôle de la voie RAS dans le maintien des cellules de LAM

#### **Maintenance des cellules tumorales**

Un des modèles classiques visant à expliquer la leucémogénèse, suggère que l'initiation d'une LAM nécessite à la fois une mutation de classe 1 qui active de manière aberrante la transduction du signal et une mutation de classe 2 d'un facteur de transcription (L. M. Kelly and Gilliland 2002). Bien que la réalité soit plus complexe, il est aisé de penser que les mutations de *NRAS*, *KRAS* ou *NF1* joueraient ce rôle de mutation de classe 1 et ce d'autant plus qu'elles sont mutuellement exclusives des mutations de *FLT3* et *KIT*, qui codent pour des récepteurs à tyrosine kinases en amont de RAS. L'étude de l'architecture clonale des LAM en fait le plus souvent des événements drivers, mais secondaires coopératifs (Shlush et al. 2014; Corces-Zimmerman et al. 2014), et la coexistence de plusieurs mutations de gènes de la voie RAS ou du même gène est à rapporter dans la plupart des cas au phénomène d'interférence. Plusieurs études ont montré que les mutations *RAS* pouvaient être perdues ou acquises au cours de l'évolution de la maladie et également faire partie des mécanismes



de résistances aux inhibiteurs de FLT3 (Hirsch et al. 2016; Piloto et al. 2007; H. Zhang et al. 2019). Cela concorderait donc avec l'idée que ces mutations qui modifient la signalisation sont des événements secondaires qui contribuent à l'évolution clonale des LAM. Par ailleurs, ce sont également des événements connus pour induire la transformation de syndromes myélodysplasiques en LAM (Horiike et al. 1994) .

Cependant, plusieurs auteurs ont montré l'importance de ces mutations dans la maintenance des cellules tumorales. Burgess *et al.* ont montré dans des lignées de LAM avec mutation de *NRAS* et également dans des modèles murins de transplantation d'échantillons mutés *Nras* que l'utilisation d'interférence ARN induisait respectivement : l'arrêt de la croissance cellulaire, et augmentait la survie des animaux (Burgess et al. 2014). Ceci concorde avec le fait qu'en rémission d'une LAM, bien que des mutations de *DNMT3A* ou *TET2* puissent persister sans maladie, aucune mutation de *RAS* n'a jamais été retrouvée. Par ailleurs, bien que peu fréquentes (voir chapitre suivant), des rémissions complètes peuvent survenir avec des inhibiteurs de MEK, ce qui est un autre argument laissant à penser que ces mutations sont essentielles à la survie de la cellule tumorale.

Savoir quels effecteurs de RAS sont impliqués dans l'initiation de la leucémogénèse et dans la maintenance tumorale est complexe. L'existence dans les LAM, de mutations « en amont » de *RAS* (comme les mutations de *KIT*, *CBL*, *PTPN11* ou *FLT3*) laisse penser que la dérégulation de plusieurs voies est essentielle.

### **Le rôle de la voie RAF/MAPK**

Dans le cas des leucémies aiguës, les mutations de la voie RAS induisent une activation de la voie des MAPK qui entraîne une croissance cellulaire et une prolifération accrue. Par exemple, la perte de *NF1* entraîne une activation de la voie des MAPK (G. Bollag et al. 1996). Yin *et al.* ont également montré que les délétions homozygotes de *NF1* dans les LAM entraînaient la phosphorylation de ERK et de eIF4E par l'activation des voies RAF/MAPK et PI3K/AKT respectivement, et que cela entraînait une résistance à l'aracytine *in vitro* (Yin et al. 2006). De la même façon, des progéniteurs des macrophages transformés avec les mutations E76K, D61Y ou D61V de *PTPN11* induisent une hypersensibilité au GM-CSF et une signalisation phospho-ERK (p-ERK) accrue. Dans le cas de SHP2, l'ablation de la fonction phosphatase (par les mutations C463S ou R465M), la diminution de la liaison du domaine N-SH2 ou du domaines C-SH2, ou encore la mutation du résidu Y542 abolissent la capacité de transformation de la mutation E76K, suggérant que l'activité phosphatase et la fonction d'adaptateur sont requise pour l'oncogénicité de SHP2 (R. J. Chan et al. 2005; Mohi et al. 2005).

Cependant les mutations de *RAS*, *NF1*, *PTPN11* ne sont pas les seules à provoquer une activation de la voie RAF/MAPK : les mutations des récepteurs en amont (*FLT3*, *KIT*) mais aussi les translocations récurrentes induisant des gènes de fusion comme *BCR-ABL* ou *TEL-PDGFR* activent la voie. Mizuki *et*

*al.* ont bien démontré que les mutations de *FLT3-ITD* induisaient une activation de la voie RAF/MAPK (Mizuki et al. 2000).

De plus d'autres voies de signalisations interagissent avec la voie RAF/MAPK et cette dernière peut être activée dans de très nombreux échantillons de LAM quel que soit leur statut mutationnel (Morgan, Dolp, and Reuter 2001; Towatari et al. 1997; M. R. Ricciardi et al. 2005). Ricciardi *et al.* ont montré par cytométrie en flux, que 83,3% de 42 échantillons de LAM avaient une phosphorylation constitutive de ERK (M. R. Ricciardi et al. 2005). De plus, Illmer *et al.* ont montré que l'activation de RAS évaluée par pull down avec des billes couplées à RAF n'était pas réservée aux échantillons de LAM avec mutations de RAS (Illmer et al. 2005). Paradoxalement, chez ces derniers, certains ne présentaient d'ailleurs pas d'activation de RAS, ce qui pourrait être expliqué par l'existence de boucles de rétroaction. L'inhibition de la transcription de *NF1* par méthylation de son promoteur (G. Yang et al. 2005), ou l'augmentation de sa dégradation par ubiquitination (Hollstein and Cichowski 2013), sont également d'autres manières d'inhiber NF1 et donc d'activer la voie RAS.

Par ailleurs, il a également été rapporté une activation de la voie induite par la chimiothérapie provoquée par l'induction de ROS et l'activation de la calcium calmoduline kinase (Steelman et al. 2010).

De plus, alors que pour certains auteurs l'activation de ERK corrélait bien avec le statut mutationnel, Lida *et al.* n'ont pas retrouvé d'association entre les mutations de *NRAS* dans des échantillons primaires de LAM et la phosphorylation de ERK2 (Lida et al. 1999). Ceci laisse penser que pour certaines mutations, d'autres voies que la voie des MAPK, en aval de RAS seraient activées.

### **Le rôle de la voie PI3K/AKT**

Gristman *et al.* ont étudié l'implication de la voie PI3K chez les patients présentant des LAM avec mutations de RAS. Ils ont montré qu'en générant des souris *Pik3ca<sup>fl/fl</sup>;lox-stop-lox-Kras<sup>G12D/+</sup>*, c'est à dire *knock in Kras<sup>G12D/+</sup>* et *knock out p110 $\alpha$* , on retardait l'apparition du syndrome myéloprolifératif et on prolongeait la survie des animaux. Par ailleurs, un inhibiteur sélectif de p110 $\alpha$  associé à un inhibiteur de MEK était efficace sur des cellules de LAM mutées *NRAS* et *KRAS in vitro*, mais également *in vivo*, dans un modèle de transplantation (Gristman et al. 2014). Ceci démontre le rôle essentiel de la voie PI3K en aval des mutations de *KRAS* et *NRAS* dans la leucémogénèse. Yin *et al.* soulignaient également l'implication de l'activation de mTORC1 par la voie PI3K-AKT dans les LAM avec délétion de *NF1* (Yin et al. 2006), et Parkin *et al.* ont également montré que les blastes n'ayant pas d'expression de NF1 étaient plus sensibles à la rapamycine (Parkin et al. 2010).

### ***Implication de la localisation de RAS***

La localisation subcellulaire de RAS est un sujet de plus en plus étudié y compris en oncogénèse. Des différences de localisation en fonction des isoformes, des mutations et des tissus, pourraient expliquer les différences d'activation d'effecteurs et donc de voies de signalisation oncogéniques. Ceci a été montré dans des modèles de cancers solides (Casar et al. 2018; Nussinov, Tsai, and Jang 2018). Dans les hémopathies myéloïdes, Odmivar *et al.* dans leur modèle de LAM ou SMD de haut risque *NRAS-BCL2*, ont montré que dans les LAM, *NRAS* était localisé préférentiellement à la mitochondrie dans un complexe avec *BCL-2* et inhibait l'apoptose. A l'inverse dans le modèle de SMD de haut risque, le complexe était localisé à la membrane plasmique (Omidvar et al. 2007) .

#### 4. Impact pronostic des mutations de la voie RAS

L'impact pronostic des mutations de la voie RAS est controversé.

- Plusieurs études n'ont pas trouvé d'impact pronostic des mutations de *NRAS* (Bacher et al. 2006; Papaemmanuil et al. 2016; Bowen et al. 2005; Ritter et al. 2004) ou de *KRAS* (Bowen et al. 2005; Ritter et al. 2004) que ce soit en termes de rémission complète, de survie globale ou de survie sans progression. Un sous-groupe présentant l'association *NPM1 NRAS* semblerait évoluer plus favorablement selon Bacher *et al.* De même, selon Papaemmanuil *et al.* l'association *NPM1, NRAS, DNMT3A* serait associée à une survie prolongée.
- En revanche, certaines mutations de la voie RAS semblent avoir un impact pronostic négatif : *BRAF* et dans une moindre mesure *KRAS* et l'association *KRAS-PTPN11* influencent négativement la survie, tandis que *NF1, NRAS, PTPN11* et l'association *NRAS-PTPN11* n'ont pas d'impact pronostic établi (Papaemmanuil et al. 2016).
- Dans l'étude d'Eisfeld *et al.*, les mutations de *NF1* n'avaient pas d'impact pronostic chez les sujets jeunes traités intensivement, sauf dans le sous-groupe ELN défavorable (diminution du nombre de rémissions complètes et de la survie globale) (Eisfeld et al. 2018). Chez les patients âgés, elles étaient associées à une moins grande probabilité d'obtenir une réponse complète. Boudry-Labis *et al.* n'ont pas observé de différence de survie ni de progression chez les patients qui avaient des délétions de *NF1* (Boudry-Labis et al. 2013).

#### 5. Thérapies ciblées dans les LAM mutées RAS/ NF1

L'emploi d'une thérapie ciblée dans les LAM avec mutations de la voie *RAS* est un défi qui pose de nombreuses questions (Braun and Shannon 2008). Cette stratégie repose sur le postulat selon lequel, l'activation de la voie *RAS* oncogénique est indispensable à la survie de la cellule tumorale. Cependant l'absence d'inhibiteur spécifique de *RAS*, rend le chercheur dépendant d'inhibiteurs bloquant les

effecteurs en aval ou de stratégies indirectes. De plus, contrairement à d'autres modèles où la mutation de *RAS* est l'élément primitif, il serait un événement secondaire dans les LAM. Les difficultés s'additionnent encore lorsque l'on prend en compte la diversité des mutations qui pourraient ne pas avoir les mêmes conséquences, l'existence de sous-clones, ou encore les différences potentielles de sensibilité entre cellules souches leucémiques et cellules du bulk. *RAS* étant au cœur de la signalisation de la cellule normale, nous sommes également confrontés à une potentielle toxicité.

### ***Inhibiteurs de farnésyl transférase***

Lors de leur développement clinique, les inhibiteurs de farnésyl-transférase ont été testés chez les patients atteints de LAM dans l'espoir d'être efficaces chez les patients ayant des mutations de *RAS*. Malheureusement les essais n'ont montré aucune efficacité dans les LAM. Une première étude du tipinarfib avait montré un taux de réponse globale de 23% avec 14% de réponse complète chez des patients âgés présentant des LAM non traitées (sans corrélation avec le statut pERK) (Lancet et al. 2007), mais une large étude de phase 3 a ensuite retrouvé un taux de réponse complète plus faible de 8% sans différence avec le groupe de meilleur traitement de confort (Harousseau et al. 2009) ; tandis qu'il n'y avait pas d'avantage à l'associer à des faibles doses d'aracytine dans une étude plus récente (Burnett et al. 2012). Bien qu'ils n'aient pas été testés spécifiquement chez des patients avec mutation de *RAS* il a été montré dans les cancers solides, comme expliqué précédemment, qu'il n'était pas efficace dans les mutations de *NRAS* et *KRAS* en raison de la géranylgéranylation.

### ***Inhibiteurs de MEK***

Des modèles précliniques avaient montré des résultats encourageant concernant l'utilisation d'inhibiteurs de MEK dans les LAM avec altérations de *NF1* ou mutations de *RAS*. Tout d'abord, *in vitro*, l'inhibition de MEK induisait une déphosphorylation de ERK et l'arrêt de la croissance, du cycle cellulaire et une induction d'apoptose dans de nombreuses lignées et échantillons de LAM (Maria Rosaria Ricciardi et al. 2012; Morgan, Dolp, and Reuter 2001; M. Milella et al. 2001; Jing et al. 2012). Le statut mutationnel n'était pas tout le temps recherché, mais l'efficacité semblait être corrélée à l'activation de la voie MAPK qui pouvait, elle, être secondaire à une mutation d'un gène de la voie, ou non. Tyner *et al.* ont également retrouvé une sensibilité accrue des cellules de patients ayant des mutations de la voie *RAS* aux inhibiteurs de MEK (Tyner et al. 2018).

*In vivo*, Chang *et al.* ont retrouvé une efficacité de l'inhibiteur de MEK PD0325901 dans un modèle de SMP *Nf1* KO (T. Chang et al. 2013). Dans un modèle de LAM, Lauchle *et al.* ont observé une efficacité de l'inhibiteur de MEK CI-1040 dans la plupart des LAM de souris *Nf1* KO avec injection du rétrovirus MOL4070LTR (Lauchle et al. 2009). L'étude leur a permis d'identifier de potentiels gènes de résistance dans les gènes *Rasgrp1*, *Rasgrp4* et *Mapk14*. La même équipe, dans un article de Burgess *et al.* en

utilisant le modèle *Mx1-Cre ; Nras<sup>G12D/+</sup>* avec également mutagenèse insertionnelle, transplanté à des souris receveuses secondaires, a montré que deux inhibiteurs de MEK (PD0325901 ou tramétinib / GlaxoSmithKline 1120212) prolongeaient la survie des souris, sans induire d'apoptose, de différenciation ni changer l'évolution clonale avec surtout un effet antiprolifératif; et ce, contrairement à un inhibiteur de PI3K (GDC-0941) qui n'avait pas d'effet seul et n'apportait pas de bénéfice en association (Burgess et al. 2014). Dans le modèle *Kras<sup>G12D</sup>* avec mutagenèse insertionnelle, ils ont également montré que l'efficacité de l'inhibiteur de MEK PD0325901 dépendait de la « quantité » de *Kras* muté. Ainsi, l'acquisition d'une disomie uniparentale et la perte de l'allèle WT de *Kras* augmentait la tumorigénicité des cellules mais également leur dépendance aux inhibiteurs de MEK (Burgess et al. 2017; Tothova and Ebert 2017). Cette hypothèse n'a pas été démontrée dans des modèles *Nf1* ou *Nras*.

Quatre essais thérapeutiques d'inhibiteurs de MEK ont été pour l'instant publiés chez l'homme dans les leucémies aiguës myéloïdes (Tableau 7). Borthakur *et al.* ont rapporté les effets du tramétinib dans un essai de phase I-II regroupant 97 patients ayant des LAM, SMD ou LMMC en rechute ou réfractaires, avec ou sans mutation de *RAS* (Borthakur et al. 2016). Ils ont retrouvé 20% de réponse chez les patients présentant des LAM et SMD avec mutation de *RAS* avec des réponses complètes, 3% chez les patients n'ayant pas de mutations de *RAS*, toutes pathologies confondues, et 27% pour les LMMC avec mutations de *RAS*. Jain *et al.* ont testé le selumétinib chez 47 patients ayant des LAM en rechute ou réfractaires, ou âgés non traités dans un essai de phase II (Jain et al. 2014). Le taux de réponse global était de 17% parmi les patients n'ayant pas de mutation *FLT3-ITD* versus 0% chez les patients mutés *FLT3 ITD*. Un seul patient avait une mutation de *KRAS* et a obtenu une réponse mineure non confirmée, tandis que les 3 patients mutés *NRAS* n'ont pas obtenu de réponse, et le taux basal de phosphorylation de ERK n'était pas corrélé à la réponse. Maiti *et al.* ont testé le binimétinib chez 19 patients ayant des LAM en rechute ou réfractaires et n'ont obtenu qu'une seule réponse complète sur les 13 patients évaluables chez un patient ayant une mutation *NRAS<sup>G12A</sup>* qui a duré 2,1 mois (Maiti et al. 2019). La même équipe a également évalué le pimasetinib dans une phase I qui n'a permis d'obtenir que 60% de maladie stable chez 15 patients présentant une LAM et n'a donc pas été repris pour une étude de phase II (Ravandi et al. 2015). Malgré le fait que les populations ciblées soient souvent âgées et lourdement pré-traitées, les réponses aux inhibiteurs de MEK semblent peu satisfaisantes et la présence de mutation de *RAS* n'induisait une efficacité supérieure que de façon inconstante. L'émergence de résistance à ces agents en monothérapie pourrait être due à l'activation d'autres voies de signalisation ou à la levée de rétrocontrôles (Caunt et al. 2015). L'utilisation d'associations thérapeutiques semble dans ce contexte plus pertinente. Il a été notamment proposé des inhibitions « verticales » de la voie RAS/MAPK (avec l'utilisation concomitante de plusieurs inhibiteurs de la voie),

ou des inhibitions « horizontales » comme l'utilisation d'un inhibiteur de MEK en association avec un inhibiteur de PI3K ou mTOR (M. Milella et al. 2005).

Inhibiteur de MEK	Type de maladie	Réponse, % (n/n)	Etude
<b>Trametinib</b>	◇ LAM ou SMD de haut risque R/R mutant <i>RAS</i>	◇ RG 20% (10/50)	(Borthakur et al. 2016)
	◇ LAM, SMD ou LMMC <i>RAS</i> WT ou inconnu	◇ RG 3% (1/30)	
	◇ LMMC mutée <i>RAS</i>	◇ RG 27% (3/11)	
<b>Selumetinib</b>	LAM R/R et nouvellement diagnostiquées	◇ RG 17% (6/36) <i>FLT3</i> WT patients (1/1 réponse muté <i>KRAS</i> , 0/3 <i>NRAS</i> ) ◇ RG 0% (0/10) <i>FLT3-ITD</i>	(Jain et al. 2014)
<b>Binimetinib</b>	LAM et SMD R/R	RCi 8% (1/13)	(Maiti et al. 2019)
<b>Pimasertib</b>	LAM, LAL, SMD, SMP, MM	MS 67% (39/58) (60% parmi les LAM 9/15)	(Ravandi et al. 2015)

**Tableau 7 : Réponse cliniques aux inhibiteurs de MEK dans les études portant sur les LAM**

LAL signifie leucémie aiguë lymphoblastique ; LAM, leucémie aiguë myéloïde, LMMC, leucémie myélomonocytaire chronique ; MM, myélome multiple ; MS, maladie stable ; RCi, réponse complète avec récupération hématologique incomplète ; RG, réponse globale ; R/R, réfractaire ou en rechute ; WT, *wild type*.

### Associations thérapeutiques

Milella *et al.* ont proposé une association entre un inhibiteur de MEK (PD184352) et un inhibiteur de BCL-2 (HA14-1) avec comme hypothèse que les deux voies interagissaient entre elle car la voie ERK activée promouvait la croissance cellulaire sans modifier l'expression de BCL-2. L'association a montré des résultats synergiques avec une apoptose induite dans les cellules de lignées de LAM et une diminution du potentiel clonogénique d'échantillons primaires *in vitro* (Michele Milella et al. 2002). Un essai thérapeutique de phase I/II testant l'association cobimetinib/ Venetoclax est actuellement ouvert (NCT02670044).

Contrairement à Lauchle *et al* qui n'avaient pas trouvé d'intérêt à une association entre un inhibiteur de PI3K et un inhibiteur de MEK (Lauchle et al. 2009), Gritsman *et al.* ont montré qu'un inhibiteur sélectif de p110 $\alpha$ , le BYL719, permettait de sensibiliser les cellules de LAM mutées *RAS* à un inhibiteur de MEK (MEK162) *in vitro* et *in vivo* dans un modèle de transplantation de lignées de LAM (Gritsman et al. 2014) . Malheureusement, chez l'homme, une stratégie associant un inhibiteur d'AKT et le trametinib dans un essai de phase I a donné des résultats décevants avec un manque d'efficacité (NCT01907815).

Un essai thérapeutique a également été conduit avec de la chimiothérapie haute dose (Cytarabine et Idarubicine) chez des patients présentant des LAM en rechute ou réfractaires, les résultats sont en attente.

Par ailleurs, dans un modèle murin double KO pour *Asx1* et *Nf1*, Zhang *et al.*, ont montré l'efficacité d'une association entre un inhibiteur de BET et un inhibiteur de MEK (PD0325901) sur le développement de la maladie, mais aussi sur la survie des animaux lors de transplantations secondaires (P. Zhang *et al.* 2018).

### **Autres stratégies**

De la même manière que dans les cancers solides, la létalité synthétique ou la découverte de nouveaux inhibiteurs intervenant dans la signalisation RAS est un axe de recherche dans les LAM. Par exemple, grâce à un crible pharmacologique, Nonami *et al.* ont pu identifier le GNF-7 comme étant efficace dans des modèles de LAM avec mutation *NRAS*, non pas en ciblant directement *NRAS*, mais en ciblant ACK1/AKT et GCK qui semblent essentielles dans l'oncogenèse médiée par *NRAS* (Nonami *et al.* 2015). Le prometteur inhibiteur de SHP2, SHP099 pourrait également avoir un intérêt dans certains LAM avec mutations de *RAS*, une expérience de xénogreffe de cellules d'un patient présentant une LAM ayant montré une réduction tumorale (Y.-N. P. Chen *et al.* 2016) .

Enfin, la disponibilité de large base de données de patients avec des informations sur les sensibilités thérapeutiques (Tyner *et al.* 2018), le développement de nouvelles technologies comme les cribles CRISPR, l'accroissement de nos connaissances sur la voie RAS, permettra certainement l'émergence de nouveaux traitements, ou le repositionnement d'anciens traitements qui permettront de venir à bout de cette signalisation RAS oncogénique.

# Objectifs

Le paysage mutationnel des LAM décrypté grâce au développement des techniques de génomique (Papaemmanuil et al. 2016; Cancer Genome Atlas Research Network 2013), a permis une meilleure compréhension des mécanismes de leucémogénèse et d'architecture clonale de la maladie. La connaissance des mutations géniques survenant chez chaque patient offre la possibilité d'utiliser des traitements ciblés, dont le succès repose sur le concept d'addiction oncogénique, reflétant la dépendance des cellules tumorales à un oncogène pour leur survie (Weinstein and Joe 2006). Ces thérapies ciblées ont souvent l'avantage d'être moins toxiques que les chimiothérapies classiques et sont plus accessibles aux patients âgés. Plusieurs cancers ont largement bénéficié de ces stratégies, comme les leucémies myéloïdes chroniques pour lesquelles les inhibiteurs de tyrosine kinase, ont changé le pronostic des patients (Goldman and Melo 2001). Dans les LAM, les patients ayant des mutations ou duplication en tandem de *FLT3* ou des mutations d'*IDH1* ou d'*IDH2* ont désormais accès à un traitement personnalisé (Stone et al. 2017; Stein et al. 2019; Pollyea et al. 2019). D'autres cibles existent, et à ce titre, nous pouvons citer les effecteurs de la voie de signalisation RAS.

Dans ce contexte je me suis intéressée aux mutations de *RAS* et plus généralement, aux altérations des différents protagonistes de la voie RAS. Bien que décrits comme des événements tardifs du processus de leucémogénèse, les mutations de *RAS* et des acteurs de la voie, sont indispensables à l'initiation et au maintien du clone tumoral, en raison de leur action sur la prolifération et la survie cellulaire.

Le premier objectif de ma thèse était d'identifier et de caractériser un sous-groupe de patients atteints de LAM ayant des altérations de la voie RAS. Des mutations de *NRAS* et *KRAS* sont détectées dans environ 15% des LAM, quels sont les autres gènes de la voie RAS impliqués ? Les mutations et délétions identifiées sont-elles essentielles à la cellule tumorale et responsables d'une addiction oncogénique ? J'ai donc conçu un panel de séquençage NGS prenant en compte la plupart des gènes codant des effecteurs de la voie RAS et impliqués dans les syndromes génétiques dits « RASopathies » comme dans les pathologies cancéreuses somatiques, afin de réaliser un séquençage ciblé de 140 échantillons de patients atteints de LAM.

Le deuxième axe de mon projet visait à identifier de nouveaux traitements préférentiellement actifs dans les cellules avec activation de RAS. Des années de recherche depuis la découverte de l'oncogène *RAS* ont montré qu'il était très compliqué de cibler directement RAS, en raison de l'absence de poche de liaison pharmacologique et de sa très haute affinité pour le GTP (Ryan and Corcoran 2018). Actuellement trois avancées sont remarquables et prometteuses dans le domaine :



- L'inhibition d'effecteurs de RAS comme BRAF, ou d'acteurs en aval de la voie des MAPK comme MEK, a permis le développement clinique d'inhibiteurs utilisés notamment dans le traitement des mélanomes.
- Des inhibiteurs directs de KRAS-G12C (Ostrem et al. 2013; Janes et al. 2018) (Ostrem Nature 2013, Janes Cell 2018), sont également en développement.
- Enfin, plus récemment, des inhibiteurs de SHP2 ont été développés et pourraient s'avérer efficaces dans des contextes mutationnels spécifiques, ou en association aux inhibiteurs de MEK afin d'éviter l'émergence de résistances (Bivona 2019).

Dans les LAM, les premiers essais thérapeutiques concernant les inhibiteurs de MEK ont été décevants (Borthakur et al. 2016; Jain et al. 2014). En effet, de nombreux obstacles sont présents dans les LAM : diversité des mutations de la voie RAS et de leurs conséquences biologiques, existence de sous-clones, différences de sensibilité au sein de sous-populations cellulaires en particulier des CSL.

Nous avons choisi une stratégie de repositionnement de drogues déjà commercialisées, afin d'identifier une molécule qui inhiberait une caractéristique spécifique de la cellule tumorale possédant une altération de la voie RAS. Plusieurs exemples historiques démontrent le potentiel de réussite de cette technique, comme l'utilisation de la thalidomide dans le myélome multiple (Singhal et al. 2002); le propranolol dans le traitement des hémangiomes (Léauté-Labrèze et al. 2008); ou encore, les dérivés de l'acide rétinoïque dans le traitement de la LAP (Flynn et al. 1983) . Cette stratégie offre par ailleurs l'avantage d'une disponibilité immédiate du médicament dont le profil de tolérance est généralement bien caractérisé, et tout cela à un moindre coût (Bertolini, Sukhatme, and Bouche 2015). L'objectif était donc de modéliser *in vitro* les mutations et délétions de gènes conduisant à l'activation de RAS dans des lignées de LAM, afin d'identifier grâce à un crible pharmacologique de nouveaux traitements. Les résultats de ce travail sont présentés au format d'un article destiné à être soumis à une revue internationale à comité de lecture au cours des prochains mois.

# Résultats

# New therapeutic approaches in acute myeloid leukemia with mutations in the RAS pathway

## Introduction

Acute myeloid leukemia (AML) are heterogeneous malignancies arising from the multistep transformation of bone marrow immature cells (1,2). Although still associated with a low cure rate, recent advances in our understanding of AML molecular complexity resulted in significant therapeutic improvements for subgroups of patients (3). Particularly, AML harboring mutations in *FLT3*, *IDH1* or *IDH2* genes – representing 50% of AML cases – develop an oncogenic addiction to these mutations, offering an avenue for targeted inhibition as recently illustrated by successful tailored clinical trials (4–6). However, many AML cases still lack a druggable oncogenic target, despite the thorough characterization of the molecular landscape of these diseases (7).

Human cancers frequently harbor mutations in the RAS oncogene family including *NRAS*, *KRAS* and *HRAS*, driving oncogenesis through the activation of cellular proliferation and survival (8). RAS are small protein GTPases, regulated by a switch between active GTP-linked and inactive GDP-bound RAS molecules involving a complex network of guanine exchange factors (GEFs, in favor of RAS-GTP) and GTPase activating factors (GAPs, in favor of RAS-GDP). RAS activation – after recruitment by transmembrane tyrosine kinase receptors, or intrinsically in case of activating mutation – elicit the cascade activation of the RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways (9). Besides RAS activating mutations conferring independence from physiological regulators, other mutations in genes involved in the RAS network may be found in human cancers such as *NF1* (encoding neurofibromin, a RAS GAP), *BRAF* or *PTPN11* (encoding the SHP2 tyrosine phosphatase involved in RAS activation) (9).

Somatic alterations of RAS pathway genes are reported in up to 20% AML cases, notably in *NRAS*, *KRAS*, *PTPN11* (missense mutations) and *NF1* (mutations and deletions) (7,10). Generally arising as secondary driver events, RAS pathway mutations participate to leukemogenesis through mitogen activated protein kinase (MAPK) activation (9,11). The anti-tumor activity of MEK inhibitors in *Nras*-mutated AML in mice, and in some *NRAS* or *KRAS*-mutated AML patients (12,13) suggests that deregulated RAS signaling pathway may represent bona fide targets for therapy. However, currently available strategies mostly involving indirect RAS inhibition are hampered by feedback loops, redundancy and tumor heterogeneity (14–16).

In this report, we showed that RAS pathway mutations were detected in 40% of *FLT3*- and *NPM1*-unmutated AML cases and correlated with higher white blood cell count, blast cell percentage and reduced survival after intensive therapy. Building on genetic models of RAS activation, we highlighted the leukemogenic potential of RAS pathway alterations, and the efficacy and limitations of MEK

inhibitors in this context. From high-content chemical screens, we unraveled pyrvinium pamoate – an anthelmintic drug approved in human patients – as displaying a preferential cytotoxicity against RAS activated cells. This potential clinical candidate demonstrated a robust synergistic activity with the MEK inhibitor trametinib, including in primary samples from AML patients. Together our data suggest that RAS pathway altered cases may represent a specific AML subtype, in which the anti-leukemic molecule pyrvinium pamoate may represent a new promising therapeutic strategy.

## Methods

### Patients

AML patients provided a written informed consent in accordance with the declaration of Helsinki. Blood or bone marrow samples were submitted to a Ficoll-Hypaque density gradient (1800rpm during 0.5 h) as previously described (17). Mononuclear cells were collected by pipetting, washed once in phosphate buffer saline (PBS), then incubated with a red cell lysis buffer (155mM NH<sub>4</sub>Cl, 10mM KHCO<sub>3</sub>, 0.1mM EDTA) for 5 minutes, washed once again in PBS. DNA was immediately extracted using the DNA/RNA Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer's procedures. Leftover cells were cryopreserved, and RNA and proteins were extracted shortly after thawing of cryopreserved cells using AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit (80004, Qiagen, Courtaboeuf, France) according to manufacturer's instructions. Samples containing less than 70% blast cells before Ficoll either were purified using MiniMACS immunoaffinity columns (Miltenyi Biotec, Paris, France) in case of CD34 membrane expression, or sorted with an Aria3 cytometer gating the low side scatter and low CD45-expressing population.

### NGS

- Targeted sequencing using AmpliSeq™ and Ion Torrent™ technologies

Mutations in selected panels of 30 (RASopathy panel) or 46 (Myeloid panel) genes, or in *NF1*, *EED*, *EZH2* and *SUZ12* genes, were screened by a Next-Generation Sequencing (NGS) assay using the Ion AmpliSeq™ library kit2 384 (Life Technologies, Chicago, IL). Multiplex PCR amplifications (233 primer pairs) with panels designed using AmpliSeq™ Designer (version 4.47) on Human genome hg19 were performed from 20 ng of genomic DNA. After amplification, barcodes and adaptors were added to amplicons by ligation. Products were subjected to a selective purification on AMPure beads (Life Technologies). Emulsion PCR (emPCR) was performed using the OneTouchV2 (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, US) instrument. Sequencing was performed on Ion PGM™ (Life Technologies) onto a dedicated 318 V2 chip.

For the “RASopathy” panel, the targeted regions were covered by 390 amplicons of 125-275 bp average length and included the 30 following genes:

Gene	transcript	location
<i>SNORD50A</i>	NR 003038	6q14.3
<i>SNORD50B</i>	NR 003038	6q14.3
<i>SPRY3</i>	NM 005840	Xq28
<i>BRAFP1</i>	NG 003108	Xq13.3
<i>SPRY1</i>	NM 001258038	4q28.1
<i>PEBP1</i>	NM 002567	12q24.23
<i>MAP2K2</i>	NM 030662	19p13.3
<i>DUSP6</i>	NM 001946	12q21.33
<i>SPRED2</i>	NM 181784	2p14
<i>SPRED3</i>	NM 001042522	19q13.2
<i>SPRY2</i>	NM 005842	13q31.1
<i>SOS1</i>	NM 005633	2p22.1
<i>PTENP1</i>	NR 023917	9p13.3
<i>MAP2K1</i>	NM 002755	15q22.31
<i>HRAS</i>	NM 176795	11p15.5
<i>SNHG5</i>	NR 003038	6q14.3
<i>PTEN</i>	NM 000314	10q23.31
<i>RRAS</i>	NM 006270	19q13.33
<i>SPRED1</i>	NM 152594	15q14
<i>RASA2</i>	NM 006506	3q23
<i>SHOC2</i>	NM 007373	10q25.2
<i>RAF1</i>	NM 002880	3p25.2
<i>BRAF</i>	NM 004333	7q34
<i>KRAS</i>	NM 033360	12p12.1
<i>ETV5</i>	NM 004454	3q27.2
<i>RASA1</i>	NM 002890	5q14.3
<i>SPRY4</i>	NM 001127496	5q31.3
<i>PTPN11</i>	NM 002834	12q24.13
<i>CBL</i>	NM 005188	11q23.3
<i>NRAS</i>	NM 002524	1p13.2

For the myeloid genes panel, the targeted regions were covered by 606 amplicons of 125-275 bp average length and included the 46 following genes:

Gene	transcript	location
<i>ASXL1</i>	NM 015338	20q11.21
<i>BCOR</i>	NM 001123385	Xp11.4
<i>BCORL1</i>	NM 021946	Xq26.1
<i>BRAF</i>	NM 004333	7q34
<i>CALR</i>	NM 004343	19p13
<i>CBL</i>	NM 005188	11q23.3
<i>CSF3R</i>	NM 156039	1p34.3
<i>CSNK1A1</i>	NM 001025105	5q32
<i>CUX1</i>	NM 001202543	7q22.1
<i>DDX41</i>	NM 016222	5q35.3
<i>ETNK1</i>	NM 018638	12p12.1
<i>DNMT3A</i>	NM 022552	2p23.3
<i>ETV6</i>	NM 001987	12p13.2
<i>EZH2</i>	NM 001987	7q36.1
<i>FLT3</i>	NM 004119	13q12.2
<i>GATA2</i>	NM 001145661	3q21.3
<i>HRAS</i>	NM 001130442	11p15.5
<i>IDH1</i>	NM 005896	2q34
<i>IDH2</i>	NM 002168	15q26.1
<i>JAK2</i>	NM 004972	9p24.1
<i>KDM6A</i>	NM 021140	Xp11.3

<i>KIT</i>	NM 000222	4q12
<i>KRAS</i>	NM 033360	12p12.1
<i>MPL</i>	NM 005373	1p34.2
<i>MYD88</i>	NM 001172567	3p22.2
<i>NRAS</i>	NM 002524	1p13.2
<i>PHF6</i>	NM 001015877	Xq26.2
<i>PPM1D</i>	NM 003620	17q23.2
<i>PTEN</i>	NM 000314	10q23.31
<i>PTPN11</i>	NM 002834	12q24.13
<i>RAD21</i>	NM 006265	8q24.11
<i>RHOA</i>	NM 001664	3p21.31
<i>RIT1</i>	NM 006912	1q22
<i>RUNX1</i>	NM 001754	21q22.12
<i>SETBP1</i>	NM 015559	18q12.3
<i>SF3B1</i>	NM 012433	2q33.1
<i>SH2B3</i>	NM 005475	12q24.12
<i>SRSF2</i>	NM 001195427	17q25.1
<i>STAG2</i>	NM 001042749	Xq25
<i>STAT3</i>	NM 139276	17q21.2
<i>TET2</i>	NM 001127208	4q24
<i>TP53</i>	NM 000546	17p13.1
<i>U2AF1</i>	NM 001025203	21q22.3
<i>WT1</i>	NM 024426	11p13
<i>ZRSR2</i>	NM 005089	Xp22.2

*NF1*, *EZH2*, *EED* and *SUZ12* were sequenced as previously described (18,19)

- Bio-informatics analysis of sequencing data

Base calls were generated by the Torrent Suite™ Software (v. 5.6) using the included variant caller with an additional plug-in (Life Technologies). The .bam and .vcf files were used for analysis. Detection of single nucleotide variations (SNVs) and short insertions/deletions from the BAM files was performed using the Torrent Suite Variant Caller (TSVC) plugin from the Torrent Suite Software v5.0.4 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, US). The .vcf files were annotated with the Ion reporter software (Life Technologies) and processed for a second analysis of the indexed files using the NextGENe software (Softgenetics, State College, PA). Results were compared to select abnormalities that will be further considered. Filtered candidate variants listed in TSVC files were then annotated, ranked, and interpreted using the Polydiag suite (Bioinformatics Department, Paris-Descartes University). Moreover, aligned reads from BAM files were visualized using the Integrative Genomics Viewer v2.3 from the Broad Institute (Cambridge, MA, USA). Assessment of variants implication was performed based on population databases (dbSNP and GnomAD), mutation databases (COSMIC), and predictions software (Alamut, mutation taster, OncoKB, and Cancer Genome Interpreter).

### **Fluorescence in situ hybridization (FISH)**

Dual color FISH experiments were performed using a XL TP53/NF1 D-5089-100-OG probe (Metasystems probes, Altlußheim, Germany), targeting a 167 kb region of TP53 (probe labeled with Rhodamine-dUTP) and a 312 kb region of NF1 (probe labeled with FITC-dUTP). Hybridization was

performed as described previously (20). The images were captured by a CCD camera fixed on a BX61 microscope (Olympus, Rungis, France), and processed with a Case data Manager 6.0 software (Applied Spectral Imaging).

### **RT-qPCR**

RNA quality was evaluated with a Bioanalyzer 2100 (using Agilent RNA6000 nano chip kit). RNA was and retrotranscribed into cDNA. qPCR was performed using SYBR Green I master mix on LC480 (Roche, Bale, Swiss). Used primer sequences were:

- UBC: forward (fw) TGCCTTGACATTCTCGATGGT, reverse (rev) ATTTGGGTCGCAGTTCTTG
- ACT: fw GGGTCAGAAGGATTCTATG, rev GGTCTCAAACATGATCTGGG
- B2M fw CCACTGAAAAAGATGAGTATGCCT, rev CAAACCTCCATGATGCTGCTTACA
- NF1 fw TGTGGAGCACCCAGCAAT, rev TTTCGGGCCCTGTTTTCTT

For quantification, CP values were used to calculate the normalized ratio quantities (NRQ) according to the formula:  $NRQ = RQ/NF$  ( $RQ: E^{\Delta CP}$ ;  $\Delta CP$ : difference between the CP of the gene of interest and the mean CP of this gene in all samples; E: primer efficacy; NF: mean RQ of the reference genes). Results were expressed as NRQ to reference genes B2M, UBC and ACTB.

### **Cell lines and reagents**

We used the TF-1 and UT-7 human AML cell lines, which were identified by PCR-single-locus-technology (Promega, PowerPlex21 PCR Kit, Eurofins Genomics). HuH6 cell line was a kind gift of Dr. P. Bossard (Inserm U1016 - Cnrs UMR8104). Cells were cultured in RPMI 1640 medium (Gibco 61870; Life Technologies, Saint Aubin, France) supplemented with 10% FCS, 2 mM glutamine (Gibco 25030; Life Technologies, Saint Aubin, France), 100 IU/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Gibco 15140; Life Technologies, Saint Aubin, France) at 37°C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. TF-1 cells were cultured with 5ng/mL of human GM-CSF (130-093-866, Miltenyi Biotec, Paris, France). BaF/3 cells were cultured with IL-3 provided by a conditioned medium harvested from cultured WEHI-3 cells (21). UT-7 cells were cultured with 2 IU/mL EPO (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Trametinib (GSK1120212) was purchased from Selleck chemicals LLC (Houston, USA) and Pyrvinium pamoate (P0027) was from Sigma Aldrich-Chimie (Saint Quentin Fallavier, France). The target selective inhibitor library (L3500) used for the first chemical screen was obtained from Selleck chemicals LLC (Houston, USA). Chemical compounds for the repurposing screen were purchased from Prestwick Chemicals V3 (a unique collection of 1,280 small molecules, mostly approved drugs FDA, EMA and other agencies) and obtained in Dimethyl Sulfoxide (DMSO) as 10 mM stock solution.

## Constructs

### CRISPR/Cas9

Human and murine NF1-targeting guide RNA were designed using the Optimized Crispr Design application from the laboratory of Dr Feng Zhang (<http://crispr.mit.edu/>, no longer available) as previously described (17). The sequences used were:

- human NF1-1 construct: fw=CACCGTTGTGCTCAGTACTGACTT  
rev=AAACAAGTCAGTACTGAGCACAAC
- human NF1-2 construct: fw=CACCGAGTCAGTACTGAGCACAACA  
rev=AAACTGTTGTGCTCAGTACTGACTC
- human control (CTR) construct: fw=CACCGTAGGCGCGCCGCTCTCTAC  
rev=AAACGTAGAGAGCGGCGCGCCTAC
- mouse NF1-1.3 construct: fw=CACCGCTCGTGAAGCGGCTGACCA  
rev=AAACTGGTCAGCCGCTTCGACGAGC
- mouse NF1-42.8 construct: fw=CACCGCAGATGAGCCGCCACATCGA  
rev=AAACTCGATGTGGCGGCTCATCTGC

The human guides were then cloned into the plentiCRISPRv1 puromycin plasmid (#49535 no longer available, Addgene) (22) while the murine guides were cloned into the plentiCRISPRV2 mCherry plasmid (LentiCRISPRv2-mCherry was a gift from Agata Smogorzewska (Addgene plasmid # 99154 ; <http://n2t.net/addgene:99154> ; RRID:Addgene\_99154).

### NRAS G12D

Hs NRAS G12D in pDonor-255 (Hs.NRAS G12D was a gift from Dominic Esposito (Addgene plasmid # 83176; <http://n2t.net/addgene:83176> ; RRID:Addgene\_83176 ) was cloned into the plenti PGK puro DEST (pLenti PGK Puro DEST (w529-2) was a gift from Eric Campeau & Paul Kaufman (Addgene plasmid # 19068 ; <http://n2t.net/addgene:19068> ; RRID:Addgene\_19068) (23)) using the Gateway system (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

### **Lentivirus production and cell line infections**

Lentivirus production and cell line infections were done as previously described (24). Briefly, we used 293-T packaging cells to produce all of the constructed recombinant lentivirus through co-transfection of these cells with the packaging plasmids pMD2.G and psPAX2 encoding lentiviral proteins (Gag, Pol, and Env) using Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, US). Supernatants were collected and ultracentrifuged for 48 h after transfection over two consecutive days, and then stored at -80°C. AML cell lines were seeded at  $2 \times 10^6$ /ml and 10 $\mu$ l of lentiviral supernatants were added for 24h. Cells were further selected with puromycin, or cell sorted with an ARIA 3 cytometer in case of GFP or mCherry expression as selection marker.



### **Immunoblots**

Cells were lysed in 100 $\mu$ L 1X Laemmli buffer [62.5 mM Tris HCl pH 6.7, 10% glycerol, 2% sodium dodecylsulfate (SDS), 24 mM dithiotreitol (DTT), 2 mM Vanadate, bromophenol blue], heated at 90°C for 5 min and resolved by SDS-polyacrylamide gels electrophoresis, transferred to nitrocellulose membranes, and probed with primary antibodies. Protein signals were revealed by chemoluminescence (ECL, Bio-Rad, Marnes la coquette, France) and detected using a CCD camera (LAS 3000 Fujifilm, Tokyo, Japan). Primary antibodies used were directed against:  $\beta$ -actin (#A1978, Sigma Aldrich, Saint-Louis, Missouri, US), HSC70 (#7298, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, US); phospho-AKT T308 (#4056, Cell Signaling Technology (CST), Danvers, Massachusetts, US), phospho-ERK 1/2 T202-Y204 (#4377, CST, Danvers, Massachusetts, US), phospho-STAT5 Y694 (#9351, CST, Danvers, Massachusetts, US), NF1 (#14623, CST, Danvers, Massachusetts, US), RAS (#05-016, Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, US), PI3K p85 $\alpha$  (#423, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, US), clived Caspase 3 (#9661, CST, Danvers, Massachusetts, US), PARP (#9542, CST, Danvers, Massachusetts, US).

### **RAS pull down assay**

RAS activity was assessed by a GST-RAF1-RBD pull down assay according to manufacturer's instruction (17-218, Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, US). Briefly, 5x10<sup>7</sup> cells were lysed and active RAS was pulled down after interaction with a RAF1-RBD motif conjugated with agarose beads. Beads were then solubilized in Laemmli buffer and RAS detection – proportional to its activity unraveled by the RAS-RAF interaction – was performed by immunoblotting.

### **Trypan Blue dye exclusion assay**

The Trypan Blue dye (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) exclusion assay was used to determine the number of viable cells present in the cell suspension. A Malassez counting chamber was filled with the cell suspension mixed with the dye. Cells were then visually examined and counted under a microscope: cells taking up the dye were considered dead and cells excluding the dye were considered alive.

### **Contact-free cell co-culture**

TF1 NF1-1 and TF-1 NF1-2 cells were seeded at 3 x 10<sup>5</sup>/mL without GM-CSF. The next day, Corning transwells (Merck, Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, US) were inserted on the top of milieu alone well (control), NF1-1 and NF1-2 TF-1 cells wells, and filled with TF-1 CTR cells in the absence of GM-CSF. Trypan blue exclusion assays were carried out on days 1, 2, 3 and 6.

### **Gene expression profiling**

RNA quality was evaluated with a Bioanalyzer 2100 (using Agilent RNA6000 nano chip kit), and 100 ng of total RNA was reverse transcribed using the GeneChip® WT Plus Reagent Kit according to the manufacturer's instructions (Affymetrix, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, US). Briefly, double strand cDNA was used for in vitro transcription with T7 RNA polymerase and 5.5µg of Sens Target DNA were fragmented and labelled with biotin. The cDNA were then hybridized to GeneChip® Clariom S Human (Affymetrix, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, US) at 45°C for 17 hours, then washed on the fluidic station FS450 (Affymetrix, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, US), and scanned using the GCS3000 7G (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, US). Scanned images were then analyzed with Expression Console software (Affymetrix, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, US) to obtain raw data (.cel files) and metrics for quality controls. Raw fluorescence intensity values were normalized using Robust Multi-array Average (RMA) algorithm in R to generate the normalized data matrix by performing background correction, quantile normalization and log2 transformation of raw fluorescence intensity values of each gene. All quality controls and statistics were performed using Partek® Genomics Suite software (Partek, St. Louis, MO, USA). Data were normalized using custom brainarray CDF files (v20 ENTREZG). To identify differentially expressed genes, we applied a classical analysis of variance (ANOVA) with a FDR permutation-base for each gene. We created a new matrix with only the significant ANOVA site and performed Z-scoring of rows. Hierarchical clustering by Pearson's dissimilarity and average linkage and principal components analysis (PCA) were conducted in an unsupervised fashion to control for experimental bias or outlier samples. We set a filter for those genes that displayed at least a  $\geq 1,5$  or  $\leq -1,5$  fold difference in expression between groups and achieved an FDR of  $<0.05$ . Data were then interrogated for evidence of biologic pathway dysregulation using Gene set enrichment analysis (GSEA, Broad Institute). Enrichment rates were considered significant when the P-value  $<0.05$  and the FDR  $\leq 0.1$ .

### **TF-1 differentiation**

Cells were washed 3 times in PBS to remove GM-CSF, and then cultured 7 days with 2 IU/mL EPO. Cells were spin down to collect pellets in which color change from white to purple reflected hemoglobinization.

### **Cell line derived Xenografts experiments**

Cell line derived Xenografts experiments were done as previously described (25). All animal studies were conducted in accordance with the guidelines of the Association for Assessment and Accreditation

of Laboratory Animal Care International and with approval of the local ethics committee, as reported (21). Adult NSG mice (6–8 weeks old) were treated with 20 mg/kg busulfan (Busilvex, Pierre Fabre, France) by intraperitoneal administration 24 h before injection of leukemic cells. TF-1 AML cell lines were washed twice in PBS and cleared of aggregates and debris and suspended in PBS at a final concentration of  $2 \times 10^6$  cells in 200  $\mu$ l of PBS per mouse. AML cells were xenografted in the tail vein of mice. In some experiments, mice were treated with 0.5 mg/kg/d Trametinib per oral gavage in corn oil containing 4% final volume of DMSO 5/7 days since day 8 post graft, or with vehicle. Daily monitoring of mice determined the time of killing (usually ruffled coat, hunched back, weakness and reduced motility).

### **Immunohistochemistry**

Femurs, tibias and spleens of mice were fixed for 24h in 4% paraformaldehyde. Decalcification was carried out using 15% formic acid at 4°C for 4h, followed by a second fixation in 4% paraformaldehyde during 24h. Samples were paraffin embedded and then sliced using a microtome. Four  $\mu$ m thick serial sections were analyzed by immunohistochemistry using anti-phospho-ERK antibody (#4370, CST, Danvers, Massachusetts, US) with Immunohistochemistry Application Solutions Kit (Rabbit) (#13079, CST, Danvers, Massachusetts, US) according to the manufacturer's instructions. For antigen retrieval, slides were heated in citrate buffer (10mM sodium citrate buffer pH 6,0) for 10 min. Primary antibodies were used at the dilution 1/200, in antibody diluent (#8112, CST, Danvers, Massachusetts, US) for anti- phospho-ERK antibody (#4370, CST, Danvers, Massachusetts, US) and incubated over night at 4°C. Detection of primary antibodies was carried out using the Signal Stain Boost IHC Detection Reagent (#8114, CST, Danvers, Massachusetts, US) and Signal Stain DAB Substrate (#8059, CST, Danvers, Massachusetts, US) based on conversion of diaminobenzidine to a dye with multimeric horseradish peroxidase (HRP). Sections were counterstain with Hematoxylin. Images were acquired and processed using the slide scanner and software Zeiss Axioscan.Z1 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany).

### **Cell viability assays**

#### Uptiblue

Cells were seeded in 100  $\mu$ l of culture medium for 48 hours. Cell density was different between cell lines ( $2 \times 10^5$ /ml) and primary samples ( $10^7$ /ml) due to differences in metabolic activities and proliferation rates, which significantly influenced signal detection. The UptiBlue viable cell-counting reagent (Interchim, Montluçon, France) was then added for 4 hours and fluorescence was measured with a Typhoon 8600 scanner (GE Healthcare Bio-Sciences, Buc, France).

### CellTiter-Glo 2.0 Assay

A robot distributed 25µl of the CellTiter-Glo 2.0 Assay reagent (Promega Inc., Madison, USA) in each well containing cells of a 384-well plate. The contents were mixed for 2 minutes at 300 rpm on an orbital shaker (Titramax 100, Dutscher, Issy-les-moulineaux, France) and plates were incubated for 10 minutes at room temperature to stabilize luminescent signals. Units of luminescent signal generated by a thermo-stable luciferase are proportional to the amount of ATP presented in viable cells. Luminescence was recorded using a CLARIOStar (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) reader at a gain of 3600.

### **Flow cytometry**

Apoptosis was measured using Alexa fluor 647-coupled annexin V (#A23204, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, US). Data were generated on an LSRFortessa apparatus (BD Biosciences, le pont de claix, France) and analyzed using Kaluza software (Beckman Coulter, Miami, FL).

### **Target selective inhibitor library screen**

We used the target selective inhibitor library solubilized in DMSO at a final concentration of 10µM distributed in 96 wells plates to screen TF-1 CTR, NF1-1 and NF1-2 cells using the uptiblu cell viability reagent as described above. This screen was performed three times separately. After background noise subtraction, outliers were removed, and data were normalized and presented as a percentage of the conditions incubated with the vehicle (DMSO).

### **Prestwick chemical library® (PCL) screen**

Cells were seeded in 384-well plates (ViewPlate-384 Black - Perkin Elmer, ref. 6007460) using a MultiDrop combi (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, US), in 40 µL of cell media at 37°C for 24h. Cells densities per well were determined as follows:  $5 \times 10^3$  for TF-1 CTR and TF-1 NF1-1 and  $6 \times 10^3$  for TF-1 NF1-2 using T4 Cellometer (Nexcelom).

### Primary screening

We used the 1280 compounds of the PCL at 10µM (in 0.5% DMSO) delivered to the using the MultiChannel Arm™ 384 (MCA 384) (TECAN, Männedorf, Swiss). The plates were incubated 72h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> before assaying cell viability using the CellTiter Glo® reagent and luminescence detection as described above.

### Secondary screening

We selected the top 60 hits from our primary screen to perform a set of dose-range experiments using the same workflow. We performed three independent experiments using 8 consecutive three-fold dilutions from  $10^{-6}$ M to  $4.57 \times 10^{-9}$ M. Both primary and secondary screens were performed on the

same batches of viably frozen cells and at the same passage stage (four passages from thawing). We used the CellTiter-Glo 2.0 Assay kit (Promega Inc., Madison, USA) to assess cell viability.

#### Data processing

Values of all plates were visually inspected for systematic bias (i.e., edge effects). Measurements data were analyzed using software developed by the Biophenics platform (Curie Institute, Paris, France). For hit identification, we use the robust Z-score method under the assumption that most compounds are inactive and can serve as controls (26,27). In order to correct for plate positional effects, an automated iterative median filtering was developed. Luminescence intensity raw values were first log<sub>2</sub> transformed to make the data more symmetric and close to a normal distribution. Next, median polishing (27) was applied to progressively corrects columns, rows, and entire plates by subtracting their median, repeating until convergence of values. In our implementation, column and row corrections were computed separately for replicates, but across all plates within the replicate in combination. Hits for each compound were identified as follows: sample median and median absolute deviation (MAD) were calculated from the population of screening data points (named as sample) and used to compute robust Z-scores (Iglewicz and Hoaglin, 1993) according to the formula:

$$"RZ\text{-score}" = (x - \text{sample median}) / (1.4826 \times MAD)$$

where x corresponds to the drug-treated data point and MAD is the median of the absolute deviation from the median of the tested wells. A compound was identified as a hit if the RZ-score was < -2 or > 2 pointing in the same direction in both replicates. Compounds having a RZ-score < -2 corresponds to those considered reducing cell viability. The same analysis pipeline was applied to each cell lines tested. Final values correspond to the mean RZ-score for each compound.

In dose-range experiments, compound activity was normalized on a per-plate basis by dividing the value in each well by the median value of the control wells (100% cell viability). For each compound, a four parameters log-logistic model was then fitted on the pooled replicate data with the R package drc (28). Compound activity was then summarized by computing a Drug Sensitivity Score (DSS, modified from (29)), the area under the curve normalized by the area of an inactive compound (100% viability at all doses). Finally, we scored these compounds by calculating their ED<sub>50</sub> x DSS value and we focused on the top-10 compounds among which were cytarabine and daunorubicin.

#### **Mitostress analysis**

Oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) were measured using a Seahorse XF96 extracellular flux analyzer (Seahorse Bioscience, North Billerica, MA, USA), as reported (30). Briefly,  $1.5 \times 10^5$  cells were seeded in 96-well XF96 well plates coated with BD Cell-Tak (Becton Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) and loaded with XF Dulbecco's Modified Eagle's Medium. After 1 h incubation at 37 °C without CO<sub>2</sub>, cells were transferred to the XF96 analyzer, and

OCR and ECAR were measured. Oligomycin (1 $\mu$ M) was added after 20 min, followed by FCCP (2 $\mu$ M) after 40 min and Antimycin A/Rotenone (1 $\mu$ M) after 59 min.

### **Wnt reporter activity assay**

HuH6 cells were seeded at  $3 \times 10^5$  in 100 $\mu$ L and TF-1 cells (CTR, NF1-1, NF1-2 and NRAS<sup>G12D</sup>) at  $10^6$  in 100  $\mu$ L and incubated without or with 250 or 2500nM pyrvinium pamoate for 16h. Then, cells were transfected with the TCL/LEF-Firefly luciferase and Renilla luciferase expression vectors, as reported (31) using Lipofectamine 3000 reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, US) according to manufacturer's instructions. Cells were collected 16h after transfection and luciferase activity was measured using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Charbonnières-les-bains, France) and a Clariostar plus microplate reader (BMG Labtech, Ortenberg).

### **Leukemia colony forming units (CFU-L) assay**

CFU-L assays were performed as previously described (32). Briefly, AML cells were seeded at  $10^6$ /ml in H4230 medium (StemCell Technologies, Vancouver, Canada) supplemented with 10% of conditioned medium harvested from cultured 5637 cells. At day 7, CFU-L (colony of > 20 cells) were scored under an inverted microscope.

### **Synergistic cell viability assays**

We performed dose-range experiments of trametinib and pyrvinium single-agents or combination and assessed cell viability after 48h using the uptiblue reagent. We used the SynergyFinder online software to calculate synergy scores computed using the zero interaction potency (ZIP) model (33). All experiments were done three times separately and pooled data were analyzed.

### **Statistics**

Differences between the mean values obtained for the experimental groups were analyzed using the two-tailed Student's t test or a Mann-Whitney test in case of non-parametric data. Two by two comparisons between colonies ratio of matched-pairs samples were made by using a Wilcoxon matched-pairs signed rank test. Statistical analysis of categorical variables was performed using the Chi-2 test or the Fisher exact test in case of non-parametric data. Survival curves analysis was performed using Log Rank (Mantel Cox) test. Statistical analyses were performed using Prism software 8.1.1 (GraphPad). Vertical bars indicate standard deviations. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

## Results

### RAS pathway gene mutations landscape in AML.

We performed next-generation sequencing (NGS) in genomic DNA samples from 127 AML patients for a panel of genes whose variants are associated with genetic inherited syndromes characterized by RAS activation, referred to as RASopathies, and also mutated in cancer (Figure 1A) (9,34). To focus on AML cases with unmet need for new efficient therapies, we excluded patients with favorable cytogenetic features, harboring t(8;21), inv(16) or t(15;17) abnormalities, as well as those with *CEBPA* biallelic mutations (Supplemental Figures 1A-B-C). Moreover, on an analysis of the Cancer Genome Atlas (TCGA) data, *FLT3* mutations appeared exclusive from RAS pathway mutations, and *FLT3*-mutated cases were excluded from our cohort (Supplemental Figures 1A-B-C). While associated with RAS mutations in 30% of AML cases (Supplemental Figure 1A), we excluded cases with *NPM1* mutations as associated with a seemingly favorable prognosis when co-occurring with RAS mutations (7,35). Based on TCGA data, we retained for RASopathy NGS analysis approximately 46% of all AML cases (Supplemental Figure 1B).

Our initial cohort was constituted of 140 AML patients, including 127 cases and 13 controls (inv(16), N=3; t(8;21), N=3; *NPM1/FLT3-ITD*, N=6; *NPM1*, N=1) (Supplemental Figure 1C). We applied our NGS RASopathy panel to these 140 samples and sequencing data were available in 135 (Supplemental Figure 1D, technical failure occurred in five cases, *NRAS* and *KRAS* genes were sequenced using the Sanger method in two cases). *NF1* and polycomb repressor 2 (PRC2) members (*SUZ12*, *EZH2*, *EED*) genes were sequenced using a dedicated NGS panel, and copy number variations (CNVs) were assessed to detect deletions (Missing data in 12 cases, Figures 1A and Supplemental 1D). Moreover, deletions at the *NF1* locus were controlled by fluorescent in situ hybridization (FISH) in 104 samples (Supplemental Figure 1E).

We detected at least one RAS pathway gene alteration in 50 (40%) AML samples from our 127 cases (Figure 1A, Supplemental Figure 1D). *NF1* mutations/deletions were found in 17 cases (14.8%), while *NRAS*, *KRAS*, *PTPN11*, *CBL* and *BRAF* were detected in 13 (10.4%), 10 (8%), 9 (7.2%), 5 (4%) and 2 (1.6%) cases, respectively (Figure 1B, left panel). *RAF1*, *RASA1*, *SOS1* and *MAP2K2* mutations were detected in a single case each in our cohort (Figure 1B, left panel). Patients with RAS pathway mutations harbored slightly more adverse cytogenetic feature and adverse ELN scores (Figure 1B, middle panels). *NF1* alterations were 3 missense mutations, 3 frameshift mutations, one splice-site mutation, and 11 deletions including three only detected by FISH (Supplemental Figure 1E). One patient had a *NF1* mutation associated with a *NF1* deletion. These alterations were more frequently detected in complex karyotype samples (57% of *NF1*-mutated and 90% of *NF1*-deleted cases, data not shown). Genes encoding members of the histone methyl transferase polycomb repressor complex 2 (PRC2) are

frequently subject to loss of function mutations in *NF1*-altered tumors such as juvenile myelomonocytic leukemia (JMML) and malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNSTs)(18,36). Similarly, we observed in *NF1*-altered, an increased prevalence of deletions/mutations of *SUZ12*, *EZH2* and *EED* genes (Figure 1A and Supplemental Figures 1F-G).

We observed a co-occurrence of RAS pathway mutations in nine samples, mostly concerning *NRAS*, *KRAS* and *PTPN11* (Figure 1B, right panel). For two of these samples, hypothesis concerning their clonal architecture may be proposed (Figure 1C). In sample #50, two different variants of *PTPN11* (G503V and D61Y) were detected at a similar variant allele frequency (VAF, 21% and 18%, respectively) along with del(9q) karyotype, and *DNMT3A* and *KDM6A* mutations at a 91% and 100% VAFs, respectively. These data suggested the occurrence of either two different *PTPN11* subclones, or a single clone with two *PTPN11* variants inside the main *KDM6A/DNMT3A* clone (Figure 1C). Sample #155 is of particular interest, as six different *RAS*-mutated subclones (five different *NRAS* and one *KRAS* mutations) were detected at low VAFs inside a large *STAG2/GATA2/RUNX1* clone, supporting the notion of clonal interference in this sample, as reported in a significant fraction of *RAS*-mutated t(8;21) and inv(16) AML (Figure 1C). In the remaining cases for which a clonal architecture may be proposed, RAS pathway mutations may have occurred within the dominant clone (samples #56, #201 and #183), or lately as subclones (sample #24). These data suggested that RAS pathway mutations may be present in the main clone, or may occur lately as subclonal events in the course of AML oncogenesis.

Together our data describe the repartition of RAS pathway mutations in a large focused cohort of AML patients without actionable therapeutic target.

### **Prognostic impact of RAS pathway gene mutations in AML.**

The prognostic value of RAS pathway alterations considered as a whole has not been evaluated in AML. From our main cohort, we retained for analysis a homogeneous group of 91 patients intensively treated with cytarabine plus anthracyclin-based induction chemotherapy (Supplemental Figure 1C).

While gender and age, as well as the proportion of secondary AML were similar between RAS pathway mutated and other cases, patients with RAS mutations had a significantly higher white blood cell count (WBC), percentage of blood- and bone marrow-infiltrating blast cells and lactate dehydrogenase (LDH) levels (Table 1). Notably, both groups had the same proportion of refractory disease and completion of allogenic hematopoietic stem cell transplantation (Table 1). These data suggested that RAS pathway altered AML cells had higher proliferation capacities in patients.

Among this cohort, survival proportions were concordant with other series (37), and widely used prognostic markers including Medical Research Council (MRC) cytogenetic categories and ELN score discriminate the patients as reported (Supplemental Figures 2A-C). When considering the whole cohort, the detection of RAS pathway mutations correlated with a reduced overall survival probability,



while having no impact on progression-free survival (Figure 2A). Focusing on ELN intermediate patients, RAS pathway mutations were predictive of reduced progression-free and overall survival probabilities, in contrast to our observations for the ELN adverse group (Figure 2B Supplemental Figure 2D). The adverse prognostic of RAS pathway alterations was not observed in our analysis of the TCGA and BEAT AML databases, in which however fewer RAS-related abnormalities were detected (Supplemental Figures 2F-G). While not correlated to survival considering the whole cohort (data not shown), NRASG12/Q61R mutations had a near significant correlation with a better survival probability compared to other RAS pathway alterations, which was not found with KRAS or PTPN11 mutations ( $p=0.055$ , Supplemental Figure 2H).

We further hypothesized that *NF1* gene expression may represent a clinically relevant variable. We evaluated *NF1* mRNA abundance by quantitative PCR in 54 AML samples, and observed variable levels of *NF1* expression with a mean expression of 1.27 (range: 0.11 – 4.42, Supplemental Figure 2I). Among these cases, 34 were homogeneously treated by intensive chemotherapy and displayed a similar *NF1* gene expression pattern (Supplemental Figure 2I). While low and high *NF1*-expressing patients had similar survival proportions overall, low *NF1* expression significantly discriminated a subgroup of patients with reduced survival among the RAS pathway mutated cases (Figure 2C and Supplemental Figure 2J).

These data suggested that RAS pathway alterations were associated with increased proliferation potential, and correlated with reduced survival probability in AML, particularly within the ELN intermediate group.

### **Development and characterization of AML cell line models of RAS activation.**

We used cytokine-dependent cell lines to establish the oncogenic potential of RAS pathway genetic modifications (38,39). TF-1 and UT-7 are human AML cell line requiring granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) or erythropoietin (EPO), respectively, to proliferate and survive *in vitro*. The Ba/F3 murine cell line established from normal pro-B cells is dependent on interleukine-3 (IL3) (40,41). After cytokine starvation, parental cell lines undergo cell cycle arrest and apoptosis, while cells modified with an oncogenic signal exponentially grow in the absence of cytokines (Figure 3A).

First, we used *NF1*-targeting CRISPR/Cas9 to deplete TF-1, Ba/F3 and UT-7 cell lines from neurofibromin. After lentiviral transduction, cell lines were starved from cytokines and while the control-transduced cells declined within a week, CRISPR-modified cells grew readily from a bulk population, in contrast to control cells (data not shown). *NF1* knockdown was clearly observed in TF-1 and Ba/F3 cells, but not in UT-7 cells having a low-to-no *NF1* baseline protein detection (Figure 3B and Supplemental Figure 3A). Moreover, an increased ERK phosphorylation attested for RAS activation in *NF1* CRISPR cells compared to controls (CTR) in all three cell lines, which was confirmed by RAS-RAF1

pulldown assays (Figure 3B and Supplemental Figure 3A). We also transduced TF-1 and Ba/F3 cells with a vector allowing the expression of *NRAS*<sup>G12D</sup>, which also strongly induced RAS activity and ERK phosphorylation (Figure 3B).

We performed a gene expression-profiling assay in NF1 knockdown TF-1 cells, compared to CTR TF-1 cells (labelled NF1<sup>KD</sup> and NF1<sup>WT</sup>, respectively), after 6h of GM-CSF starvation. Using gene set enrichment analysis (GSEA) (42,43), number of RAS-related gene sets were scored among the most significant normalized enrichment scores in NF1-depleted cells (Figure 3C), which confirmed the strong activation of RAS pathways achieved by *NF1* knockdown in these cells. Moreover, we took advantage of the EPO-induced differentiation capacity of TF-1 cells (44), and observed a marked hemoglobinization of CTR cells – a hallmark of erythroid differentiation – which was absent in *NF1* knockdown cells in long-term culture with EPO, suggesting that RAS activation blocked the differentiation program to favor proliferation in NF1-depleted cells (Figure 3D). These data showed that NF1 depletion induced a strong RAS activation signature in TF-1 cells.

We observed that cytokine starvation allowed the continuous growth of *NF1* knockdown TF-1, Ba/F3 and UT-7 cells, as well as TF-1 and Ba/F3 expressing *NRAS*<sup>G12D</sup>, which contrasted with the absence of proliferation in control cell lines upon starvation (Figure 3E and Supplemental Figure 3B). To exclude an autocrine production of pro-survival cytokines in RAS-activated cells, we performed contact-free cell co-culture experiments, in which TF-1 CTR cells were cultured alone, or with GM-CSF-free TF-1 NF1-1 or TF-1 NF1-2 cells. As TF-1 CTR cells showed no proliferation when exposed to cytokines produced by *NF1* knockdown cell (Supplemental Figure 3C), we concluded that the cytokine-independent capacities acquired upon NF1 depletion were not related to an autocrine/paracrine cytokine production but rather due to a cell-autonomous program driven by RAS activation.

We performed cell-line derived xenografts (CLDX) in NOD/SCID gamma-null (NSG) mice using TF-1-derived NF1-1, NF1-2 and CTR cell lines. Xenografted mice experienced AML-related symptoms within a median time of 28 days, 43 days and 76 days for NF1-1, NF1-2 and CTR groups, respectively ( $p < 0.001$  for comparison between NF1-depleted and control cells, Figure 3F). Leukemic cells mostly propagated into the bone marrow (Figure 3G), and also had a mild bloodstream diffusion (data not shown). Moreover, staining of bone marrow sections showed an increased ERK phosphorylation in mice transplanted with *NF1* knockdown cells, in agreement with our *in vitro* observations (Figure 3G). Together these results suggest that *NF1* genetic disruption and *NRAS*<sup>G12D</sup> expression represent robust models for RAS/MAPK activation in AML.

### Activity of MEK inhibitors on RAS pathway-mutated AML.

We used the 592 compounds target selective inhibitor library (Selleck chemicals) mostly comprising kinase inhibitors to screen modified TF-1 cells at a 10 $\mu$ M concentration for each molecule. Strikingly, *NF1* knockdown cells (NF1-1 and NF1-2 cell lines, cultured without GM-CSF) were more sensitive to MEK inhibitors compared to control cells (cultured with GM-CSF), while these cells were equally sensitive to p38 inhibitors (Figure 4A and Supplemental Figures 4A-B). While not included in the target inhibitor library, we further used the MEK inhibitor trametinib, currently developed in multiple clinical applications in oncology including in AML (13,45).

Dose-range experiments using three fold-dilutions of trametinib were carried out in RAS pathway activated TF-1, Ba/F3 and UT-7 cells, unambiguously showing that RAS activation correlated to a marked enhancement of trametinib cytotoxicity compared to isogenic control cells (Figure 4B and Supplemental Figures 4C-D). In TF-1 cells, trametinib markedly inhibited ERK phosphorylation since 0.5h incubation, without affecting RAS activation (Figure 4C). Moreover, trametinib-induced cytotoxicity was associated with apoptosis induction, as shown by PARP and caspase-3 cleavage, and increased flow cytometry annexin V staining in *NF1* knockdown TF-1 cells (Figure 4D and Supplemental Figure 4D). In another CLDX assay using a *NF1*-depleted TF-1 cell line, we observed that trametinib, given daily by oral gavage starting day 8 after transplant significantly prolonged mice survival (Figure 4E). From mice sacrificed 18 days after trametinib or vehicle onset, we showed that trametinib readily reached its target in vivo, as ERK phosphorylation was inhibited in bone marrow leukemic cells (Figure 4F). Together these data suggested that RAS activation induced an oncogenic addiction state, unmasking an exquisite sensitivity to the MEK inhibitor trametinib.

We performed colony-forming unit-leukemia (CFU-L) assays in 39 primary samples of AML patients from our cohort, incubated with vehicle or 50nM trametinib, which significantly reduced the absolute number of CFU-L ( $p= 0.0021$ , Figure 4G, left panel). Focusing on RAS pathway mutated samples, we observed that *NRAS*<sup>G12</sup> and *NRAS*<sup>Q61R</sup> mutated samples had a dramatic reduction of CFU-L formation in the presence of trametinib compared to other mutations (mostly *KRAS* and *PTPN11* mutations) (Figure 4G, right panel). However, no difference in the formation of CFU-L was observed between *NRAS*<sup>G12</sup> and *NRAS*<sup>Q61R</sup> samples and those without RAS pathway mutation (Figure 4G, right panel). From the BEAT AML database (46), we extracted cases matching with our patient's cohort by applying the same filters (Supplemental Figure 1B). In contrast to the results of our CFU-L assays, we observed that RAS pathway mutated samples had a greater sensitivity to the MEK inhibitors trametinib and selumetinib compared to other samples in short-term liquid culture experiments, without significant difference between *NRAS*<sup>G12</sup>/*NRAS*<sup>Q61R</sup> and other RAS pathway mutated samples (Supplemental Figure 4E). Our results

suggested heterogeneous sensitivity to trametinib in CFU-L assays, with *NRAS*<sup>G12</sup>/*NRAS*<sup>Q61R</sup> mutated cases eliciting the best cytotoxic responses across RAS pathway mutated AML.

In fact, we treated an 84 years old woman for the transformation of a chronic myelomonocytic leukemia (CMML) to a *NRAS*<sup>G12A</sup>-mutated AML (Figure 4H, left panel). At the AML stage, she first received 2000mg daily hydroxycarbamide, which was switched for 2mg/d trametinib after three weeks due to limited efficacy and hematological toxicity. During ten days of trametinib therapy, her white blood cell count (WBC) and monocyte count were at their lowest values. After trametinib discontinuation due to neurological side effects, WBC and monocyte count markedly increased. A second course of trametinib again dramatically reduced leukocytosis, before the definitive discontinuation of this molecule due to neurological toxicity (Figure 4H, middle panel). Our patient unfortunately died from disease progression few days after therapeutic interruption. Interestingly, we observed a complete inhibition of ERK phosphorylation (Figure 4H, right panel), as well as a marked reduction of CFU-L formation (data not shown) with the leukemic cells from our patient incubated *ex vivo* with trametinib.

Collectively, these results suggested that RAS activated AML models were sensitive to the MEK inhibitor trametinib *in vitro* and *in vivo*, inhibiting ERK phosphorylation and promoting apoptosis. However, while of potential clinical interest, the activity of single agent trametinib appeared heterogeneous against AML patient samples.

### **Identification of pyrvinium pamoate as potential new agent in RAS pathway mutated AML.**

Building on our validated models of RAS activated AML, we performed a second pharmacological screen in a large library of 1280 FDA-approved molecules in a repurpose perspective (Figure 5A). A first screen was performed at 10  $\mu$ M for each compound in NF1 depleted TF-1 cell lines (NF1-1 and NF1-2). We selected 113 and 125 compounds having a RZ-score for cell growth inhibition  $\leq 5$  for NF1-1 and NF1-2 cell lines, respectively (Figure 5B). We further refined these hits by filtrating redundant compounds (in terms of chemical family and/or pharmacodynamics), and we performed dose-range experiments ( $10^{-6}$  to  $4.57 \times 10^{-9}$  M) on the same cell lines with the top-60 compounds. Based on median dose-effect (effective dose 50, ED50) and drug sensitivity score (DSS), we selected six compounds as having the strongest cytotoxic activity on NF1-depleted cells, within the same range than the two key AML chemotherapies cytarabine and daunorubicin (Figure 5C and Supplemental Figure 5A). We assessed the activity of these six compounds individually in RAS-activated TF-1 and Ba/F3 cells to focus on a quinolone-derived molecule, pyrvinium pamoate (Supplemental Figures 5A-B and data not shown).

In activated RAS-dependent Ba/F3 cells, a minimal model of oncogene dependency widely employed in drug screening (38,47), pyrvinium pamoate dramatically decreased viability in NF1-depleted and

*NRAS*<sup>G12D</sup> mutated cells, compared to control cells (Figure 5D). This RAS-dependent cytotoxicity was due to apoptosis induction, as shown in annexin V binding assays (Supplemental Figure 5C). In NF1 knockdown AML cell lines, pyrvinium pamoate demonstrated a strong cytotoxic activity, but without sharp differences compared to control cell lines, possibly due to a significant RAS activation in cytokine-supplemented control cells (Supplemental Figure 5D). In a panel of AML cell lines, pyrvinium pamoate generally demonstrated a greater cytotoxic potential in the presence of RAS pathway mutations (Supplemental Figure 5E). Together these results suggested that pyrvinium pamoate preferentially targeted RAS mutated cells.

We aimed at understanding the molecular targets of pyrvinium pamoate in AML. First, we observed that pyrvinium pamoate inhibited ERK phosphorylation in NF1-depleted Ba/F3 cells, while this effect was moderate in TF-1 cells (Supplemental Figure 5F). This discrepancy suggested that pyrvinium-induced cytotoxicity might not be a direct consequence of ERK/MAPK pathway inhibition. Pyrvinium pamoate may inhibit Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in some models (48,49). We performed TOP/FOP Wnt signaling reporter assays and observed a near absence of Wnt activity in CTR, NF1-1, NF1-2 and *NRAS*<sup>G12D</sup> TF-1 cells compared to the HUH-6 hepatoblastoma cell line (Supplemental Figure 5G, left panel). Moreover, pyrvinium pamoate did not significantly inhibited Wnt activity in HUH-6 cells, although a trend to dose-dependent inhibition was observed (Supplemental Figure 5G, right panel). We further assessed the potential impact of pyrvinium pamoate on mitochondrial respiration (Xiang Oncotarget 2015). We performed mitostress assays on NF1-depleted and *NRAS*<sup>G12D</sup> Ba/F3 cells, incubated without or with pyrvinium pamoate and observed a decrease in basal and maximal respiration in pyrvinium-treated cells (Figures 5E-F).

Altogether, agnostic screens identified pyrvinium pamoate as a preferentially cytotoxic drug in RAS-activated cells, potentially acting through mitochondrial respiration disruption.

### **Synergy between the MEK inhibitor trametinib and pyrvinium pamoate in RAS activated cells.**

While of potential therapeutic value, monotherapy by MEK inhibitor appeared to have a heterogeneous activity across RAS pathway mutated AML. Moreover, we learned from other models – particularly melanoma – that resistance mechanism acquisition to MEK inhibitors are common (14). Implementation of synergistic combinations with MEK inhibitors may thus represent an attractive therapeutic opportunity in RAS pathway mutated AML.

We thus combined trametinib and pyrvinium in dose-range cell viability assays in RAS-activated TF-1 and Ba/F3 cells. From cell viability crude data, we observed that trametinib and pyrvinium combination (combo) conditions had a markedly lower viability in RAS activated compared to control cells (Figure

6A). Moreover, we calculated that RAS-activated cells had higher synergy scores compared to control cells, although this was less pronounced in TF-1 than in Ba/F3 cells (Figure 6B). We performed similar short-term experiments in six RAS pathway mutated primary AML samples, and observed a synergy in four (Figure 6C).

Compared to experiments performed in short-term liquid culture conditions, CFU-L assays allow the assessment of compound activity during longer periods (7 to 10 days), and on less mature AML progenitor cell populations (50). We performed CFU-L assays in 12 primary AML samples harboring RAS pathway mutations, incubated with vehicle, 50nM trametinib, 250nM pyrvinium or trametinib and pyrvinium combination (combo). While trametinib had no overall influence on colonies formation in these selected samples – and even increased colonies number in four cases – a trend to reduced CFU-L was observed with pyrvinium (Figure 6D). Strikingly, a highly significant colonies formation inhibition was achieved by the combo compared to vehicle- or trametinib-treated cells (Figure 6D). Interestingly, most samples resistant to single agents were sensitive to the other agent and had a dramatic CFU-L formation inhibition with trametinib and pyrvinium combo (Figure 6E).

Experiments done in RAS-activated cell lines and primary AML samples thus suggested a robust synergistic activity of trametinib and pyrvinium with potential therapeutic applications.

## Discussion

RAS was the first oncogene identified in human cancers, and its implication in oncogenesis has been widely studied since then (8). While the genetic landscape of AML was solved these last few years, allowing the identification of molecular subgroups of patients with prognostic and/or therapeutic significance (7), RAS pathway mutations were barely considered as a particular entity. Recent studies unraveled frequent *NRAS* and *KRAS* mutations in core binding factors AML (CBFs, encompassing t(8;21) and inv(16) AML), and showed that the presence of RAS genes clonal interference discriminated between these seemingly good prognostic patients those having a reduced survival probability (51). Molecular mechanisms regulating the balance between activated RAS-GTP and inactive RAS-GDP are complex, involving multiple effectors such as protein kinases, scaffolding proteins, phosphatases, GAPs and GEFs (9). Mutations in genes encoding actors of this complex network are found in inherited genetic syndromes referred to as RASopathies genes (34). As somatic mutations of the same genes are reported in cancers, at a high frequency in the rare juvenile myelomonocytic leukemia (JMML), but also in as much as 25% of AML cases based on TCGA database (Supplemental Figure 1A), we aimed at specifically considering RAS pathway altered AML from a descriptive, prognostic, and preclinical modeling and therapeutic perspective.

To focus on AML with unmet therapeutic needs, we excluded from our cohort AML cases of the favorable ELN prognostic group (t(15;17), t(8;21), inv(16), bi-allelic *CEBPA*, and *NPM1* without *FLT3-ITD* mutations) (52). We also excluded *FLT3-ITD* cases due to mutual exclusion with RAS pathway mutations (Supplemental Figure 1A). From a large AML cohort, we identified at least one RAS pathway alteration in 40% of our cases, which was higher than expected based on TCGA and BEAT AML cohorts, possibly due to the greater depth of our targeted NGS panel (average depth of 875 reads per base) (10,52). The most prevalent alterations concerned *NF1*, *NRAS*, *KRAS* and *PTPN11*, but we also observed variants affecting *CBL*, *BRAF*, *RASA1*, *SOS1*, *MAP2K2* and *RAF1* genes. Consistent with previous studies, we did not detect mutation within RAS pathways negative regulators including *DUSP6*, *SPRED* and *SPRY* family members (10,52). We observed 5.5% *NF1* mutations, similar to previous studies (53–55), without cases harboring mutations at the potential Thr 676 hotspot reported by Eisfeld and colleagues (55). *NF1* deletions, mostly found in case of complex chromosomal abnormalities, but also as cryptic FISH- and/or NGS-detected deletions were also frequent (9.5%). Finally, we observed concurrent *NF1* and PRC2 members *EZH2*, *EED* and *SUZ12* alterations, as reported in JMML (36,56). Interestingly, PRC2 disruption was reported to promote RAS-regulated genes transcription, cooperating with *NF1* mutations in plexiform neurofibromas, glioma and melanoma (18). Moreover, Zhao and colleagues showed that concurrent *Spry4* (a negative regulator of RAS), *Nf1* and *Tp53* deletions – as found in human AML with complex karyotype – represent leukemia initiating events in mouse models due to the additional loss of negative feedback on RAS (57). We may thus hypothesize that PRC2 alterations may amplify RAS oncogenic signal in *NF1*-altered AML.

While *NRAS*, *KRAS*, *NF1* and *PTPN11* mutations are generally reported as secondary driver events in AML, we observed different scenario based on VAFs analysis in some of our cases (2,11,58). Indeed, these mutations may be present in the main clone, suggesting an implication in early phases of disease onset, or in subclones. Moreover, 25% of RAS pathway mutated samples harbored two or more alterations of RAS genes. These alterations may be part of a single clone, supporting a dose-dependent effect of oncogenic RAS mutations as described in JMML (36), or may represent different populations with inter-clonal interference (11,51). Single-cell analysis of informative cases would be of major interest to better characterize the implication of RAS pathway mutations in leukemogenesis.

The clinical implications of RAS pathway alterations has not been considered globally so far. Several groups reported that *NRAS* and/or *KRAS* mutations lack prognostic significance in AML (35,59–62), with the possible exception of *NRAS*, *DNMT3A* and *NPM1* co-mutated patients who may have favorable survival probabilities (7). Moreover, *NF1* mutations were associated with reduced survival probability among the adverse cytogenetic subgroup of AML (55,63). In agreement with these data, *NRAS* or *KRAS* mutations had no impact on survival in our cohort. However, when considering RAS pathway alterations as a whole, this subgroup had a significantly reduced survival probability,

particularly within the ELN intermediate prognostic group, in intensively treated AML patients. Interestingly, these mutations were significantly associated to increased leukemic cell proliferative markers including elevated white blood cell count, blast cell percentage and LDH levels. We also analyzed NF1 gene expression in a subset of our cases, and showed that low NF1 expression may correlate to a reduced survival probability among the RAS pathway alterations group, in agreement with the oncogenic cooperation observed between *NF1* alterations and RAS mutations in mice models and human diseases (36,64). For these patients harboring wildtype *NF1* alleles, other mechanisms may have accounted for NF1 downregulation such as promoter methylation (65) or NF1-targeting microRNA overexpression (66). Our data thus suggested considering RAS pathway altered AML cases as a provisional entity for prognostic and therapeutic research.

In a perspective of preclinical therapeutic development in RAS pathway altered AML, we implemented robust cell lines models of RAS activation. We took advantage of growth-factor dependent cell lines (TF-1, Ba/F3 and UT-7) to assess the oncogenic potential of RAS-activating genetic alterations. Using CRISPR/Cas9, we depleted NF1 from these cell lines, which demonstrated cytokine-independency, in agreement with the observations made in an *Nf1* knockout murine fetal liver cells model (67), and RAS pathway oncogenic addiction demonstrated by exquisite sensitivity to MEK inhibitors *in vitro*, and *in vivo* in mice CLDX experiments. Similar results were achieved using *NRAS*<sup>G12D</sup> expression in these cells, as reported (68). However, even if the clinically-used MEK inhibitor trametinib exhibited anti-leukemic activity against primary AML samples *ex vivo* and demonstrated clinical-grade activity in a *NRAS*<sup>G12D</sup>-mutated AML patient lacking other therapeutic perspective, its activity was heterogeneous and mostly seen in *NRAS*-mutated samples. In other RAS pathway cases, particularly those harboring *PTPN11* mutations, we observed a low efficiency and even an increased proliferation and survival induced by trametinib, suggesting the development of bypass mechanisms to single-agent MEK inhibition in these cases, as reported (14). From the BEAT AML database (52), we found in contrast that MEK inhibitor had a significantly higher cytotoxic activity in RAS altered samples – and not electively in *NRAS*-mutated cases – in short-term assays, which suggested that resistance mechanisms to MEK inhibition might require longer periods to occur *in vitro*.

The heterogeneity of RAS pathway mutations and the complexity of their biological consequences in cancer cells (9,69) suggest the development of combinatorial therapies to overcome preexisting or acquired resistance mechanisms to RAS-dependent pathways inhibition (70). Following a repurposing strategy to find new AML drugs with potential activity in RAS pathway altered cases, we screened *NF1* knockdown AML cells from the TF-1 cell line using a large FDA-approved molecules library (71). These experiments led to the identification of pyrvinium pamoate, an oral anthelmintic drug employed in pinworm infection (72). This compound exerted a strong cytotoxic activity against different RAS-mutated models, and in primary AML samples *ex vivo*. Interestingly, pyrvinium had a preferential



cytotoxicity against RAS-activated Ba/F3 cells and appeared slightly more active against RAS-mutated AML cell lines. Several mechanisms of action of pyrvinium were described, including the inhibition of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in different cancer types (48,49,73). While we ruled out Wnt inhibition by pyrvinium pamoate in our models *in vitro*, we focused on a potential metabolic activity of pyrvinium pamoate. Indeed, we found that this molecule dose-dependently inhibited mitochondrial respiration, in agreement with observations made in other cancers and in *FLT3*-mutated AML (74–77). We further observed a strong synergy between trametinib and pyrvinium in RAS-activated cell lines models, but also in primary samples from AML patients, in short-term liquid culture experiments and in long-term CFU-L assays. Interestingly, RAS activation may orchestrate cancer cells energetic metabolic reprogramming such as a shift toward glycolysis (78–80) or diversion of glycolysis intermediates into anabolic pathways (78). In fact, MEK inhibitors may reverse a RAS-driven glycolysis phenotype toward increased mitochondrial respiration (80,81). We could hypothesize that in RAS activated AML, trametinib may inhibits RAS-induced glycolysis shift, inducing a dependency to mitochondrial respiration thereby opening a therapeutic window for respiratory chain-targeting compounds.

Direct pharmacological targeting of activated RAS remains one of the most challenging problem of cancer drug discovery, although recent advances appeared promising for subsets of patients including those harboring *KRAS*<sup>G12C</sup> (82) and semi-autonomous RAS pathway activation or *PTPN11* mutations (83–85). As we showed that RAS pathway mutated AML patients, currently lacking personalized therapies in contrast to other AML subtypes had an adverse outcome upon conventional AML therapies, we suggest that the clinical development of pyrvinium pamoate may represent a meaningful opportunity in RAS pathway mutated AML.

## Figures legends

**Figure 1. Description of RAS pathway gene mutations in AML. A.** Genetic landscape of AML with mutations in RAS pathway genes. We search mutations in RAS pathways genes in a clinically annotated cohort of 140 primary AML samples using a customized next generation sequencing (NGS) panel. Mutations detected at least once are represented, along with clinically relevant cytogenetic findings and European leukemia network (ELN) scores. N#: patient's number in our cohort; 1 mut.: a single mutation detected in a gene; 2 mut.: at least 2 mutations detected for the same gene; del.: deletion; mut.+del.: both mutation and deletion detected for the same gene; no: no genetic alteration detected by our NGS panel; missing: missing data; ELN f/i/a: ELN score favorable, intermediate and adverse, respectively. **B.** Proportion of RAS pathway-mutated cases among our cohort. Left panel represents the distribution of RAS pathway gene mutations across our cohort. Genes found mutated at least once are indicated. Only the most frequent allele detected is considered in case of co-mutations. Middle left

panel: distribution of RAS pathway mutations dependent on karyotype subgroups. INT: intermediate; ADV: adverse; ADV. COMPLEX: complex karyotypes based on medical research council (MRC) classification. Middle right panel: distribution of RAS pathway mutations dependent on ELN score. INT: intermediate; ADV: adverse; NA: not available. Right panel: circus plot (computed online using <http://mkweb.bcgsc.ca/tableviewer/>) representing the nine cases with RAS pathway co-mutations. **C.** Schematic representation of the clonal architecture in selected RAS pathway-mutated cases. Patient number is indicated in the upper left corner while bone marrow blast cell percentage is indicated in the lower right corner. Variant allele frequencies are indicated in percentage, except when the main mutated clone is found in a majority of hematopoietic cells.

**Figure 2. Clinical impact of RAS pathway gene alterations in AML. A.** Survival of intensively treated AML patients dependent on RAS pathway mutations. Seventy-nine patients from our cohort (62%) received a classical anthracyclin and cytarabine chemotherapy induction. The left panel describes the overall survival (OS) and the right panel the progression free survival (PFS) proportions for the whole cohort (N=79), dependent on RAS pathway gene mutation detection as indicated. **B.** Survival of ELN intermediate intensively treated AML patients dependent on RAS pathway mutations. OS and PFS of the ELN INT cohort (N=34) dependent on RAS pathway alterations are depicted in the left and right panels, respectively. ELN INT\* means that we used a mix of 2010 (N=24) and 2017 (N=10) ELN scores due to pending genetic data. **C.** Survival of intensively treated RAS pathway mutated AML patients dependent on NF1 expression. mRNA expression of *NF1* was assessed in 17 RAS pathway mutated intensively treated AML patients. The panel described OS according to NF1 mRNA expression. Expression intensity was determined from the median: patients considered to have a low expression had an NF1 expression lower than the median value, and patients considered to have a high expression had an NF1 expression greater than the median value.

**Figure 3. Development and characterization of AML cell line models for RAS activation. A.** Schematic representation of cytokine-dependent cell lines models. TF-1 and Ba/F3 cell lines are cytokine-dependent (GM-CSF and IL-3, respectively). Cytokine starvation induces cell-cycle arrest and apoptosis in these cells. Activation of oncogenic pathways – such as RAS activation – allow cytokine-independent growth of these cells. **B.** TF-1 and Ba/F3 cells were genetically modified to induce RAS activation. Two different guides of NF1-targeting CRISPR/Cas9 (NF1-1 and NF1-2 in TF-1, and NF1-1.3 and NF1-42.8 in Ba/F3) and a *NRAS*<sup>G12D</sup> construct were lentivirally transduced into these cells. After selection and cytokine starvation, total cell lysates (upper panels) and RAS-RAF1 pulldowns (lower panel) were immunoblotted with antibodies directed against NF1, phospho-ERK, ERK, RAS and  $\beta$ -actin. Black arrows indicate molecular weight of each proteins. **C.** Gene expression profiling assays were done in

TF-1 cells transduced with a control CRISPR/Cas9 vector (NF1<sup>WT</sup>) or with a NF1-directed CRISPR/Cas9 construct (NF1<sup>KD</sup>). Analysis were performed using gene set enrichment analysis (GSEA). Experiments were done in biological replicates. Representative enrichment plots are provided (left panel), and normalized enrichment scores (NES) for RAS-related pathways are provided in the right panel along with the false discoveries rates (FDR) of each gene set. **D.** TF-1 CTR, NF1-1 and NF1-2 cells were cultured with erythropoietin (EPO) for 7 days. Cell pellets were spun down and pictures were captured using an iPhone 6 device (Apple, Cupertino, California, US) to observe hemoglobinization. **E.** TF-1 and Ba/F3 cells transduced with control (CTR), NF1-CRISPR/Cas9 or NRAS<sup>G12D</sup> vectors were starved from GM-CSF and IL-3, respectively and cell proliferation was evaluated by daily cell counting using a trypan blue exclusion assay. **F-G.** NOD/SCID gamma-null (NSG) mice were xenografted with 2x10<sup>6</sup> cells from the CTR, NF1-1 or NF1-2 TF-1 cell lines after conditioning with 20 mg/kg intraperitoneal busulfan at day -1. Mice were monitored on daily basis, and sacrificed in case of disability due to AML propagation. **F.** Survival curves of the CTR (N=5), NF1-1 (N=7) and NF1-2 (N=7) groups. **G.** After killing, tibias, femurs and sternum were dissected, immediately fixed in paraformaldehyde 4% for 24 h, then decalcified and paraffin-embedded. Paraffin slices were processed for hematoxylin-eosin staining (HES) and for immunohistochemistry (IHC) using an anti-phospho-ERK antibody. Images were captured using the slide scanner and software Zeiss Axioscan.Z1 (Carl Zeiss AG) at a ten-fold magnification (x10).

**Figure 4. Activity of MEK inhibitors on RAS pathway-mutated AML. A.** High-content kinase inhibitor screen on NF1-depleted TF-1 cells. We applied the target selective inhibitors library made of 592 unique compounds to CTR, NF1-1 or NF1-2 TF-1 cells for 48h, and the uptiblue fluorescent reagent evaluated cell viability. Each dot on the graph represents the mean of three independent experiments. MEK and p38 inhibitors are highlighted as indicated. **B.** TF-1 and Ba/F3 cell lines were genetically modified to induce RAS activation (by NF1-targeting CRISPR/Cas9 and NRAS<sup>G12D</sup> oncogene expression) and exposed to serial dilutions of the MEK inhibitor trametinib (from 10<sup>-6</sup> to 13.7x10<sup>-9</sup>M) for 48h. CTR cells were cultured with cytokines (5 ng/mL GM-CSF or 10% WEHI conditioned milieu as a source of IL-3 for TF-1 or Ba/F3 cells, respectively) and RAS-activated cells were cultured without cytokines except in TF-1 cells as indicated by +GM-CSF. Cell viability was measured by the uptiblue reagent. Data were plotted using the non-linear regression curve fit variable slope (four parameters) using prism®. **C.** CTR, NF1-1 and NF1-2 TF-1 cells were cultured without GM-CSF and incubated with 5nM trametinib for the indicated times. Cell extracts were submitted to immunoblotting using anti-phospho-ERK, anti-ERK and anti-β-actin antibodies, and to RAS-RAF1 pulldown. **D.** CTR and NF1-1 TF-1 cells were cultured with (CTR) or without (NF1-1) GM-CSF, and with or without 5 nM trametinib for 24h. Protein extracts were immunoblotted using anti-phospho-ERK, anti-PARP, anti-caspase-3 and anti-β-actin antibodies. **E-F.** NOD/SCID gamma-null (NSG) mice were xenografted with 2x10<sup>6</sup> cells from the NF1-1 TF-1 cell line after

conditioning with 20 mg/kg intraperitoneal busulfan at day -1 (NF1-1 CLDX for cell line-derived xenograft). Trametinib (0.5 mg/kg) or vehicle was administered daily by oral gavage starting at day 8 from transplant. Mice were monitored on daily basis and sacrificed in case of disability due to AML propagation. **E.** Survival curves of vehicle- or trametinib-treated NF1-1 CLDX (N=6 in each group). **F.** Representative HE staining and anti-phospho-ERK IHC for vehicle- or trametinib-treated mice. **G.** Left panel: Leukemia colony forming units (CFU-L) assays of primary samples from AML patients (regardless their RAS pathways mutational status) incubated with vehicle or 50 nM trametinib for 7 days. Right panel: CFU-L of trametinib-treated samples dependent on their RAS mutational status, represented as a ratio to the vehicle condition. NRAS G12/Q61R: samples with NRAS G12D/C/A/S or Q61R substitutions; #NRASG12/Q61R: samples with RAS pathways mutation other than NRASG12D/C/A/S or Q61R; no rasopathy: no mutation affecting RAS pathways. **H.** Left upper panel: May-Grünwald-Giemsa staining of bone marrow aspirate smears at a x100 magnification. Left lower panel: Sanger sequencing performed on bone marrow AML cells. The chromatogram highlight the c35G>C substitution. Middle panel: evolution of the white blood cell count (WBC) and monocyte count dependent on time. Therapeutic interventions are indicated. Right panel: bone marrow sample cultured ex vivo with vehicle or 25 nM trametinib for 24 h.

**Figure 5. Identification of pyrvinium pamoate as potential new agent in RAS pathway mutated AML.**

**A.** Schematic representation of high-density pharmacological screen in NF1-depleted TF-1 cells. **B.** First screen with the 1280 compounds at 10 $\mu$ M using the CellTiter-Glo<sup>®</sup> cell viability reagent after 72h of incubation. Results are represented for each compound (identified by a single dot) by the relation between their robust Z-score value (RZ-score) in Y-axis and the percentage of cell growth in X-axis. Compounds with a RZ-score  $\leq$ -5 (thus retained for further analysis) are highlighted in red. **C.** Second screen performed with serial dilutions of the top-60 compounds from the first screen in NF1-depleted TF-1 cells. Results are presented for each compound illustrated by a dot as the correspondence between their median effective dose (ED50, represented with a Log10 scale) and drug sensitivity score (DSS). The best hits are highlighted in red, and the classical AML chemotherapies (daunorubicin and cytarabine) are highlighted in orange. **D.** Dose-range experiments using log-dilutions (10<sup>-5</sup> to 10<sup>-8</sup> M) of pyrvinium pamoate in CTR, NF1-1.3, NF1-42.8 and NRASG12D Ba/F3 cells. Cell viability was determined using the uptiblue reagent. **E-F.** Oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) measurement using a seahorse machine in NF1-42.8 or NRAS<sup>G12D</sup> Ba/F3 cultured with vehicle (CTR) or 250nM or 500nM pyrvinium pamoate for 4h before seahorse analysis. O: oligomycin; F: FCCP (Trifluoromethoxy carbonylcyanide phenylhydrazone); R: Rot/AA (rotenone and antimycin A). **E:** crude data for OCR and ECAR dependent on time. **F:** Extrapolation of basal (before oligomycin) and maximal (after FCCP) respiration, and ATP-linked respiration (after oligomycin).

**Figure 6. Synergy between the MEK inhibitor trametinib and pyrvinium pamoate in RAS activated cells.** **A.** Combination drugs dose-range assays in CTR and NF1-depleted Ba/F3 and TF-1 cells. Heat maps representing the viability measured by the uptiblue reagent of those cells exposed to dose-range of single agents (trametinib or pyrvinium pamoate) or combo (association between trametinib and pyrvinium pamoate) in three separate experiments are provided. **B-C.** Synergy scores calculated by the SynergyFinder software (33) using both Bliss and Loewe statistics. **B.** Results in CTR or RAS activated Ba/F3 or TF-1 cells. **C.** Results in six primary AML samples harboring RAS pathway mutations. **D-E.** CFU-L assays in primary AML samples with RAS pathway mutations incubated with vehicle, 50 nM trametinib, 250 nM pyrvinium pamoate and trametinib/pyrvinium combo during 7 days. Results are presented as a ratio between the number of colonies observed in vehicle-treated cells and each other condition for each sample (indicated by a dot). **D.** P-value for vehicle/combo comparison is provided on the top of the combo histogram (and not provided for trametinib and pyrvinium comparison with vehicle as not significant). **E.** Two-by-two comparisons between pyrvinium/trametinib, trametinib/combo and pyrvinium/combo represented with a connecting line between each condition for each single patient sample. Statistical analysis was performed using a Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

## Supplemental Figures legends

**Supplemental Figure 1. Description of RAS pathway gene mutations in AML.** **A.** Heat map representing the repartition of *NF1*, *NRAS*, *KRAS*, *PTPN11*, *CBL*, *BRAF*, *NPM1* and *FLT3* genetic alterations in the TCGA cohort, generated using the cBioPortal online tool. **B.** Proportion of AML cases from the TCGA database dependent on the filters used in our study: exclusion of favorable ELN cases (*t(15;17)*, *t(8;21)*, *inv(16)* and biallelic *CEBPA* mutations), of *NPM1*- and *FLT3-ITD*-mutated cases. **C.** Flow chart summarizing the implementation of our cohort. BSC: best supportive care; Controls\* refers to cases with favorable karyotype or *FLT3-ITD/NPM1* mutations; Induction: AML patients having received intensive chemotherapy as frontline therapy; ELN-INT and ELN-ADV: intermediate or advance European leukemia network (ELN) score, respectively. Among ELN-INT cases, 10 were scored using the 2017 ELN scoring system while 24 using the 2010 ELN. **D.** Genetic landscape of AML patients from our cohort. We search mutations in RAS pathways genes in a clinically annotated cohort of 140 primary AML samples using a customized next generation sequencing (NGS) panel. Mutations detected at least once are represented, along with clinically relevant cytogenetic findings and ELN scores. N#: patient's number in our cohort; 1 mut.: a single mutation detected in a gene; 2 mut.: at least 2 mutations detected for the same gene; del.: deletion; mut.+del.: both mutation and deletion detected for the

same gene; no: no genetic alteration detected by our NGS panel; missing: missing data; ELN f/i/a: ELN score favorable, intermediate and adverse, respectively. **E.** Repartition of *NF1* mutations (mut.) and/or deletions (del.). Some *NF1* deletions were detected by next generation sequencing (NGS) but other were found only by fluorescent in situ hybridization (FISH). **F.** Repartition of PRC2 member mutations or deletions, including *EZH2*, *SUZ12* and *EED* genes, in *NF1*-altered versus other cases.

**Supplemental Figure 2. Clinical impact of RAS pathway gene alterations in AML.** **A.** Overall (left panel) and progression-free (right panel) survival from the whole cohort of patients having received an induction chemotherapy. **B.** Overall survival of the whole cohort including controls dependent on karyotype subgroup according to MRC classification. **C.** Overall survival of the whole cohort including controls dependent on the ELN score. **D.** Overall survival probability of intensively treated AML patients with adverse ELN score dependent on RAS pathway alterations. **E.** Overall survival probability of intensively treated AML patients with an intermediate 2010 ELN score dependent on RAS pathway alterations. **F-G.** Survival probability of TCGA (F) and BEAT AML (G) AML cases selected after the exclusion of ELN favorable and *FLT3-ITD* cases, dependent on RAS pathway alterations. Data from the whole cohort (left panel) or focusing on intermediate ELN cases (right panel) are analyzed. **H.** Overall survival probability of RAS pathway altered cases from our cohort dependent on *NRAS*<sup>G12/Q61R</sup> mutations (left panel), *KRAS* mutations (middle panel) or *PTPN11* mutations (right panel). **I.** *NF1* mRNA expression level in 54 cases with available RNA from our main cohort (left panel), and in 34 cases having received intensive chemotherapy as induction (right panel). **J.** Overall survival of the 34 intensively treated cases with available RNA dependent on *NF1* expression.

**Supplemental Figure 3. Development and characterization of AML cell line models for RAS activation.** **A.** Western blot from CTR, NF1-1 or NF1-2 UT-7 protein extracts using anti-NF1, -phospho-ERK, -ERK and -p85 antibodies (Upper panel). RAS-RAF1 pulldown assay in CTR, NF1-1 and NF1-2 UT-7 cell extracts revealed by a RAS antibody (lower panel). **B.** Cell proliferation assessed by regular cell counting using trypan blue exclusion assay in CTR (in the presence of 2 IU/mL EPO), and NF1-1 and NF1-2 (in the absence of EPO) UT-7 cell lines. Each dot represent an independent experiment and trend curves were extrapolated from the crude data. **C.** Left panel: schematic representation of transwell® cell contact-free co-cultures. Right panel: Transwell co-cultures in GM-CSF-starved TF-1 cells in the presence of *NF1* knockdown NF1-1 and NF1-2 TF-1 cells (grown in the absence of GM-CSF). Cell proliferation is assessed by regular cell counting using trypan blue exclusion assay.

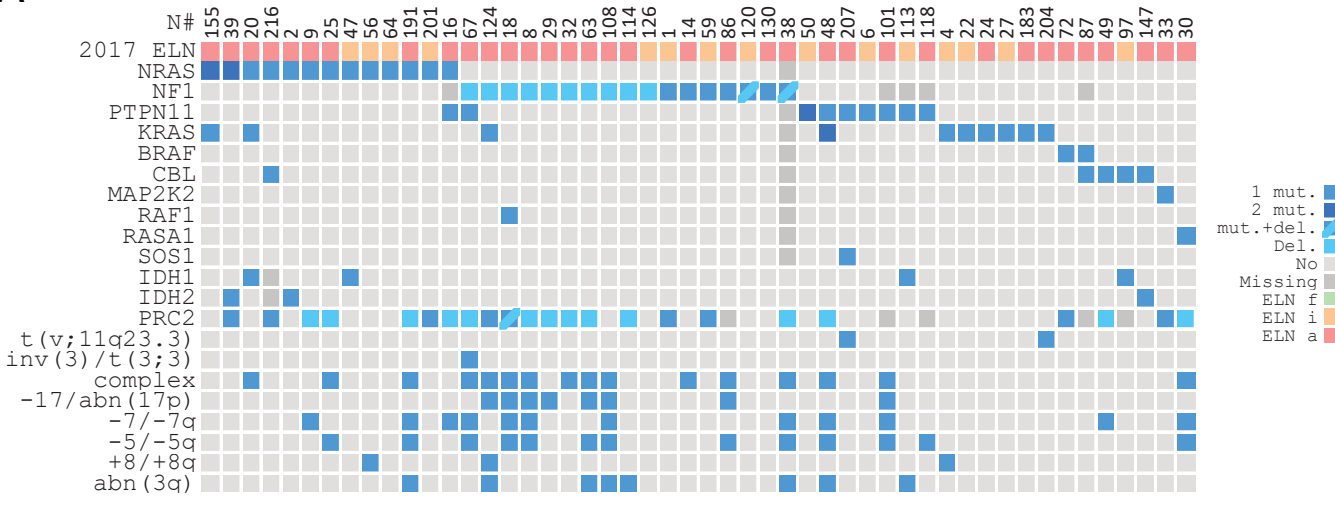
**Supplemental Figure 4. Activity of MEK inhibitors on RAS pathway-mutated AML.** **A.** We applied the target selective inhibitors library made of 592 unique compounds to CTR or NF1-2 TF-1 cells for 48h,

and the uptiblue fluorescent reagent evaluated cell viability. Each dot on the graph represents the mean of three independent experiments. MEK and p38 inhibitors are highlighted as indicated. **B.** Correlation between NF1-1 and NF1-2 screens. **C.** *NF1* knockdown (cultured without EPO) or control (cultured with 2 IU/mL EPO) UT-7 cells were exposed to serial dilutions of the MEK inhibitor trametinib (from  $10^{-5}$  to  $13.7 \times 10^{-9}$  M) for 48h. Cell viability was measured by the uptiblue reagent. Data were plotted using the non-linear regression curve fit variable slope (four parameters) using prism<sup>®</sup>. **D.** Annexin V flow cytometry binding experiments in TF-1 CTR, NF1-1 or NF1-2 cells cultured with a dose-range of trametinib or vehicle. CTR cells, as well as NF1-1+ and NF1-2+ conditions were done in the presence of 5 ng/mL GM-CSF, while NF1-1 and NF1-2 cells were cultured without GM-CSF. **E.** BEAT AML data on inhibitory concentration 50 (IC50) values of primary AML cells exposed to the MEK inhibitors trametinib or selumetinib dependent on the presence of RAS pathway mutations as indicated.

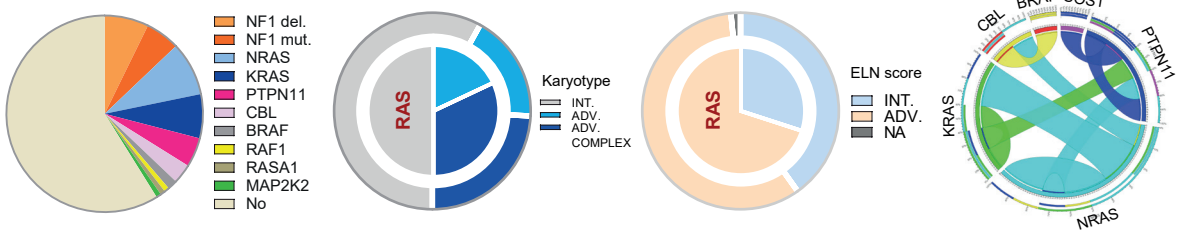
**Supplemental Figure 5. Identification of pyrvinium pamoate as potential new agent in RAS pathway mutated AML.** **A.** Correlation between NF1-1 and NF1-2 secondary screens based on drug sensitivity score (DSS) values. Top height compounds are highlighted. **B.** Dose range experiments in CTR, *NF1* knockdown or *NRAS*<sup>G12D</sup> Ba/F3 cells using digoxigenin (left panel) or vorinostat (right panel). **C.** Annexin V flow cytometry binding assays in pyrvinium pamoate-treated CTR, NF1-1.3, NF1-42.8 or *NRAS*G12D Ba/F3 cells. \*:  $p < 0.05$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ . **D.** Dose-range experiments using pyrvinium pamoate in CTR or NF1-depleted TF-1 (left panel) or UT-7 (right panel) cell lines. **E.** Dose-range experiments using pyrvinium pamoate in a panel of AML cell lines with or without *RAS* mutation as indicated. Results of three independent experiments are summarized by the nonlinear regression curve of each condition. **F:** Western blotting in NF1-depleted TF-1 or Ba/F3 cells (NF1-1 and NF1-1.3 cultured without or with 1 $\mu$ M pyrvinium pamoate for the indicated time. **G.** Left panel: Wnt reporter assays at the baseline in the HUH-6 cell line, or in CTR, NF1-1, NF1-2 and *NRAS*G12D TF-1 cell lines. Right panel: Wnt reporter assay in HUH-6 cells incubated with vehicle or 250 to 500nM pyrvinium pamoate.

# Figure 1

A



B



C

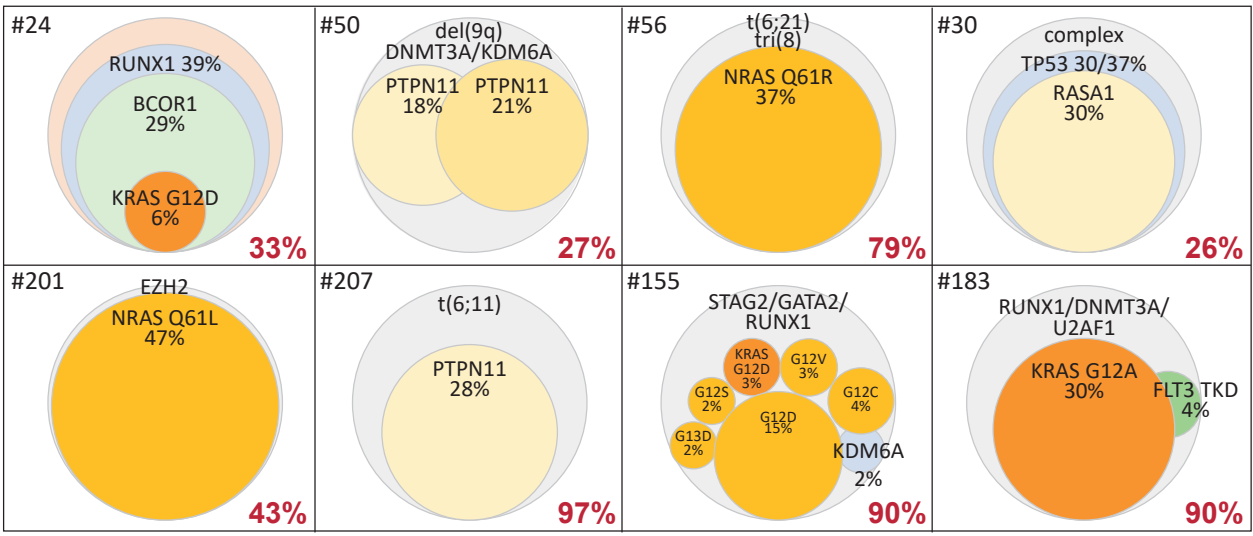




Figure 2

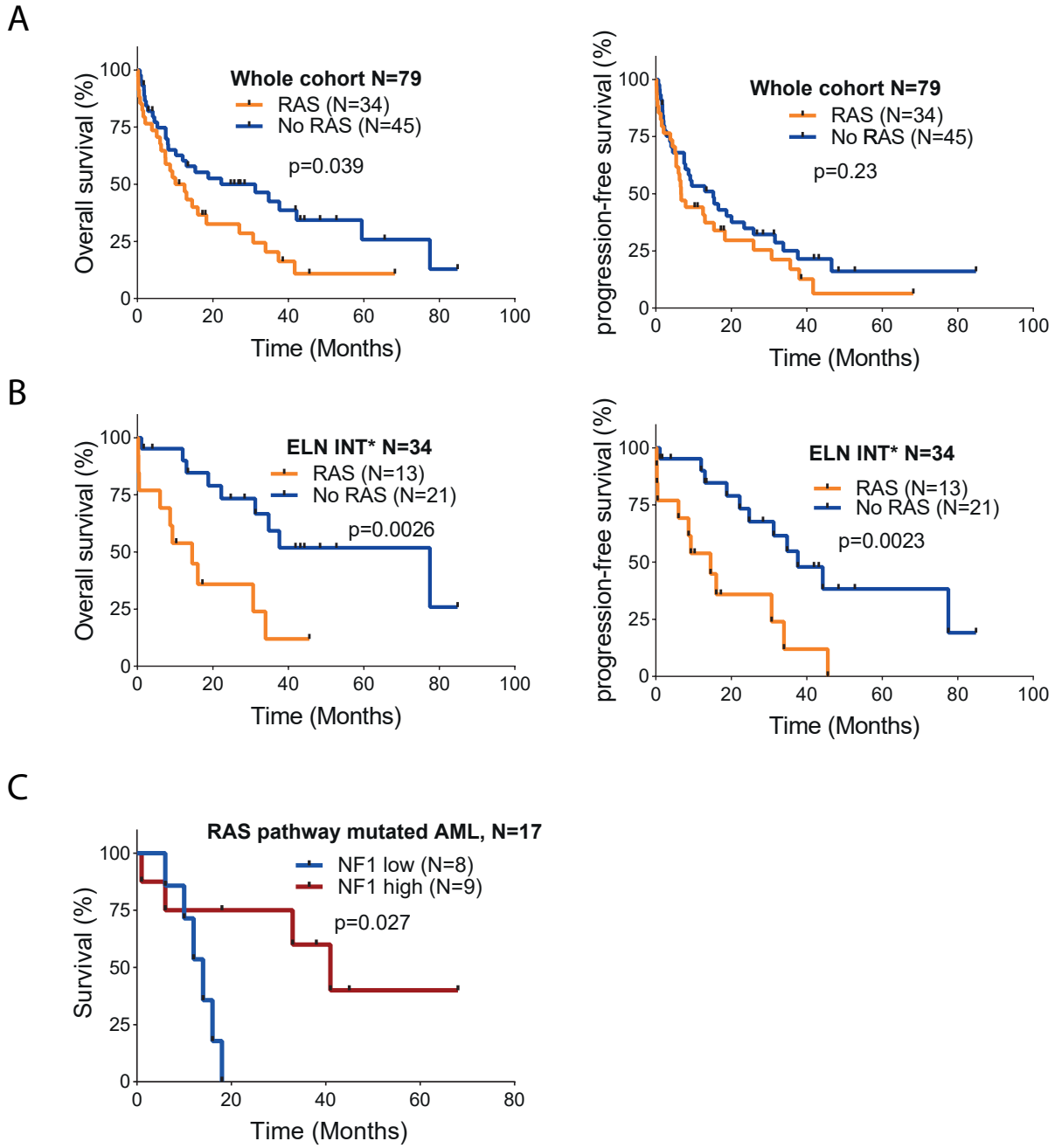
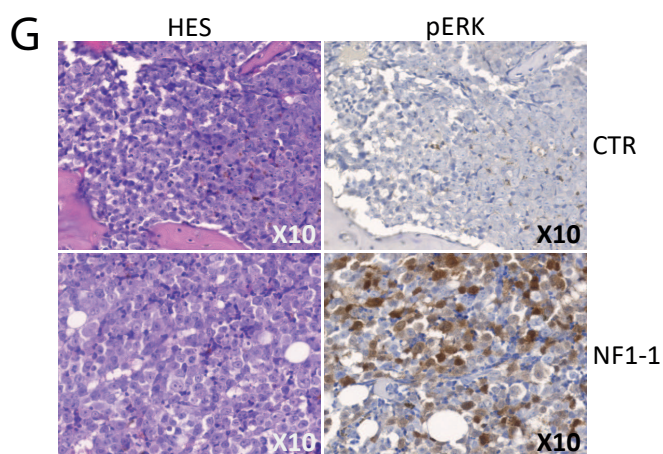
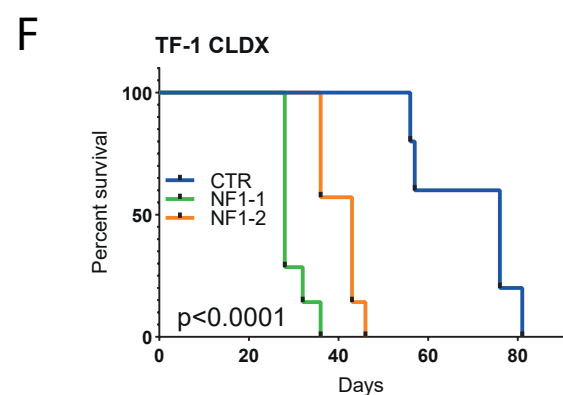
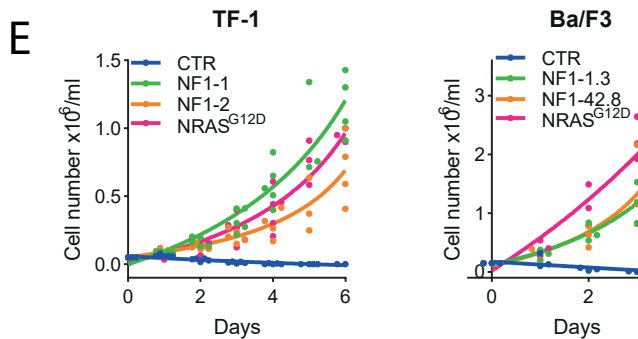
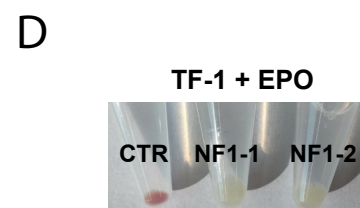
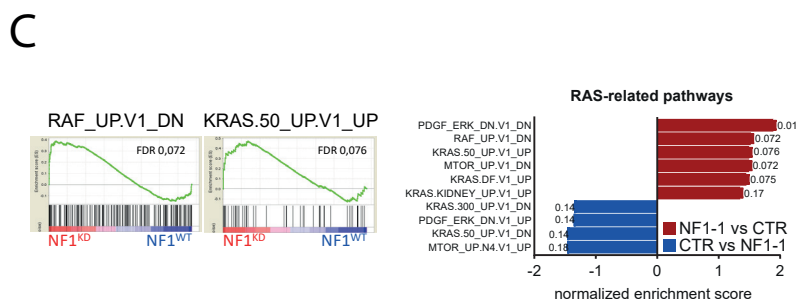
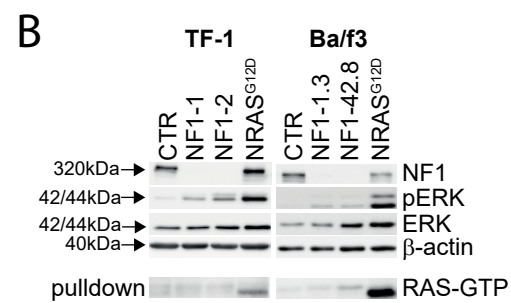
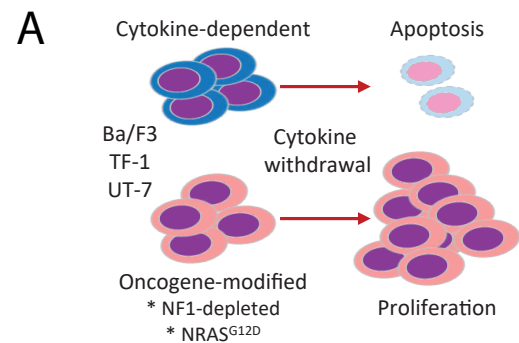


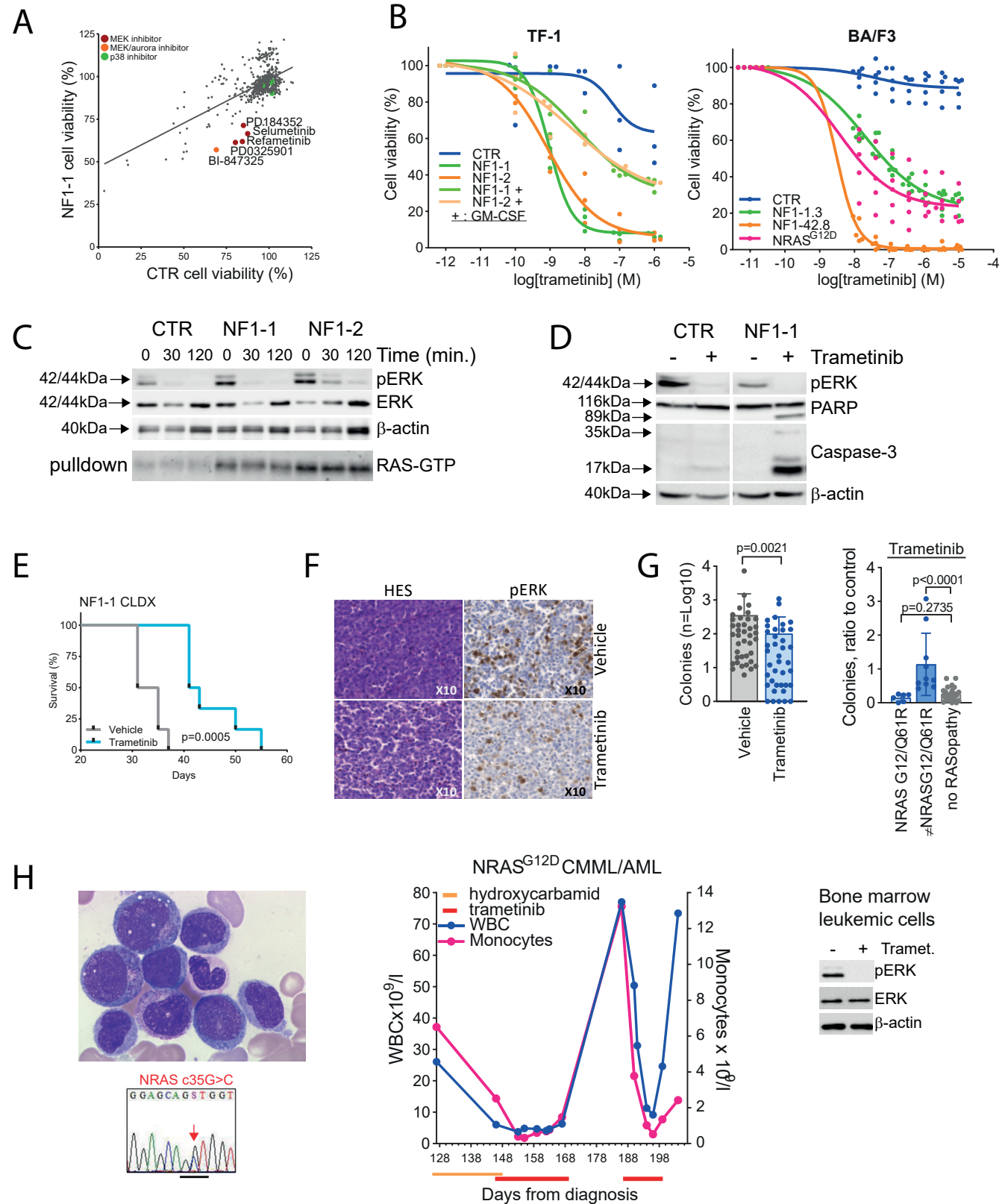
Table 1: Clinical characteristics of RAS pathway mutated patients compared to other patients

	<b>RAS pathway alterations</b>	<b>No RAS pathway alterations</b>	<b>P value</b>
Number of Patients	34	45	
Gender (Male) n (%)	22 (65%)	29 (64%)	p > 0.999
Age (years)	61 (23-78)	61 (26-82)	p = 0.9431
White Blood Count (G/L)	19,5 (1,1-287)	2,3 (0,8-170)	p < 0.0002
Missing data	1	1	
Bone marrow blast percentage (%)	62 (22-94)	44 (7-98)	p = 0.0097
Missing data	1	3	
Peripheral blast percentage (%)	50 (0-98)	4.5 (0-97)	p < 0.0001
Missing data	1	3	
LDH (IU/L)	501 (150-3516)	347 (56-18000)	p = 0.0236
Missing data	0	3	
Allogeneic Stem Cell Transplantation, n (%)	8 (24%)	13 (32%)	p = 0.4536
Missing data	0	4	
Secondary Disease, n (%)	6 (17.6%)	6 (13%)	p = 0.7534
Refractory Disease, n (%)	13 (43%)	17 (39%)	p = 1
Not evaluable	4	2	

# Figure 3

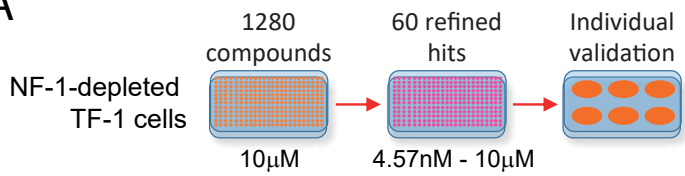


**Figure 4**

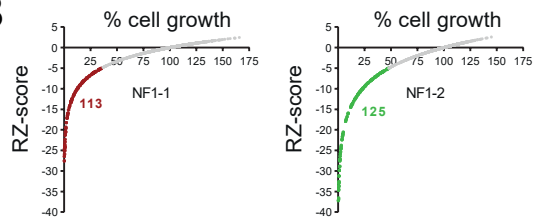


# Figure 5

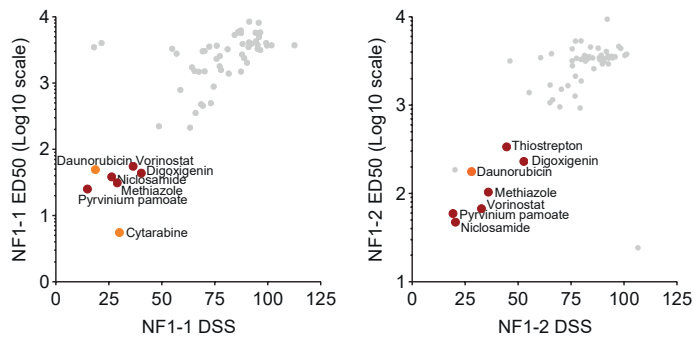
## A



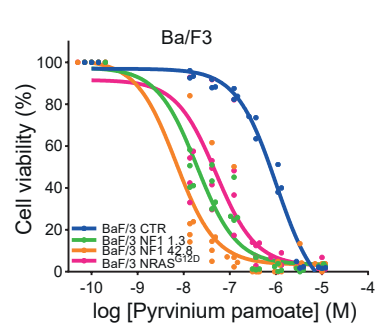
## B



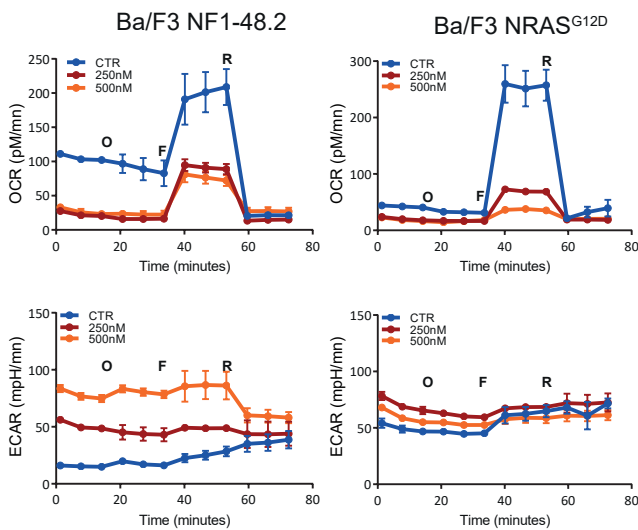
## C



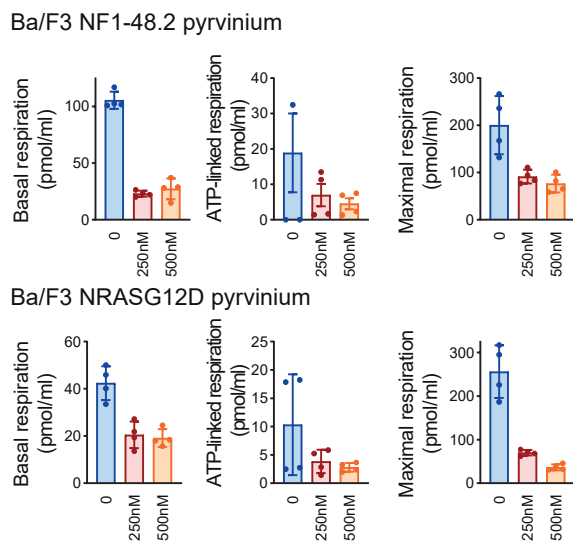
## D



## E

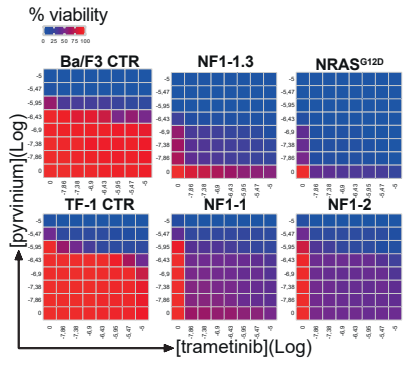


## F

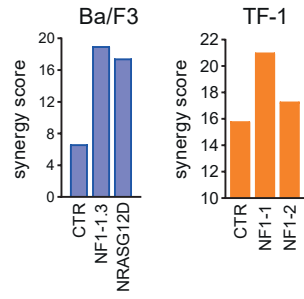


# Figure 6

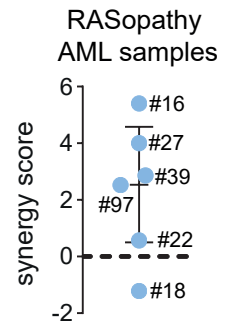
## A



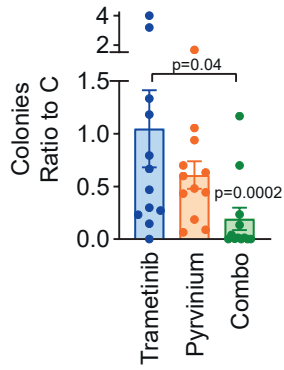
## B



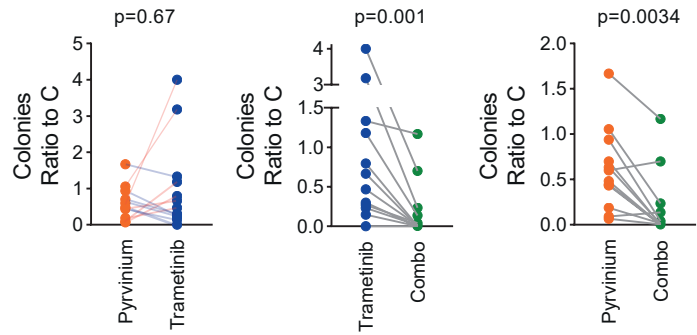
## C



## D

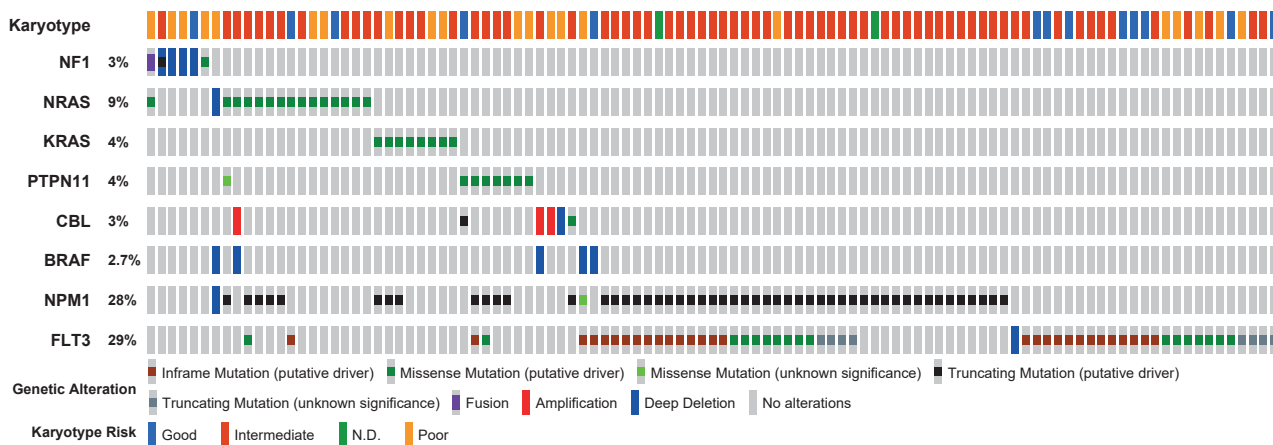


## E

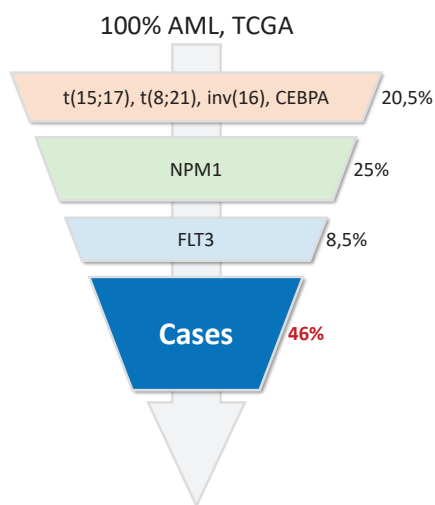


# Supplemental Figure 1

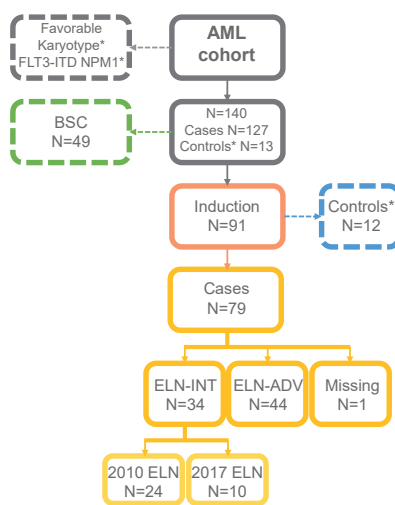
## A



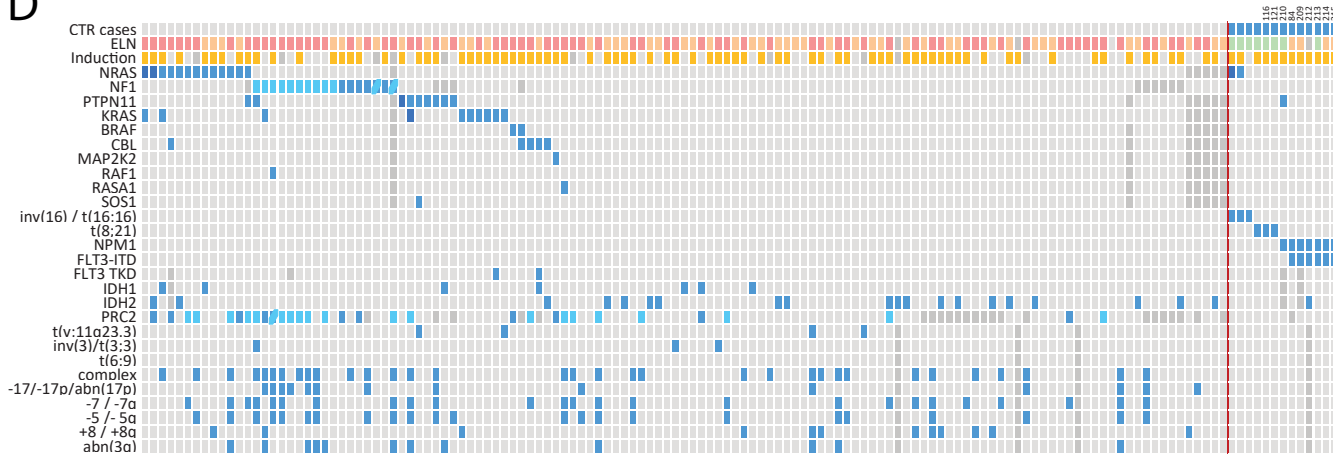
## B



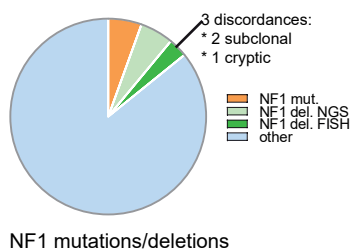
## C



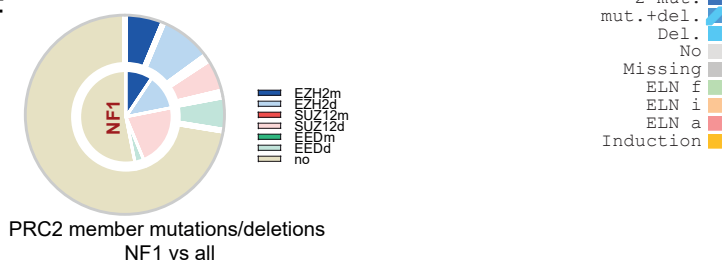
## D



## E

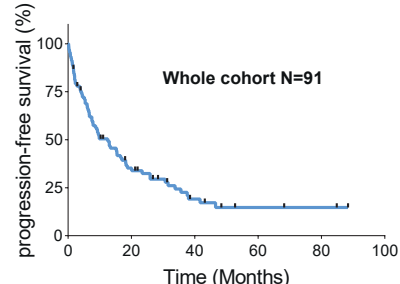
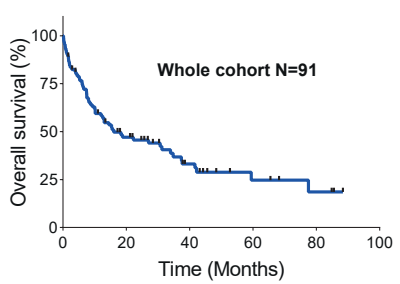


## F

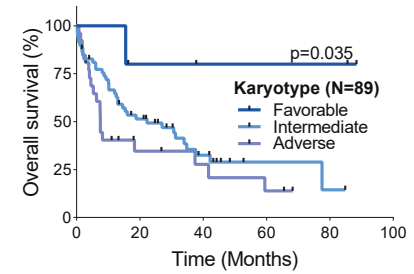


# Supplemental Figure 2

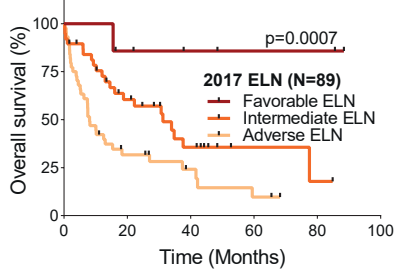
**A**



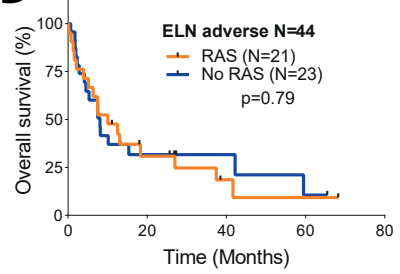
**B**



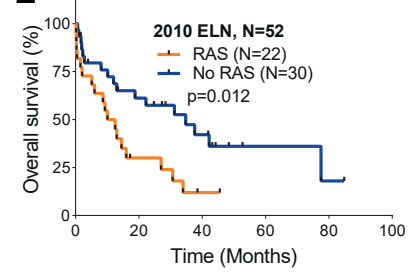
**C**



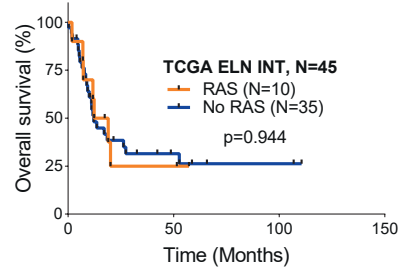
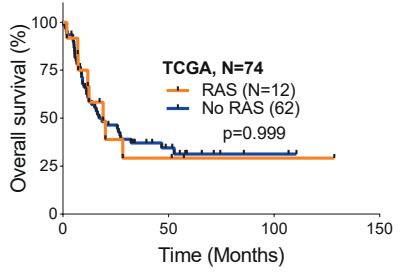
**D**



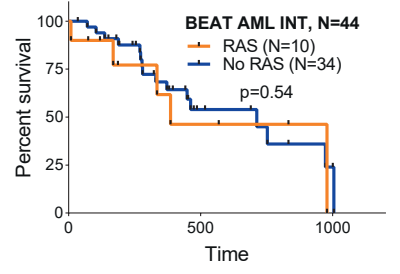
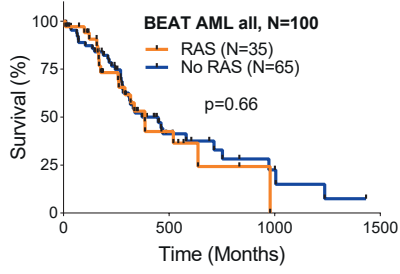
**E**



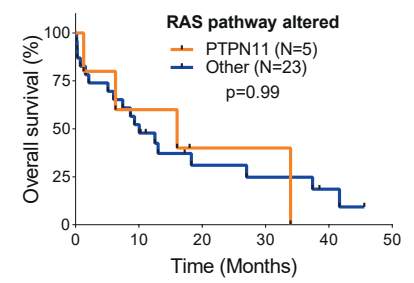
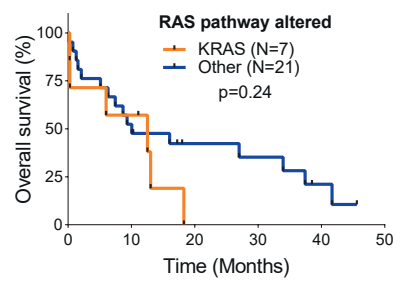
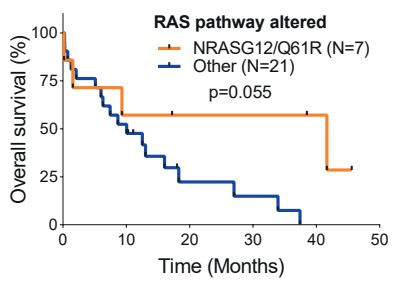
**F**



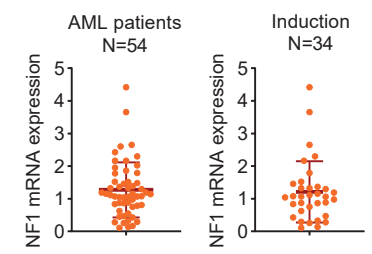
**G**



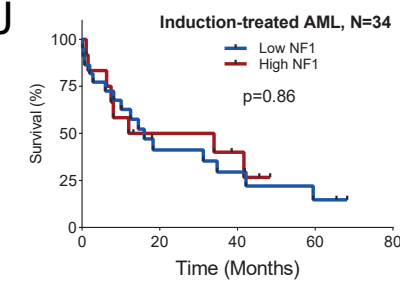
**H**



**I**



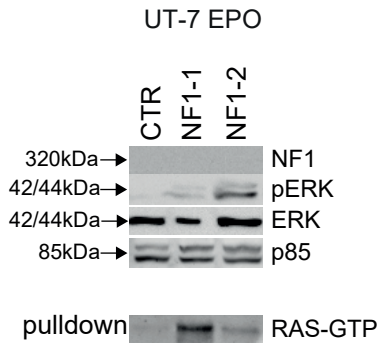
**J**



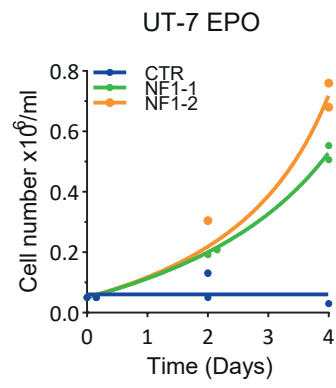


# Supplemental Figure 3

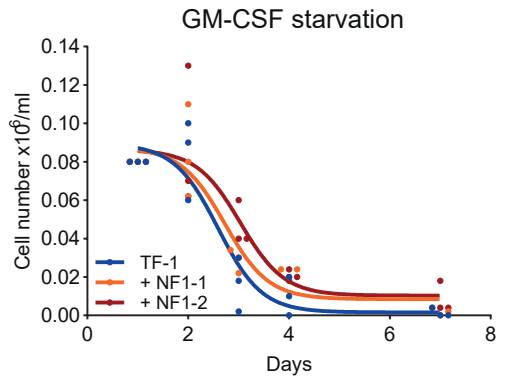
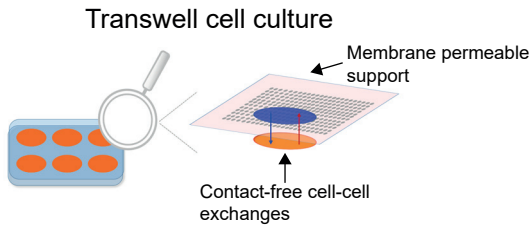
## A



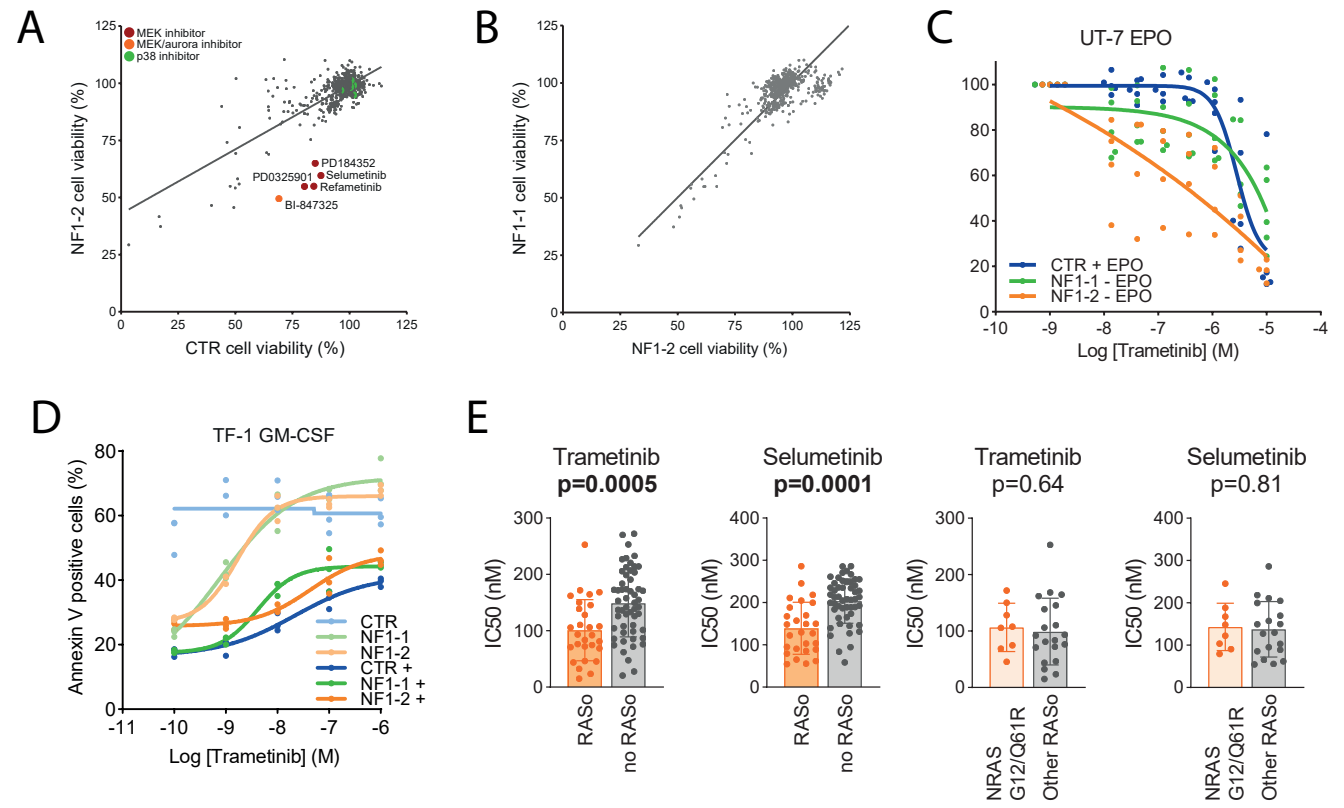
## B



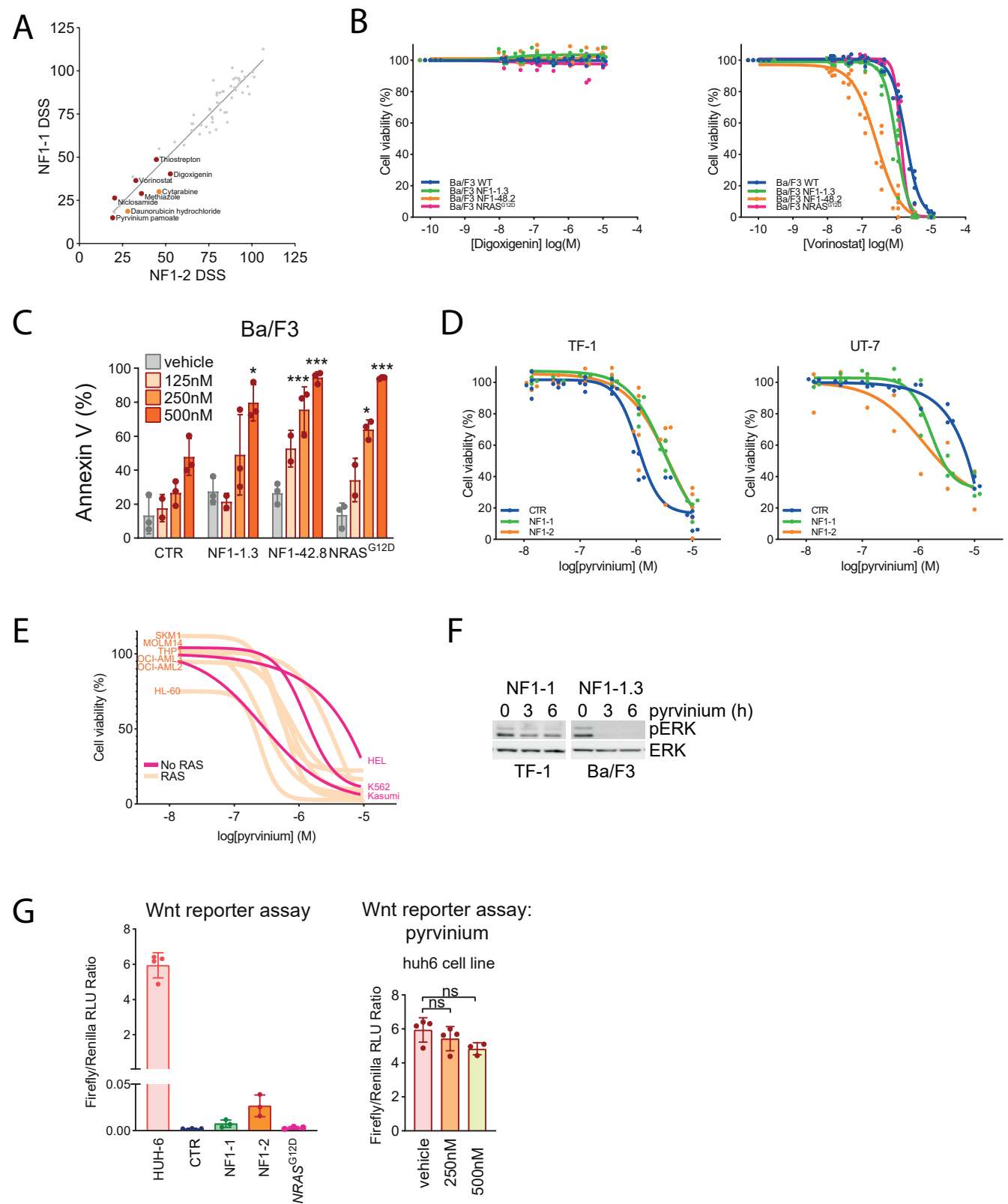
## C



# Supplemental Figure 4



# Supplemental Figure 5



## References

1. Bullinger L, Döhner K, Döhner H. Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 mars 2017;35(9):934-46.
2. Tuval A, Shlush LI. Evolutionary trajectory of leukemic clones and its clinical implications. *Haematologica*. mai 2019;104(5):872-80.
3. Heuser M, Mina A, Stein EM, Altman JK. How Precision Medicine Is Changing Acute Myeloid Leukemia Therapy. *Am Soc Clin Oncol Educ Book Am Soc Clin Oncol Annu Meet*. janv 2019;39:411-20.
4. Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, Laumann K, Geyer S, Bloomfield CD, et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *N Engl J Med*. 03 2017;377(5):454-64.
5. Stein EM, DiNardo CD, Fathi AT, Pollyea DA, Stone RM, Altman JK, et al. Molecular remission and response patterns in patients with mutant-IDH2 acute myeloid leukemia treated with enasidenib. *Blood*. 14 févr 2019;133(7):676-87.
6. Pollyea DA, Tallman MS, de Botton S, Kantarjian HM, Collins R, Stein AS, et al. Enasidenib, an inhibitor of mutant IDH2 proteins, induces durable remissions in older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 9 avr 2019;
7. 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*. 9 juin 2016;374(23):2209-21.
8. Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer*. 13 oct 2011;11(11):761-74.
9. Simanshu DK, Nissley DV, McCormick F. RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. *Cell*. 29 juin 2017;170(1):17-33.
10. Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 30 mai 2013;368(22):2059-74.
11. Hirsch P, Zhang Y, Tang R, Joulin V, Boutroux H, Pronier E, et al. Genetic hierarchy and temporal variegation in the clonal history of acute myeloid leukaemia. *Nat Commun*. 18 2016;7:12475.
12. Burgess MR, Hwang E, Firestone AJ, Huang T, Xu J, Zuber J, et al. Preclinical efficacy of MEK inhibition in Nras-mutant AML. *Blood*. 18 déc 2014;124(26):3947-55.
13. Borthakur G, Popplewell L, Boyiadzis M, Foran J, Platzbecker U, Vey N, et al. Activity of the oral mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor trametinib in RAS-mutant relapsed or refractory myeloid malignancies. *Cancer*. 15 2016;122(12):1871-9.
14. Caunt CJ, Sale MJ, Smith PD, Cook SJ. MEK1 and MEK2 inhibitors and cancer therapy: the long and winding road. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(10):577-92.
15. Stephen AG, Esposito D, Bagni RK, McCormick F. Dragging ras back in the ring. *Cancer Cell*. 17 mars 2014;25(3):272-81.

16. Ryan MB, Corcoran RB. Therapeutic strategies to target RAS-mutant cancers. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(11):709-20.
17. 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*. 9 juin 2015;11(9):1446-57.
18. De Raedt T, Beert E, Pasmant E, Luscan A, Brems H, Ortonne N, et al. PRC2 loss amplifies Ras-driven transcription and confers sensitivity to BRD4-based therapies. *Nature*. 9 oct 2014;514(7521):247-51.
19. Pasmant E, Parfait B, Luscan A, Goussard P, Briand-Suleau A, Laurendeau I, et al. Neurofibromatosis type 1 molecular diagnosis: what can NGS do for you when you have a large gene with loss of function mutations? *Eur J Hum Genet EJHG*. mai 2015;23(5):596-601.
20. Romana SP, Radford-Weiss I, Ben Abdelali R, Schluth C, Petit A, Dastugue N, et al. NUP98 rearrangements in hematopoietic malignancies: a study of the Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique. *Leukemia*. avr 2006;20(4):696-706.
21. Hospital M-A, Jacquelin A, Mazed F, Saland E, Larrue C, Mondésir J, et al. RSK2 is a new Pim2 target with pro-survival functions in FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2018;32(3):597-605.
22. Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen T, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*. 3 janv 2014;343(6166):84-7.
23. Campeau E, Ruhl VE, Rodier F, Smith CL, Rahmberg BL, Fuss JO, et al. A versatile viral system for expression and depletion of proteins in mammalian cells. *PLoS One*. 6 août 2009;4(8):e6529.
24. Grenier A, Sujobert P, Olivier S, Guermouche H, Mondésir J, Kosmider O, et al. Knockdown of Human AMPK Using the CRISPR/Cas9 Genome-Editing System. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2018;1732:171-94.
25. Saland E, Boutzen H, Castellano R, Pouyet L, Griessinger E, Larrue C, et al. A robust and rapid xenograft model to assess efficacy of chemotherapeutic agents for human acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J*. 20 mars 2015;5:e297.
26. Malo N, Hanley JA, Cerquozzi S, Pelletier J, Nadon R. Statistical practice in high-throughput screening data analysis. *Nat Biotechnol*. févr 2006;24(2):167-75.
27. Birmingham A, Selfors LM, Forster T, Wrobel D, Kennedy CJ, Shanks E, et al. Statistical methods for analysis of high-throughput RNA interference screens. *Nat Methods*. août 2009;6(8):569-75.
28. Ritz C, Baty F, Streibig JC, Gerhard D. Dose-Response Analysis Using R. *PLoS One*. 2015;10(12):e0146021.
29. Yadav B, Pemovska T, Sz wajda A, Kuleskiy E, Kontro M, Karjalainen R, et al. Quantitative scoring of differential drug sensitivity for individually optimized anticancer therapies. *Sci Rep*. 5 juin 2014;4:5193.

30. Poulain L, Sujobert P, Zylbersztejn F, Barreau S, Stuani L, Lambert M, et al. High mTORC1 activity drives glycolysis addiction and sensitivity to G6PD inhibition in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia*. 2017;31(11):2326-35.
31. Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, et al. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC<sup>-/-</sup> colon carcinoma. *Science*. 21 mars 1997;275(5307):1784-7.
32. Tamburini J, Green AS, Bardet V, Chapuis N, Park S, Willems L, et al. Protein synthesis is resistant to rapamycin and constitutes a promising therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Blood*. 20 août 2009;114(8):1618-27.
33. Ianevski A, He L, Aittokallio T, Tang J. SynergyFinder: a web application for analyzing drug combination dose–response matrix data. *Bioinformatics*. 1 août 2017;33(15):2413-5.
34. Tajan M, Paccoud R, Branka S, Edouard T, Yart A. The RASopathy Family: Consequences of Germline Activation of the RAS/MAPK Pathway. *Endocr Rev*. 1 oct 2018;39(5):676-700.
35. Bacher U, Haferlach T, Schoch C, Kern W, Schnittger S. Implications of NRAS mutations in AML: a study of 2502 patients. *Blood*. 15 mai 2006;107(10):3847-53.
36. Caye A, Strullu M, Guidez F, Cassinat B, Gazal S, Fenneteau O, et al. Juvenile myelomonocytic leukemia displays mutations in components of the RAS pathway and the PRC2 network. *Nat Genet*. nov 2015;47(11):1334-40.
37. Büchner T, Schlenk RF, Schaich M, Döhner K, Krahl R, Krauter J, et al. Acute Myeloid Leukemia (AML): different treatment strategies versus a common standard arm--combined prospective analysis by the German AML Intergroup. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 10 oct 2012;30(29):3604-10.
38. Warmuth M, Kim S, Gu X, Xia G, Adrián F. Ba/F3 cells and their use in kinase drug discovery. *Curr Opin Oncol*. janv 2007;19(1):55-60.
39. Wang F, Travins J, DeLaBarre B, Penard-Lacronique V, Schalm S, Hansen E, et al. Targeted inhibition of mutant IDH2 in leukemia cells induces cellular differentiation. *Science*. 3 mai 2013;340(6132):622-6.
40. Palacios R, Henson G, Steinmetz M, McKearn JP. Interleukin-3 supports growth of mouse pre-B-cell clones in vitro. *Nature*. 10 mai 1984;309(5964):126-31.
41. Palacios R, Steinmetz M. Il-3-dependent mouse clones that express B-220 surface antigen, contain Ig genes in germ-line configuration, and generate B lymphocytes in vivo. *Cell*. juill 1985;41(3):727-34.
42. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson K-F, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, et al. PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet*. juill 2003;34(3):267-73.
43. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 25 oct 2005;102(43):15545-50.

44. Chrétien S, Varlet P, Verdier F, Gobert S, Cartron JP, Gisselbrecht S, et al. Erythropoietin-induced erythroid differentiation of the human erythroleukemia cell line TF-1 correlates with impaired STAT5 activation. *EMBO J*. 15 août 1996;15(16):4174-81.
45. Long GV, Hauschild A, Santinami M, Atkinson V, Mandalà M, Chiarion-Sileni V, et al. Adjuvant Dabrafenib plus Trametinib in Stage III BRAF-Mutated Melanoma. *N Engl J Med*. 09 2017;377(19):1813-23.
46. Tyner JW, Tognon CE, Bottomly D, Wilmot B, Kurtz SE, Savage SL, et al. Functional genomic landscape of acute myeloid leukaemia. *Nature*. 2018;562(7728):526-31.
47. Oetzel C, Jonuleit T, Götz A, van der Kuip H, Michels H, Duyster J, et al. The tyrosine kinase inhibitor CGP 57148 (ST1 571) induces apoptosis in BCR-ABL-positive cells by down-regulating BCL-X. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. mai 2000;6(5):1958-68.
48. Xu W, Lacerda L, Debeb BG, Atkinson RL, Solley TN, Li L, et al. The antihelminthic drug pyrvinium pamoate targets aggressive breast cancer. *PloS One*. 2013;8(8):e71508.
49. Thorne CA, Hanson AJ, Schneider J, Tahinci E, Orton D, Cselenyi CS, et al. Small-molecule inhibition of Wnt signaling through activation of casein kinase 1 $\alpha$ . *Nat Chem Biol*. nov 2010;6(11):829-36.
50. Récher C, Beyne-Rauzy O, Demur C, Chicanne G, Dos Santos C, Mas VM-D, et al. Antileukemic activity of rapamycin in acute myeloid leukemia. *Blood*. 15 mars 2005;105(6):2527-34.
51. Itzykson R, Duployez N, Fasan A, Decool G, Marceau-Renaut A, Meggendorfer M, et al. Clonal interference of signaling mutations worsens prognosis in core-binding factor acute myeloid leukemia. *Blood*. 12 juill 2018;132(2):187-96.
52. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 26 2017;129(4):424-47.
53. Haferlach C, Grossmann V, Kohlmann A, Schindela S, Kern W, Schnittger S, et al. Deletion of the tumor-suppressor gene NF1 occurs in 5% of myeloid malignancies and is accompanied by a mutation in the remaining allele in half of the cases. *Leukemia*. avr 2012;26(4):834-9.
54. Boudry-Labis E, Roche-Lestienne C, Nibourel O, Boissel N, Terre C, Perot C, et al. Neurofibromatosis-1 gene deletions and mutations in de novo adult acute myeloid leukemia. *Am J Hematol*. avr 2013;88(4):306-11.
55. Eisfeld A-K, Kohlschmidt J, Mrózek K, Mims A, Walker CJ, Blachly JS, et al. NF1 mutations are recurrent in adult acute myeloid leukemia and confer poor outcome. *Leukemia*. déc 2018;32(12):2536-45.
56. Stieglitz E, Taylor-Weiner AN, Chang TY, Gelston LC, Wang Y-D, Mazor T, et al. The genomic landscape of juvenile myelomonocytic leukemia. *Nat Genet*. nov 2015;47(11):1326-33.
57. Zhao Z, Chen C-C, Rillaan CD, Shen R, Kitzing T, McNerney ME, et al. Cooperative loss of RAS feedback regulation drives myeloid leukemogenesis. *Nat Genet*. mai 2015;47(5):539-43.

58. Corces-Zimmerman MR, Hong W-J, Weissman IL, Medeiros BC, Majeti R. Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 18 févr 2014;111(7):2548-53.
59. Bowen DT, Frew ME, Hills R, Gale RE, Wheatley K, Groves MJ, et al. RAS mutation in acute myeloid leukemia is associated with distinct cytogenetic subgroups but does not influence outcome in patients younger than 60 years. *Blood*. 15 sept 2005;106(6):2113-9.
60. Ritter M, Kim TD, Lisske P, Thiede C, Schaich M, Neubauer A. Prognostic significance of N-RAS and K-RAS mutations in 232 patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica*. nov 2004;89(11):1397-9.
61. Illmer T, Thiede C, Fredersdorf A, Stadler S, Neubauer A, Ehninger G, et al. Activation of the RAS pathway is predictive for a chemosensitive phenotype of acute myelogenous leukemia blasts. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1 mai 2005;11(9):3217-24.
62. Liu X, Ye Q, Zhao X-P, Zhang P-B, Li S, Li R-Q, et al. RAS mutations in acute myeloid leukaemia patients: A review and meta-analysis. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. févr 2019;489:254-60.
63. Moison C, Lavallée V-P, Thiollier C, Lehnertz B, Boivin I, Mayotte N, et al. Complex karyotype AML displays G2/M signature and hypersensitivity to PLK1 inhibition. *Blood Adv*. 26 févr 2019;3(4):552-63.
64. Cutts BA, Sjogren A-KM, Andersson KME, Wahlstrom AM, Karlsson C, Swolin B, et al. Nf1 deficiency cooperates with oncogenic K-RAS to induce acute myeloid leukemia in mice. *Blood*. 22 oct 2009;114(17):3629-32.
65. Yang G, Khalaf W, van de Locht L, Jansen JH, Gao M, Thompson MA, et al. Transcriptional repression of the Neurofibromatosis-1 tumor suppressor by the t(8;21) fusion protein. *Mol Cell Biol*. juill 2005;25(14):5869-79.
66. Lenarduzzi M, Hui ABY, Alajez NM, Shi W, Williams J, Yue S, et al. MicroRNA-193b enhances tumor progression via down regulation of neurofibromin 1. *PLoS One*. 2013;8(1):e53765.
67. Donovan S, See W, Bonifas J, Stokoe D, Shannon KM. Hyperactivation of protein kinase B and ERK have discrete effects on survival, proliferation, and cytokine expression in Nf1-deficient myeloid cells. *Cancer Cell*. 1 déc 2002;2(6):507-14.
68. Nonami A, Sattler M, Weisberg E, Liu Q, Zhang J, Patricelli MP, et al. Identification of novel therapeutic targets in acute leukemias with NRAS mutations using a pharmacologic approach. *Blood*. 14 mai 2015;125(20):3133-43.
69. Li S, Balmain A, Counter CM. A model for RAS mutation patterns in cancers: finding the sweet spot. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(12):767-77.
70. Al-Lazikani B, Banerji U, Workman P. Combinatorial drug therapy for cancer in the post-genomic era. *Nat Biotechnol*. 10 juill 2012;30(7):679-92.
71. Bertolini F, Sukhatme VP, Bouche G. Drug repurposing in oncology--patient and health systems opportunities. *Nat Rev Clin Oncol*. déc 2015;12(12):732-42.



72. Momtazi-Borojeni AA, Abdollahi E, Ghasemi F, Caraglia M, Sahebkar A. The novel role of pyrvinium in cancer therapy. *J Cell Physiol.* 2018;233(4):2871-81.
73. Chen B, Ma L, Paik H, Sirota M, Wei W, Chua M-S, et al. Reversal of cancer gene expression correlates with drug efficacy and reveals therapeutic targets. *Nat Commun.* 12 2017;8:16022.
74. Xiang W, Cheong JK, Ang SH, Teo B, Xu P, Asari K, et al. Pyrvinium selectively targets blast phase-chronic myeloid leukemia through inhibition of mitochondrial respiration. *Oncotarget.* 20 oct 2015;6(32):33769-80.
75. Harada Y, Ishii I, Hatake K, Kasahara T. Pyrvinium pamoate inhibits proliferation of myeloma/erythroleukemia cells by suppressing mitochondrial respiratory complex I and STAT3. *Cancer Lett.* 1 juin 2012;319(1):83-8.
76. Xiao M, Zhang L, Zhou Y, Rajoria P, Wang C. Pyrvinium selectively induces apoptosis of lymphoma cells through impairing mitochondrial functions and JAK2/STAT5. *Biochem Biophys Res Commun.* 15 janv 2016;469(3):716-22.
77. Fu Y-H, Lu W-H, Lan P-Q, Hu C-Y, Chen C-Y, Ou D-L, et al. Pyrvinium Pamoate Overcomes Cabozantinib-Resistance of FLT3-ITD AML Cells through Modulating the Mitochondria Functions and Signaling Pathways. *Blood.* 21 nov 2018;132(Suppl 1):4683-4683.
78. Ying H, Kimmelman AC, Lyssiotis CA, Hua S, Chu GC, Fletcher-Sananikone E, et al. Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell.* 27 avr 2012;149(3):656-70.
79. Yun J, Rago C, Cheong I, Pagliarini R, Angenendt P, Rajagopalan H, et al. Glucose deprivation contributes to the development of KRAS pathway mutations in tumor cells. *Science.* 18 sept 2009;325(5947):1555-9.
80. Haq R, Shoag J, Andreu-Perez P, Yokoyama S, Edelman H, Rowe GC, et al. Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1 $\alpha$  and MITF. *Cancer Cell.* 18 mars 2013;23(3):302-15.
81. Serasinghe MN, Gelles JD, Li K, Zhao L, Abbate F, Syku M, et al. Dual suppression of inner and outer mitochondrial membrane functions augments apoptotic responses to oncogenic MAPK inhibition. *Cell Death Dis.* 18 2018;9(2):29.
82. Ostrem JM, Peters U, Sos ML, Wells JA, Shokat KM. K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature.* 28 nov 2013;503(7477):548-51.
83. Mainardi S, Mulero-Sánchez A, Prahallad A, Germano G, Bosma A, Krimpenfort P, et al. SHP2 is required for growth of KRAS-mutant non-small-cell lung cancer in vivo. *Nat Med.* 2018;24(7):961-7.
84. Wong GS, Zhou J, Liu JB, Wu Z, Xu X, Li T, et al. Targeting wild-type KRAS-amplified gastroesophageal cancer through combined MEK and SHP2 inhibition. *Nat Med.* 2018;24(7):968-77.
85. Nichols RJ, Haderk F, Stahlhut C, Schulze CJ, Hemmati G, Wildes D, et al. RAS nucleotide cycling underlies the SHP2 phosphatase dependence of mutant BRAF-, NF1- and RAS-driven cancers. *Nat Cell Biol.* 2018;20(9):1064-73.

## Discussion

RAS est l'un des oncogènes les plus fréquemment mutés dans les cancers humains (Kandoth et al. 2013). Dans les LAM, seuls 15% des cas ont des mutations de *NRAS* ou *KRAS*. Cependant, de nombreux autres mécanismes peuvent concourir à activer cette voie de signalisation essentielle à la survie et à la prolifération cellulaire, deux des caractéristiques les plus importantes de la cellule tumorale (Simanshu, Nissley, and McCormick 2017). Les syndromes génétiques du groupe RASopathies nous apprennent en effet que malgré la diversité des mutations rencontrées, les pathologies concernées partagent des caractéristiques phénotypiques et une même prédisposition aux cancers, résultant de l'activation aberrante de la voie RAS (Tajan et al. 2018). Par homologie, nous avons donc cherché à décrire la répartition des altérations de ces gènes concourant à l'activation de la voie RAS dans les LAM, en utilisant des panels NGS ciblés permettant une profondeur d'analyse supérieure aux approches couvrant l'ensemble des régions codantes, ayant ainsi le potentiel de détecter plus de mutations faiblement représentées dans un échantillon donné. A notre connaissance, notre étude est la première à aborder l'activation de la voie RAS dans son ensemble dans les LAM.

Nous avons fait le choix de restreindre notre étude aux LAM n'ayant pas un pronostic favorable selon la classification de l'ELN. Bien que les mutations de *RAS* aient un rôle important dans les LAM CBF, et probablement également lorsqu'elles sont associées aux mutations de *NPM1*, nous avons voulu nous concentrer sur une population plus homogène et défavorisée par les traitements actuels. Nous avons également exclu les mutations de *FLT3-ITD* qui sont généralement mutuellement exclusives des mutations de *RAS* (Cancer Genome Atlas Research Network 2013).

Parmi les 127 patients de notre cohorte, nous avons observé 40% de patients ayant une altération de l'un des gènes de la voie RAS. Cette proportion est plus importante que celles des cohortes Beat AML (35%) et TCGA (19%), que nous avons ré analysées en appliquant les critères de sélection sus-décrits. La profondeur de notre panel NGS peut en être l'une des raisons. Par ailleurs, les délétions de *NF1* n'ont pas été analysées dans la cohorte Beat AML. Dans notre étude, les différentes altérations sont cependant distribuées comme décrit précédemment, avec une majorité de mutations de *NRAS* (10,4% des patients), *KRAS* (8%) et *PTPN11* (7.2%) sous les formes décrites (par ex. *NRAS*<sup>G12</sup>). Nous avons également observé des mutations plus rares affectant *CBL*, *BRAF*, *MAP2K2*, *RASA1*, *SOS1* et *RAF1*. Aucune mutation n'a été observée dans les régulateurs négatifs de la voie, tels que *DUSP6* ou les membres de la famille *SPRED* et *SPRY*, ce qui est cohérent avec les données publiées. En effet, la base de données COSMIC ne rapporte qu'une mutation de *SPRED1*, une mutation de *SPRED2* et 3 mutations de *SPRY3* parmi tous les cas de LAM disponibles. Nous avons observé 5,5% de mutations de *NF1*, ce qui semble, dans notre population sélectionnée, assez similaire aux études précédentes (Haferlach et

al. 2012; Boudry-Labis et al. 2013; Eisfeld et al. 2018). Contrairement à l'étude d'Eisfeld *et al.*, nous n'avons trouvé aucune mutation au hotspot identifié sur le résidu T676 (ou I679 d'après (Vandepoele, Van der Meulen, and Denys 2018)). Sans qu'il n'y ait d'explications évidentes, nous avons observé moins de délétions cryptiques de *NF1* que précédemment rapportées, la plupart des délétions identifiées étant observables sur le caryotype. Il est à noter que les résultats obtenus avec l'étude par FISH concordent avec ceux obtenus avec l'étude de la variation du nombre de copies en NGS, à l'exception de 3 cas uniquement observés grâce à la FISH. Un seul patient ayant une mutation de *NF1* possède également une délétion de *NF1*. *NF1* étant décrit comme un gène suppresseur de tumeur, plusieurs auteurs ont recherché des associations entre mutations inactivatrices et délétions de l'autre allèle. Les données sur ce sujet varient en fonction des études, allant de 18 à 51,7% (Parkin et al. 2010; Boudry-Labis et al. 2013; Haferlach et al. 2012). Haferlach *et al.* ont décrit pour les patients n'ayant pas d'inactivation de l'autre allèle, la présence de mutations associées de *NRAS*; tandis que Parkin *et al.* ont retrouvé une plus faible, voire une absence, d'expression de *NF1* chez les patients ayant une délétion d'une seule copie du gène, pouvant évoquer une régulation transcriptionnelle de l'autre allèle (Haferlach et al. 2012; Parkin et al. 2010). Nous n'avons observé aucune association entre délétions ou mutations de *NF1* et mutation de *NRAS*. De plus, l'absence de matériel pour ces échantillons, ne nous a pas permis de corrélérer l'expression de *NF1* au statut mutationnel ou délété de ce gène. Parmi l'ensemble des patients ayant une altération de la voie RAS il existait une incidence plus élevée de risque défavorable et de caryotype défavorable, qui est principalement due à la présence des patients ayant une mutation ou une délétion de *NF1* comme rapporté précédemment (Eisfeld et al. 2018; Boudry-Labis et al. 2013).

De façon similaire aux études portant sur d'autres cancers avec altérations de *NF1*, telles que les LMMJ, nous avons observé de fréquentes co-altérations de membres du PRC2 : *EZH2*, *EED* et *SUZ12* (Caye et al. 2015; Stieglitz et al. 2015; De Raedt et al. 2014). Il s'agissait majoritairement de mutations ponctuelles d'*EZH2* ou de délétions de *EZH2*, *EED* et *SUZ12*, évaluées par l'étude des variations du nombre de copies. Une étude récente a suggéré qu'ils étaient responsables d'un profil de méthylation altéré conduisant à la transcription de gènes également régulés par RAS (De Raedt et al. 2014). Ces résultats suggèrent qu'ils pourraient participer à la leucémogénèse en renforçant la signature RAS activée. *NF1* étant situé sur le chromosome 17, *EZH2* sur le chromosome 7, *EED* sur le chromosome 11 et *SUZ12* sur le chromosome 17, certaines de ces co-altérations sont le reflet d'anomalies chromosomiques fréquentes dans les LAM. Cela ne préjuge pour autant pas de l'absence d'implication de ces altérations dans la maladie. En effet, Zhao *et al.*, ont démontré que les co-altérations de *Nf1*, *Spry4* et *Trp5,3* fréquentes en cas de caryotypes complexes, pouvaient initier la leucémogénèse chez la souris (Z. Zhao et al. 2015). Une modélisation de ces altérations ainsi que l'étude du transcriptome

et des profils de méthylation de ces échantillons seraient pertinentes à mener afin de confirmer ces hypothèses.

Les altérations de *RAS*, *NF1* et *PTPN11* ont été principalement décrits comme des événements tardifs de la leucémogénèse (Hirsch et al. 2016; Tuval and Shlush 2019; Corces-Zimmerman et al. 2014). L'étude des VAF des différentes mutations chez nos patients mutés décrit plusieurs possibilités : la mutation peut être présente dans le clone principal, ou dans un des sous-clones. Par ailleurs, 25% de nos patients mutés sur un gène des RASopathies présentaient deux altérations ou plus de la voie RAS. Deux scénarios sont alors possibles : les mutations peuvent évoluer dans le même clone soutenant le principe « d'effet dose » de l'activation de RAS décrit dans les LMMJ (Caye et al. 2015) ou, elles sont présentes dans des sous-clones différents, ce qui serait en faveur du concept d'interférence clonale décrit notamment dans les LAM CBF (Hirsch et al. 2016; Itzykson et al. 2018). En l'absence de séquençage de colonies isolées, nous ne pouvons pas préjuger des mécanismes impliqués pour nos échantillons. Cependant, dans le cas de l'existence de plusieurs mutations de *NRAS* survenant au niveau de loci proches (G12 ou G13), nous avons observé que ces mutations étaient présentes sur des allèles distincts, ce qui suggère qu'elles se produisent en parallèle. Un séquençage de colonies isolées ou un séquençage à l'échelle unicellulaire, nous permettra de répondre à cette question afin de mieux décrypter les mécanismes d'architecture clonale.

L'implication des mutations de l'ensemble des acteurs de la voie RAS dans le pronostic des LAM n'a pour l'instant jamais été rapportée. L'impact pronostic des mutations de *NRAS* et *KRAS* est controversé. La plupart des grandes études n'ont pas retrouvé d'impact pronostic (Bowen et al. 2005; Bacher et al. 2006; Ritter et al. 2004; Illmer et al. 2005; X. Liu et al. 2019; Papaemmanuil et al. 2016), d'autres ont rapporté un pronostic défavorable (De Melo et al. 1997; Zhou et al. 2017; Kiyoi et al. 1999). Pour Papaemmanuil *et al.*, un sous-groupe de patients ayant des mutations de *NRAS*, *DNMT3A* et *NPM1* aurait un pronostic favorable (Papaemmanuil et al. 2016). Concernant *NF1*, une diminution de la survie globale a été observée chez des patients jeunes porteurs de mutations de *NF1* au sein du sous-groupe ELN défavorable (Eisfeld et al. 2018). Notre étude montre une diminution de la survie globale chez les patients ayant une mutation d'un des gènes des RASopathies et cela en particulier dans le sous-groupe ELN intermédiaire. Cela n'a pas pu être confirmé sur les deux cohortes TCGA et Beat AML, qui comprennent cependant moins de patients mutés que notre cohorte. Par ailleurs, nous soulignons un impact délétère de l'association à une faible expression de *NF1*. Parkin *et al.* ont montré qu'une faible expression de *NF1* était associée à une augmentation de RAS lié au GTP, et du nombre de colonies CD34+/CD38- obtenues en méthylcellulose à partir d'échantillons primaires. Par ailleurs, une collaboration entre des altérations de *NF1* et des mutations de *RAS* a été décrite dans des modèles murins (Cutts et al. 2009), ainsi que dans les LMMJ (Caye et al. 2015). Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine de cette faible expression comme par exemple, une méthylation du promoteur de *NF1*

(G. Yang et al. 2005) ou la surexpression de micro ARN spécifiques (Lenarduzzi et al. 2013). Ces résultats suggèrent donc qu'une plus forte activation de la voie RAS pourrait être associée à un moins bon pronostic ou que la diversité des mécanismes concourant à cette activation peut être à l'origine d'une chimiorésistance. En outre, ce mauvais pronostic justifie pleinement la recherche de thérapies innovantes pour ces patients.

Nous avons établi deux modèles robustes d'activation de la voie RAS dans des lignées cellulaires; invalidées pour NF1 par CRISPR/Cas9 d'une part et exprimant *NRAS*<sup>G12D</sup> d'autre part. Ces deux modèles ont montré une addiction oncogénique à la voie RAS comme l'attestent l'activation de la voie des MAPKs, l'augmentation des formes RAS-GTP, une croissance cellulaire en absence de facteurs de croissance, la tumorigénicité accrue dans les modèles murins, un défaut de différenciation et une cytotoxicité accrue lors de l'exposition aux inhibiteurs de MEK. Le rôle de *NRAS*<sup>G12D</sup> était connu dans les LAM (Nonami et al. 2015). Cependant, à notre connaissance, nous montrons pour la première fois que l'inactivation de *NF1* peut être responsable d'une addiction oncogénique dans les LAM. En effet, des progéniteurs granulo-macrophagiques établis à partir de cellules murines de foie fœtal transformées par le virus c-Myb, montraient une prolifération cellulaire indépendante des facteurs de croissance exogènes ainsi qu'une activation des voies MAPK et PI3K lors de l'inactivation homozygote de *Nf1* (Donovan et al. 2002). Cependant, contrairement à notre modèle, les cellules étaient dépendantes d'une production autocrine de GM-CSF, ce qui évoquait donc plutôt une LMMJ, maladie caractérisée par une hypersensibilité au GM-CSF et une capacité de différenciation préservée (Birnbaum et al. 2000).

Le tramétinib est très efficace dans les contextes d'activation de la voie RAS (Jing et al. 2012; Pemovska et al. 2013; Tyner et al. 2018) comme cela est souligné dans nos modèles, *in vitro* et *in vivo*. Nous avons aussi montré une grande sensibilité des échantillons primaires dans les expériences de clonogénicité en méthylcellulose, y compris pour les échantillons ne présentant pas de mutations de la voie RAS. En effet, outre les mutations, il a été montré une corrélation entre le niveau de phosphorylation de ERK et la sensibilité au tramétinib (Maria Rosaria Ricciardi et al. 2012; Jing et al. 2012). Par ailleurs, chez les patients ayant une mutation RASopathie, nous avons observé que la sensibilité à l'inhibiteur semblait dépendre du type de mutation, les patients les plus sensibles étant mutés *NRAS* au niveau du codon 12 et les plus résistants ayant notamment des mutations de *PTPN11*. Dans la cohorte Beat AML, la sensibilité des échantillons au tramétinib et au sélumétinib (un autre inhibiteur de MEK) n'a pas montré de spécificité en fonction des mutations. Cependant, les conditions de culture étaient différentes : nous avons effectué un test de clonogénicité à 7 jours, tandis que les auteurs de ce travail ont utilisé un test de prolifération cellulaire CellTiter 96® AQueous One (Promega) en culture liquide à 72h. Nous avons également remarqué que parmi les patients avec altérations de la voie RAS, ceux ayant des mutations *NRAS*<sup>G12</sup> ou *NRAS*<sup>Q61L</sup>, dont les échantillons étaient les plus sensibles à l'inhibition

de MEK *in vitro*, avaient une tendance à avoir une meilleure survie. La voie RAS fait partie d'un réseau complexe qui comprend de nombreux acteurs interconnectés ; GAPs, GEFs, protéines d'échaffaudage, phosphatases, récepteurs membranaires etc. Les différences de sensibilité peuvent donc s'expliquer au regard des spécificités existant pour chaque mutation, comme cela est également le cas au sein même des mutations de RAS (S. Li, Balmain, and Counter 2018). La modélisation d'autres altérations comme les mutations de *PTPN11* pourrait nous permettre de décrypter plus finement ces différences. Par ailleurs, des résistances aux inhibiteurs de MEK ont été décrites, résultant de l'acquisition de mutations, de l'activation de boucles de rétroaction ou de la redondance de différentes voies de signalisation (Caunt et al. 2015). Il est ainsi assez attendu que les essais thérapeutiques des inhibiteurs de MEK utilisés en monothérapie dans les LAM aient été plutôt décevants (Jain et al. 2014; Borthakur et al. 2016).

Nous avons donc utilisé nos modèles pour effectuer un crible pharmacologique à forte densité d'une banque de 1280 composés disponibles en clinique, et identifié le pyrvinium pamoate comme étant hautement efficace dans nos lignées avec activation de la voie RAS. Il s'agit d'un anti-helminthique approuvé en 1955 par la *Food and Drug Administration* (FDA) (NDA-9582) pour traiter l'oxyurose (Momtazi-Borojeni et al. 2018). Ce composé induit une diminution spectaculaire de la viabilité cellulaire dans nos différents modèles RAS activés en culture liquide, mais également dans les essais clonogéniques sur les échantillons primaires. Des expériences dans des modèles murins, afin de tester son efficacité *in vivo*, sont en cours. A défaut d'un ciblage direct de RAS ou d'un de ses effecteurs, nous avons émis l'hypothèse que son action serait dirigée contre une addiction non-oncogénique de la cellule tumorale, existant dans le contexte de l'activation de RAS. De nombreux mécanismes d'action de ce médicament ont été décrits, comme l'inhibition de la réponse aux protéines mal repliées (D.-H. Yu et al. 2008), l'inhibition de la voie PI3K (Carrella et al. 2016), l'inhibition de l'autophagie (Deng et al. 2013), l'inhibition des voies Wnt, Hedgehog, ou une action sur le métabolisme énergétique. Parmi ceux-ci, l'inhibition de la voie Wnt /  $\beta$  caténine a été particulièrement bien documentée dans plusieurs cancers: cancers du sein, hépatocarcinomes et adénocarcinomes colorectaux (W. Xu et al. 2013; B. Chen et al. 2017; Thorne et al. 2010). Cependant, nous n'avons observé aucune activation de cette voie *in vitro* dans nos modèles. En revanche, le pyrvinium pamoate a fortement diminué les taux de consommation d'oxygène basal et maximal des cellules leucémiques, plaidant en faveur d'une action sur le métabolisme énergétique et la respiration mitochondriale. Ces résultats concordent avec l'inhibition de la phosphorylation oxydative observée dans d'autres hémopathies (Xiao et al. 2016; Harada et al. 2012; Xiang et al. 2015) et également récemment dans des LAM caractérisées par la mutation *FLT3-ITD* et résistantes aux inhibiteurs de tyrosine kinase (Y.-H. Fu et al. 2018). Cependant, d'autres investigations sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

L'association de ce traitement au tramétinib a montré une forte synergie quels que soient les modèles et les conditions de culture utilisés. Dans les échantillons primaires de LAM avec mutation RASopathie, l'association était très efficace, réduisant considérablement la viabilité cellulaire lors des cultures courtes et la formation de colonies lors des essais clonogéniques. Il a été montré que l'activation de RAS dans les cancers, orchestre une reprogrammation du métabolisme énergétique. La spécificité de ces changements semble toutefois dépendre du type cellulaire. En effet, dans certains modèles, une reprogrammation vers la glycolyse aérobie a été constatée (Ying et al. 2012; Yun et al. 2009; Haq et al. 2013), de même que l'utilisation des produits intermédiaires de la glycolyse par des voies anaboliques comme la voie des pentoses phosphates et la voie de la biosynthèse de l'hexosamine (Ying et al. 2012). Dans d'autres modèles il a été observé une forte augmentation de la respiration mitochondriale (Telang et al. 2007; de Groof et al. 2009). En parallèle d'autres voies peuvent être activées comme l'autophagie (Guo and White 2013), la micropinocytose (Commisso et al. 2013), la biogenèse mitochondriale (Fisher et al. 2011). Il a également été démontré que les inhibiteurs de MEK pouvaient inverser le phénotype glycolytique au profit de la respiration mitochondriale (Haq et al. 2013; Serasinghe et al. 2018). Il existe peu de données sur les effets de l'activation de RAS sur le métabolisme dans le contexte des LAM. Nous émettons l'hypothèse que dans les LAM ayant une activation de RAS, le tramétinib inhiberait la glycolyse induite par RAS en réprimant MEK, rendant ainsi les cellules dépendantes de la respiration mitochondriale et de ce fait très sensibles au pyrvinium pamoate. Cependant, des investigations sont nécessaires pour évaluer cette hypothèse, de même que pour explorer d'avantage les effets des différentes mutations de la voie RAS sur le métabolisme de la cellule leucémique.

Au total, nous avons pu montrer qu'un sous-groupe de patients caractérisé par des mutations de la voie RAS avait un pronostic défavorable avec les traitements de chimiothérapies actuels. Grâce à un criblage pharmacologique ayant pour but le repositionnement de molécules déjà disponibles, nous avons identifié le pyrvinium pamoate comme traitement actif dans ce sous-groupe de patient, agissant en synergie avec le tramétinib, un inhibiteur de MEK. Le développement clinique du pyrvinium pamoate seul tout d'abord, puis en association à la chimiothérapie et/ou aux inhibiteurs de MEK pourrait apporter un bénéfice aux patients atteints de LAM ayant des altérations d'un des gènes de la voie RAS.

## Conclusions et perspectives

Mon travail a permis de décrire la répartition et l'impact des mutations des acteurs de la voie RAS parmi les patients ayant des LAM et pour lesquels les traitements actuels ne sont pas suffisamment efficaces, puis d'identifier une nouvelle stratégie thérapeutique efficace et synergique dans des modèles pré-cliniques associant un inhibiteur de MEK (le tramétinib) et le pyrvinium pamoate.

La première partie se concentrait sur la description d'une cohorte de patients atteints de LAM et a identifié un sous-groupe particulier caractérisé par des altérations de gènes de la voie RAS. Les gènes concernés sont, dans la plus grande majorité des cas : *NF1*, *NRAS*, *KRAS*, *PTPN11*, *CBL* et *BRAF* déjà décrits. Les données de *whole exome sequencing* de plusieurs grandes études n'avaient pas montré d'altérations majeures d'autres gènes de la voie RAS, cependant à l'aide d'un séquençage ciblé avec une profondeur importante, nous pensons pouvoir identifier des variants plus rares. Nous avons par ailleurs été confrontés à des altérations géniques d'allures constitutionnelles et de signification parfois indéterminée constituant des variants rares en population générale (données non montrées). Il serait intéressant, dans un prochain travail d'approfondir leur étude dans la perspective de mettre en évidence des polymorphismes de prédisposition génétique aux LAM. Cela impliquera d'avoir accès à l'ADN constitutif non tumoral de ces patients, par exemple lors de biopsies cutanées ce qui n'a pas été possible lors de notre étude.

En considérant ces patients comme une entité particulière de LAM, nous avons pu montrer que les altérations portant sur la voie RAS leur conféraient un moins bon pronostic et étaient associées à des marqueurs d'une prolifération cellulaire accrue. Afin de préciser le rôle de ces mutations dans l'ontogenèse de la maladie (événement précoce ou tardif ?), une étude fine de l'architecture clonale devra être réalisée à l'échelle unicellulaire. A titre d'exemple, j'ai récemment obtenu un prélèvement frais à la rechute d'un patient ayant de multiples sous-clones mutés RAS (patient 155 décrit dans les résultats). De manière notable, aucune des colonies observées lors de culture en méthylcellulose n'avait de mutation de *NRAS* ou *KRAS* ce qui a été corroboré par le séquençage NGS de l'ADN tumoral de la rechute. La description de l'environnement mutationnel et l'établissement de corrélations entre une mutation de la voie RAS donnée et d'autres mutations permettra également de comprendre les différences qu'il peut exister entre les mutations de RAS elles-mêmes (niveau d'activation de la voie, mécanisme de résistance propre etc.) dans le contexte spécifique de la LAM.

Nous avons établi des modèles de LAM avec activation de la voie RAS à partir de lignées cellulaires. Ces modèles ont montré une grande sensibilité à l'inhibiteur de MEK tramétinib, *in vitro* et *in vivo*. Afin de compléter l'éventail mutationnel et de confirmer la singularité de l'entité décrite grâce à la cohorte de patients, des modélisations des mutations de *PTPN11* et *KRAS* sont à réaliser. Un modèle de cellules



de la lignée TF-1 transduites avec un vecteur possédant la mutation *PTPN11*<sup>E76K</sup> a déjà été publié et montrait une croissance indépendante des cytokines grâce à une activation de MEK conduisant à l'expression de BCL-XL (Y. Ren et al. 2007). En revanche, les résultats obtenus après expression des mutations E76K, et D61Y de *PTPN11* dans le modèle murin BaF/3 sont controversés dans la littérature (Mohi et al. 2005; M. L. Loh et al. 2004). Nous prévoyons donc de tester les mutations A72V et D61Y que nous avons retrouvées dans notre cohorte dans ces deux lignées cellulaires et de tester leur sensibilité vis-à-vis du tramétinib et du pyrvinium pamoate comparativement à nos autres modèles. Nous avons également montré que l'efficacité du tramétinib en monothérapie sur les échantillons de patients ayant des mutations de la voie RAS était hétérogène, ce qui suggère l'existence de mécanismes de résistance ou des différences de signalisation cellulaire et de niveau d'activation de RAS relatifs aux différentes mutations. L'utilisation des différents modèles obtenus pourrait nous aider à décrypter ces différences. Cependant, la diversité des mutations et anomalies chromosomiques présentes dans ces lignées et la difficulté de trouver des contrôles pertinents en font des modèles imparfaits. Nous avons prévu de réaliser du séquençage d'ARN sur les échantillons de patients que nous pourrions coupler à l'analyse des données de la cohorte Beat. Le but serait dans un premier temps de décrire des signatures transcriptomiques relatives aux patients avec activation de RAS, mais aussi de chaque groupe de mutation afin de trouver des pistes pour mieux en cerner les différences. Par ailleurs, l'association d'altérations de *NF1* aux anomalies du PRC2, décrite dans d'autres modèles d'oncogenèse et identifiée dans notre cohorte est particulièrement intéressante. J'ai donc tenté de modéliser ces altérations du PRC2 en construisant des ARN interférents ciblant *EZH2* que j'ai introduits dans les modèles TF-1 CRISPR *NF1* (données non montrées). Les premiers résultats n'ont pas permis de déceler de différence en termes de prolifération cellulaire, de clonogénicité et de sensibilité au tramétinib. Il serait cependant pertinent d'étudier la transcription de gènes en aval de RAS ainsi que la méthylation dans ces modèles et dans d'autres modèles d'inactivation de *SUZ12* et *EED*.

L'hétérogénéité de la réponse au tramétinib parmi les patients atteints de LAM suggère un bénéfice à une utilisation combinée. Grâce à un criblage pharmacologique à haut débit de nos modèles, nous avons identifié le pyrvinium pamoate, un agent anti-helminthique, comme potentiellement actif dans les LAM avec mutations de la voie RAS, permettant son repositionnement en tant que drogue anti-cancéreuse. Il est par ailleurs hautement synergique avec le tramétinib dans les différents modèles cellulaires ainsi que dans les échantillons primaires de LAM avec mutations de la voie RAS, en culture liquide courte et lors des essais clonogéniques. Dans ce contexte, son mécanisme d'action semble reposer sur l'inhibition de la respiration mitochondriale. Cibler la phosphorylation oxydative et les fonctions mitochondriales dans les LAM a montré des résultats prometteurs dans plusieurs études récentes (Molina et al. 2018; Skrtić et al. 2011; Baccelli et al. 2019; C. L. Jones et al. 2018; Pollyea et al. 2018). Une étude métabolique plus avancée va être réalisée pour confirmer les résultats obtenus avec

le pyrvinium. Des expériences de viabilité cellulaire dans des milieux déprivés en glucose, ne comprenant que du galactose (favorisant la phosphorylation oxydative) ou en présence de metformine (inhibiteur du complexe I de la respiration mitochondriale), ou de 2-Deoxy Glucose (inhibiteur de la glycolyse) sont en cours. Les expériences de Seahorse seront répétées en présence de trametinib et de l'association thérapeutique. Nous tenterons également de détecter la localisation intra-cellulaire du pyrvinium pamoate par des expériences d'immunofluorescence, et son action sur les mitochondries sera aussi appréciée en microscopie électronique. Enfin, une analyse de transcriptome en présence du trametinib, du pyrvinium pamoate ou de l'association, nous permettra de décrypter les expressions différentielles de transporteurs ou d'enzymes clés du métabolisme dans les différentes conditions. Nous souhaitons grâce à cela, identifier plus précisément le complexe de la chaîne respiratoire ciblé, la reprogrammation métabolique engendrée et l'implication des différentes voies métaboliques dans les mécanismes de synergie avec le trametinib. Par ailleurs, la validation de l'efficacité de notre association thérapeutique fait actuellement l'objet d'expériences dans des modèles murins *in vivo* (PDX et CLDX), qui devraient également permettre de tester la toxicité de ce traitement.

Cette association thérapeutique représente donc une perspective thérapeutique dans le sous-groupe de patients ayant des LAM avec mutations de la voie RAS. Etant donné le mécanisme d'action évoqué, plus largement, ce travail ouvre des perspectives sur l'étude de l'implication des mutations de la voie RAS sur le métabolisme de la cellule tumorale dans les LAM. Ce dernier point représente un projet d'envergure et nécessitera de choisir des modèles adaptés. En particulier, l'utilisation de lignées de LAM dont les anomalies géniques et cytogénétiques sont très nombreuses devra être autant que possible limitée. Les échantillons primaires sont particulièrement difficiles à manipuler du fait de la difficulté de leur maintien en culture liquide *ex vivo* et des probables changements métaboliques engendrés par la culture *in vitro*, mais leur étude est fondamentale et devra être couplée à l'utilisation de modèles murins avec mutations de RAS, ainsi qu'éventuellement la réalisation d'études métabolomiques directement chez les patients. Ce travail ouvre donc des perspectives tant thérapeutiques que biologiques dans un groupe de LAM hétérogène et pour le moment incomplètement caractérisé mais dans lequel les besoins de nouvelles approches sont très importants.

# Bibliographie

- Abelson, Sagi, Grace Collord, Stanley W. K. Ng, Omer Weissbrod, Netta Mendelson Cohen, Elisabeth Niemeyer, Noam Barda, et al. 2018. "Prediction of Acute Myeloid Leukaemia Risk in Healthy Individuals." *Nature* 559 (7714): 400–404. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0317-6>.
- Adachi, M., M. Fukuda, and E. Nishida. 2000. "Nuclear Export of MAP Kinase (ERK) Involves a MAP Kinase Kinase (MEK)-Dependent Active Transport Mechanism." *The Journal of Cell Biology* 148 (5): 849–56.
- Agazie, Yehene M., and Michael J. Hayman. 2003. "Molecular Mechanism for a Role of SHP2 in Epidermal Growth Factor Receptor Signaling." *Molecular and Cellular Biology* 23 (21): 7875–86. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.21.7875-7886.2003>.
- Agudo-Ibáñez, Lorena, Fátima Núñez, Fernando Calvo, Inmaculada M. Berenjano, Xosé R. Bustelo, and Piero Crespo. 2007. "Transcriptomal Profiling of Site-Specific Ras Signals." *Cellular Signalling* 19 (11): 2264–76. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.06.025>.
- Ahmadian, M. R., P. Stege, K. Scheffzek, and A. Wittinghofer. 1997. "Confirmation of the Arginine-Finger Hypothesis for the GAP-Stimulated GTP-Hydrolysis Reaction of Ras." *Nature Structural Biology* 4 (9): 686–89.
- Alessi, D. R., Y. Saito, D. G. Campbell, P. Cohen, G. Sithanandam, U. Rapp, A. Ashworth, C. J. Marshall, and S. Cowley. 1994. "Identification of the Sites in MAP Kinase Kinase-1 Phosphorylated by P74raf-1." *The EMBO Journal* 13 (7): 1610–19.
- Amadori, S., W. Arcese, G. Isacchi, G. Meloni, M. C. Petti, B. Monarca, A. M. Testi, and F. Mandelli. 1991. "Mitoxantrone, Etoposide, and Intermediate-Dose Cytarabine: An Effective and Tolerable Regimen for the Treatment of Refractory Acute Myeloid Leukemia." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 9 (7): 1210–14. <https://doi.org/10.1200/JCO.1991.9.7.1210>.
- Ambrogio, Chiara, Jens Köhler, Zhi-Wei Zhou, Haiyun Wang, Raymond Paranal, Jiaqi Li, Marzia Capelletti, et al. 2018. "KRAS Dimerization Impacts MEK Inhibitor Sensitivity and Oncogenic Activity of Mutant KRAS." *Cell* 172 (4): 857-868.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.020>.
- Anderson, Grace R., Peter S. Winter, Kevin H. Lin, Daniel P. Nussbaum, Merve Cakir, Elizabeth M. Stein, Ryan S. Soderquist, et al. 2017. "A Landscape of Therapeutic Cooperativity in KRAS Mutant Cancers Reveals Principles for Controlling Tumor Evolution." *Cell Reports* 20 (4): 999–1015. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.07.006>.
- Aoki, Yoko, Tetsuya Niihori, Shin-ichi Inoue, and Yoichi Matsubara. 2016. "Recent Advances in RASopathies." *Journal of Human Genetics* 61 (1): 33–39. <https://doi.org/10.1038/jhg.2015.114>.
- Apolloni, A., I. A. Prior, M. Lindsay, R. G. Parton, and J. F. Hancock. 2000. "H-Ras but Not K-Ras Traffics to the Plasma Membrane through the Exocytic Pathway." *Molecular and Cellular Biology* 20 (7): 2475–87.
- Araki, Toshiyuki, M. Golam Mohi, Fraz A. Ismat, Roderick T. Bronson, Ifor R. Williams, Jeffery L. Kutok, Wentian Yang, et al. 2004. "Mouse Model of Noonan Syndrome Reveals Cell Type- and Gene Dosage-Dependent Effects of Ptpn11 Mutation." *Nature Medicine* 10 (8): 849–57. <https://doi.org/10.1038/nm1084>.
- Arber, Daniel A., Attilio Orazi, Robert Hasserjian, Jürgen Thiele, Michael J. Borowitz, Michelle M. Le Beau, Clara D. Bloomfield, Mario Cazzola, and James W. Vardiman. 2016. "The 2016 Revision to the World Health Organization Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia." *Blood* 127 (20): 2391–2405. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-643544>.
- Armistead, Paul M., Marcos de Lima, Sherry Pierce, Wei Qiao, Xuemei Wang, Peter F. Thall, Sergio Giralt, et al. 2009. "Quantifying the Survival Benefit for Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Relapsed Acute Myelogenous Leukemia." *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 15 (11): 1431–38. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2009.07.008>.
- Armitage, P., and R. Doll. 1954. "The Age Distribution of Cancer and a Multi-Stage Theory of Carcinogenesis." *British Journal of Cancer* 8 (1): 1–12.
- Aronheim, A., D. Engelberg, N. Li, N. al-Alawi, J. Schlessinger, and M. Karin. 1994. "Membrane Targeting of the Nucleotide Exchange Factor Sos Is Sufficient for Activating the Ras Signaling Pathway." *Cell* 78 (6): 949–61.

- Athuluri-Divakar, Sai Krishna, Rodrigo Vasquez-Del Carpio, Kaushik Dutta, Stacey J. Baker, Stephen C. Cosenza, Indranil Basu, Yogesh K. Gupta, et al. 2016. "A Small Molecule RAS-Mimetic Disrupts RAS Association with Effector Proteins to Block Signaling." *Cell* 165 (3): 643–55. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.045>.
- Baccelli, Irène, Yves Gareau, Bernhard Lehnertz, Stéphane Gingras, Jean-François Spinella, Sophie Corneau, Nadine Mayotte, et al. 2019. "Mubritinib Targets the Electron Transport Chain Complex I and Reveals the Landscape of OXPHOS Dependency in Acute Myeloid Leukemia." *Cancer Cell* 36 (1): 84–99.e8. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.06.003>.
- Bacher, Ulrike, Torsten Haferlach, Claudia Schoch, Wolfgang Kern, and Susanne Schnittger. 2006. "Implications of NRAS Mutations in AML: A Study of 2502 Patients." *Blood* 107 (10): 3847–53. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-08-3522>.
- Balmanno, K., and S. J. Cook. 2009. "Tumour Cell Survival Signalling by the ERK1/2 Pathway." *Cell Death and Differentiation* 16 (3): 368–77. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.148>.
- Barretina, Jordi, Barry S. Taylor, Shantanu Banerji, Alexis H. Ramos, Mariana Lagos-Quintana, Penelope L. Decarolis, Kinjal Shah, et al. 2010. "Subtype-Specific Genomic Alterations Define New Targets for Soft-Tissue Sarcoma Therapy." *Nature Genetics* 42 (8): 715–21. <https://doi.org/10.1038/ng.619>.
- Bäsecke, Jörg, Maike Schwieger, Frank Griesinger, Bernd Schiedmeier, Gerald Wulf, Lorenz Trümper, and Carol Stocking. 2005. "AML1/ETO Promotes the Maintenance of Early Hematopoietic Progenitors in NOD/SCID Mice but Does Not Abrogate Their Lineage Specific Differentiation." *Leukemia & Lymphoma* 46 (2): 265–72. <https://doi.org/10.1080/10428190400010767>.
- Bashey, A., R. Gill, S. Levi, C. J. Farr, R. Clutterbuck, J. L. Millar, I. B. Pragnell, and C. J. Marshall. 1992. "Mutational Activation of the N-Ras Oncogene Assessed in Primary Clonogenic Culture of Acute Myeloid Leukemia (AML): Implications for the Role of N-Ras Mutation in AML Pathogenesis." *Blood* 79 (4): 981–89.
- Bendell, Johanna C., Yung-Jue Bang, Cheng Ean Chee, David P. Ryan, Autumn Jackson McRee, Laura Q. Chow, Jayesh Desai, et al. 2018. "A Phase Ib Study of Safety and Clinical Activity of Atezolizumab (A) and Cobimetinib (C) in Patients (Pts) with Metastatic Colorectal Cancer (MCRC)." *Journal of Clinical Oncology* 36 (4\_suppl): 560–560. [https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.4\\_suppl.560](https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.4_suppl.560).
- Bennett, A. M., T. L. Tang, S. Sugimoto, C. T. Walsh, and B. G. Neel. 1994. "Protein-Tyrosine-Phosphatase SHPTP2 Couples Platelet-Derived Growth Factor Receptor Beta to Ras." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (15): 7335–39. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.15.7335>.
- Bennett, J. M., D. Catovsky, M. T. Daniel, G. Flandrin, D. A. Galton, H. R. Gralnick, and C. Sultan. 1976. "Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias. French-American-British (FAB) Co-Operative Group." *British Journal of Haematology* 33 (4): 451–58.
- Bernards, Andre, and Jeffrey Settleman. 2004. "GAP Control: Regulating the Regulators of Small GTPases." *Trends in Cell Biology* 14 (7): 377–85. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.05.003>.
- Berndt, Norbert, Andrew D. Hamilton, and Saïd M. Sebti. 2011. "Targeting Protein Prenylation for Cancer Therapy." *Nature Reviews. Cancer* 11 (11): 775–91. <https://doi.org/10.1038/nrc3151>.
- Bernt, Kathrin M., Nan Zhu, Amit U. Sinha, Sridhar Vempati, Joerg Faber, Andrei V. Krivtsov, Zhaohui Feng, et al. 2011. "MLL-Rearranged Leukemia Is Dependent on Aberrant H3K79 Methylation by DOT1L." *Cancer Cell* 20 (1): 66–78. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.06.010>.
- Berthon, Céline, Emmanuel Raffoux, Xavier Thomas, Norbert Vey, Carlos Gomez-Roca, Karen Yee, David Christopher Taussig, et al. 2016. "Bromodomain Inhibitor OTX015 in Patients with Acute Leukaemia: A Dose-Escalation, Phase 1 Study." *The Lancet. Haematology* 3 (4): e186–195. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(15\)00247-1](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(15)00247-1).
- Bertolini, Francesco, Vikas P. Sukhatme, and Gauthier Bouche. 2015. "Drug Repurposing in Oncology--Patient and Health Systems Opportunities." *Nature Reviews. Clinical Oncology* 12 (12): 732–42. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.169>.
- Biondi, Ricardo M., and Angel R. Nebreda. 2003. "Signalling Specificity of Ser/Thr Protein Kinases through Docking-Site-Mediated Interactions." *The Biochemical Journal* 372 (Pt 1): 1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20021641>.
- Birnbaum, Ron A., Aengus O'Marcaigh, Zabihullah Wardak, You-Yan Zhang, Glenn Dranoff, Tyler Jacks, D. Wade Clapp, and Kevin M. Shannon. 2000. "Nf1 and Gmcsf Interact in Myeloid Leukemogenesis." *Molecular Cell* 5 (1): 189–95. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80415-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80415-3).

- Bivona, Trever G. 2019. "Dampening Oncogenic RAS Signaling." *Science (New York, N.Y.)* 363 (6433): 1280–81. <https://doi.org/10.1126/science.aav6703>.
- Bivona, Trever G., Ignacio Pérez De Castro, Ian M. Ahearn, Theresa M. Grana, Vi K. Chiu, Peter J. Lockyer, Peter J. Cullen, Angel Pellicer, Adrienne D. Cox, and Mark R. Philips. 2003. "Phospholipase Cgamma Activates Ras on the Golgi Apparatus by Means of RasGRP1." *Nature* 424 (6949): 694–98. <https://doi.org/10.1038/nature01806>.
- Bivona, Trever G., Steven E. Quatela, Brian O. Bodemann, Ian M. Ahearn, Michael J. Soskis, Adam Mor, John Miura, et al. 2006. "PKC Regulates a Farnesyl-Electrostatic Switch on K-Ras That Promotes Its Association with Bcl-XL on Mitochondria and Induces Apoptosis." *Molecular Cell* 21 (4): 481–93. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.01.012>.
- Blau, Olga, Wolf-Karsten Hofmann, Claudia Dorothea Baldus, Gundula Thiel, Verena Serbent, Elke Schümann, Eckhard Thiel, and Igor Wolfgang Blau. 2007. "Chromosomal Aberrations in Bone Marrow Mesenchymal Stroma Cells from Patients with Myelodysplastic Syndrome and Acute Myeloblastic Leukemia." *Experimental Hematology* 35 (2): 221–29. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2006.10.012>.
- Blum, Roy, Jasmine Jacob-Hirsch, Ninette Amariglio, Gideon Rechavi, and Yoel Kloog. 2005. "Ras Inhibition in Glioblastoma Down-Regulates Hypoxia-Inducible Factor-1alpha, Causing Glycolysis Shutdown and Cell Death." *Cancer Research* 65 (3): 999–1006.
- Bodempudi, Vidya, Farnaz Yamoutpoor, Weihong Pan, Arkadiusz Z. Dudek, Tuba Esfandyari, Mark Piedra, Dusica Babovick-Vuksanovic, et al. 2009. "Ral Overactivation in Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors." *Molecular and Cellular Biology* 29 (14): 3964–74. <https://doi.org/10.1128/MCB.01153-08>.
- Boissel, N., H. Leroy, B. Brethon, N. Philippe, S. de Botton, A. Auvrignon, E. Raffoux, et al. 2006. "Incidence and Prognostic Impact of C-Kit, FLT3, and Ras Gene Mutations in Core Binding Factor Acute Myeloid Leukemia (CBF-AML)." *Leukemia* 20 (6): 965–70. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404188>.
- Bollag, G., D. W. Clapp, S. Shih, F. Adler, Y. Y. Zhang, P. Thompson, B. J. Lange, et al. 1996. "Loss of NF1 Results in Activation of the Ras Signaling Pathway and Leads to Aberrant Growth in Haematopoietic Cells." *Nature Genetics* 12 (2): 144–48. <https://doi.org/10.1038/ng0296-144>.
- Bollag, Gideon, Peter Hirth, James Tsai, Jiazhong Zhang, Prabha N. Ibrahim, Hanna Cho, Wayne Spevak, et al. 2010. "Clinical Efficacy of a RAF Inhibitor Needs Broad Target Blockade in BRAF-Mutant Melanoma." *Nature* 467 (7315): 596–99. <https://doi.org/10.1038/nature09454>.
- Bonnet, D., and J. E. Dick. 1997. "Human Acute Myeloid Leukemia Is Organized as a Hierarchy That Originates from a Primitive Hematopoietic Cell." *Nature Medicine* 3 (7): 730–37.
- Boriack-Sjodin, P. A., S. M. Margarit, D. Bar-Sagi, and J. Kuriyan. 1998. "The Structural Basis of the Activation of Ras by Sos." *Nature* 394 (6691): 337–43. <https://doi.org/10.1038/28548>.
- Borthakur, Gautam, Leslie Popplewell, Michael Boyiadzis, James Foran, Uwe Platzbecker, Norbert Vey, Roland B. Walter, et al. 2016. "Activity of the Oral Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Inhibitor Trametinib in RAS-Mutant Relapsed or Refractory Myeloid Malignancies." *Cancer* 122 (12): 1871–79. <https://doi.org/10.1002/cncr.29986>.
- Bos, Johannes L., Holger Rehmann, and Alfred Wittinghofer. 2007. "GEFs and GAPs: Critical Elements in the Control of Small G Proteins." *Cell* 129 (5): 865–77. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.018>.
- Boudry-Labis, Elise, Catherine Roche-Lestienne, Olivier Nibourel, Nicolas Boissel, Christine Terre, Christine Perot, Virginie Eclache, et al. 2013. "Neurofibromatosis-1 Gene Deletions and Mutations in de Novo Adult Acute Myeloid Leukemia." *American Journal of Hematology* 88 (4): 306–11. <https://doi.org/10.1002/ajh.23403>.
- Boulton, T. G., S. H. Nye, D. J. Robbins, N. Y. Ip, E. Radziejewska, S. D. Morgenbesser, R. A. DePinho, N. Panayotatos, M. H. Cobb, and G. D. Yancopoulos. 1991. "ERKs: A Family of Protein-Serine/Threonine Kinases That Are Activated and Tyrosine Phosphorylated in Response to Insulin and NGF." *Cell* 65 (4): 663–75.
- Bowen, David T., Marion E. Frew, Robert Hills, Rosemary E. Gale, Keith Wheatley, Michael J. Groves, Stephen E. Langabeer, et al. 2005. "RAS Mutation in Acute Myeloid Leukemia Is Associated with Distinct Cytogenetic Subgroups but Does Not Influence Outcome in Patients Younger than 60 Years." *Blood* 106 (6): 2113–19. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-0867>.

- Braun, Benjamin S., Joehleen A. Archard, Jessica A. G. Van Ziffle, David A. Tuveson, Tyler E. Jacks, and Kevin Shannon. 2006. "Somatic Activation of a Conditional KrasG12D Allele Causes Ineffective Erythropoiesis in Vivo." *Blood* 108 (6): 2041–44. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-01-013490>.
- Braun, Benjamin S., and Kevin Shannon. 2008. "Targeting Ras in Myeloid Leukemias." *Clinical Cancer Research* 14 (8): 2249–52. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1005>.
- Braun, Benjamin S., David A. Tuveson, Namie Kong, Doan T. Le, Scott C. Kogan, Jacob Rozmus, Michelle M. Le Beau, Tyler E. Jacks, and Kevin M. Shannon. 2004. "Somatic Activation of Oncogenic Kras in Hematopoietic Cells Initiates a Rapidly Fatal Myeloproliferative Disorder." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (2): 597–602. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307203101>.
- Breems, Dimitri A., Wim L. J. Van Putten, Peter C. Huijgens, Gert J. Ossenkoppele, Gregor E. G. Verhoef, Leo F. Verdonck, Edo Vellenga, et al. 2005. "Prognostic Index for Adult Patients with Acute Myeloid Leukemia in First Relapse." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 23 (9): 1969–78. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.06.027>.
- Brummelkamp, Thijs R., René Bernards, and Reuven Agami. 2002. "Stable Suppression of Tumorigenicity by Virus-Mediated RNA Interference." *Cancer Cell* 2 (3): 243–47.
- Brundage, M. E., P. Tandon, D. W. Eaves, J. P. Williams, S. J. Miller, R. H. Hennigan, A. Jegga, T. P. Cripe, and N. Ratner. 2014. "MAF Mediates Crosstalk between Ras-MAPK and MTOR Signaling in NF1." *Oncogene* 33 (49): 5626–36. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.506>.
- Büchner, Thomas, Wolfgang E. Berdel, Claudia Haferlach, Torsten Haferlach, Susanne Schnittger, Carsten Müller-Tidow, Jan Braess, et al. 2009. "Age-Related Risk Profile and Chemotherapy Dose Response in Acute Myeloid Leukemia: A Study by the German Acute Myeloid Leukemia Cooperative Group." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (1): 61–69. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.4245>.
- Büchner, Thomas, Richard F. Schlenk, Markus Schaich, Konstanze Döhner, Rainer Krahl, Jürgen Krauter, Gerhard Heil, et al. 2012. "Acute Myeloid Leukemia (AML): Different Treatment Strategies versus a Common Standard Arm—Combined Prospective Analysis by the German AML Intergroup." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 30 (29): 3604–10. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.42.2907>.
- Bullinger, Lars, Konstanze Döhner, and Hartmut Döhner. 2017. "Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 35 (9): 934–46. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.71.2208>.
- Bunda, Severa, Kelly Burrell, Pardeep Heir, Lifan Zeng, Amir Alamsahebpour, Yoshihito Kano, Brian Raught, Zhong-Yin Zhang, Gelareh Zadeh, and Michael Ohh. 2015. "Inhibition of SHP2-Mediated Dephosphorylation of Ras Suppresses Oncogenesis." *Nature Communications* 6 (November): 8859. <https://doi.org/10.1038/ncomms9859>.
- Bundschu, Karin, Ulrich Walter, and Kai Schuh. 2007. "Getting a First Clue about SPRED Functions." *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 29 (9): 897–907. <https://doi.org/10.1002/bies.20632>.
- Burd, Christin E., Wenjin Liu, Minh V. Huynh, Meriam A. Waqas, James E. Gillahan, Kelly S. Clark, Kailing Fu, et al. 2014. "Mutation-Specific RAS Oncogenicity Explains NRAS Codon 61 Selection in Melanoma." *Cancer Discovery* 4 (12): 1418–29. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0729>.
- Burgess, Michael R., Eugene Hwang, Ari J. Firestone, Tannie Huang, Jin Xu, Johannes Zuber, Natacha Bohin, et al. 2014. "Preclinical Efficacy of MEK Inhibition in Nras-Mutant AML." *Blood* 124 (26): 3947–55. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-05-574582>.
- Burgess, Michael R., Eugene Hwang, Rana Mroue, Craig M. Bielski, Anica M. Wandler, Benjamin J. Huang, Ari J. Firestone, et al. 2017. "KRAS Allelic Imbalance Enhances Fitness and Modulates MAP Kinase Dependence in Cancer." *Cell* 168 (5): 817–829.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.020>.
- Burnett, Alan K., Robert K. Hills, Donald Milligan, Lars Kjeldsen, Jonathan Kell, Nigel H. Russell, John A. L. Yin, Ann Hunter, Anthony H. Goldstone, and Keith Wheatley. 2011. "Identification of Patients with Acute Myeloblastic Leukemia Who Benefit from the Addition of Gemtuzumab Ozogamicin: Results of the MRC AML15 Trial." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 29 (4): 369–77. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.31.4310>.

- Burnett, Alan K., Nigel H. Russell, Dominic Culligan, Jamie Cavanagh, Jonathan Kell, Keith Wheatley, Andra Virchis, Robert K. Hills, and Donald Milligan. 2012. "The Addition of the Farnesyl Transferase Inhibitor, Tipifarnib, to Low Dose Cytarabine Does Not Improve Outcome for Older Patients with AML." *British Journal of Haematology* 158 (4): 519–22. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2012.09165.x>.
- Buscarlet, Manuel, Sylvie Provost, Yassamin Feroz Zada, Amina Barhdadi, Vincent Bourgoïn, Guylaine Lépine, Luigina Mollica, Natasha Szuber, Marie-Pierre Dubé, and Lambert Busque. 2017. "DNMT3A and TET2 Dominate Clonal Hematopoiesis and Demonstrate Benign Phenotypes and Different Genetic Predispositions." *Blood* 130 (6): 753–62. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-04-777029>.
- Buscarlet, Manuel, Sylvie Provost, Yassamin Feroz Zada, Vincent Bourgoïn, Luigina Mollica, Marie-Pierre Dubé, and Lambert Busque. 2018. "Lineage Restriction Analyses in CHIP Indicate Myeloid Bias for TET2 and Multipotent Stem Cell Origin for DNMT3A." *Blood* 132 (3): 277–80. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-01-829937>.
- Callahan, Margaret K., Raajit Rampal, James J. Harding, Virginia M. Klimek, Young Rock Chung, Taha Merghoub, Jedd D. Wolchok, et al. 2012. "Progression of RAS-Mutant Leukemia during RAF Inhibitor Treatment." *The New England Journal of Medicine* 367 (24): 2316–21. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1208958>.
- Canagarajah, B. J., A. Khokhlatchev, M. H. Cobb, and E. J. Goldsmith. 1997. "Activation Mechanism of the MAP Kinase ERK2 by Dual Phosphorylation." *Cell* 90 (5): 859–69.
- Cancer Genome Atlas Research Network. 2013. "Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult de Novo Acute Myeloid Leukemia." *The New England Journal of Medicine* 368 (22): 2059–74. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1301689>.
- Carrella, Diego, Isabella Manni, Barbara Tumaini, Rosanna Dattilo, Federica Papaccio, Margherita Mutarelli, Francesco Sirci, et al. 2016. "Computational Drugs Repositioning Identifies Inhibitors of Oncogenic PI3K/AKT/P70S6K-Dependent Pathways among FDA-Approved Compounds." *Oncotarget* 7 (37): 58743–58. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11318>.
- Carter, Bing Z., Po Yee Mak, Ye Chen, Duncan H. Mak, Hong Mu, Rodrigo Jacamo, Vivian Ruvolo, et al. 2016. "Anti-Apoptotic ARC Protein Confers Chemoresistance by Controlling Leukemia-Microenvironment Interactions through a NFκB/IL1β Signaling Network." *Oncotarget* 7 (15): 20054–67. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7911>.
- Casar, Berta, Imanol Arozarena, Victoria Sanz-Moreno, Adán Pinto, Lorena Agudo-Ibáñez, Richard Marais, Robert E. Lewis, María T. Berciano, and Piero Crespo. 2009. "Ras Subcellular Localization Defines Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 and 2 Substrate Specificity through Distinct Utilization of Scaffold Proteins." *Molecular and Cellular Biology* 29 (5): 1338–53. <https://doi.org/10.1128/MCB.01359-08>.
- Casar, Berta, Andrew P. Badrock, Iñaki Jiménez, Imanol Arozarena, Paula Colón-Bolea, L. Francisco Lorenzo-Martín, Irene Barinaga-Rementería, et al. 2018. "RAS at the Golgi Antagonizes Malignant Transformation through PTPRκ-Mediated Inhibition of ERK Activation." *Nature Communications* 9 (1): 3595. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05941-8>.
- Castellano, Esther, and Julian Downward. 2011. "RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway." *Genes & Cancer* 2 (3): 261–74. <https://doi.org/10.1177/1947601911408079>.
- Castellano, Esther, Miriam Molina-Arcas, Agata Adelajda Krygowska, Philip East, Patricia Warne, Alastair Nicol, and Julian Downward. 2016. "RAS Signalling through PI3-Kinase Controls Cell Migration via Modulation of Reelin Expression." *Nature Communications* 7 (April): 11245. <https://doi.org/10.1038/ncomms11245>.
- Castellano, Esther, Clare Sheridan, May Zaw Thin, Emma Nye, Bradley Spencer-Dene, Markus E. Diefenbacher, Christopher Moore, et al. 2013. "Requirement for Interaction of PI3-Kinase P110α with RAS in Lung Tumor Maintenance." *Cancer Cell* 24 (5): 617–30. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.09.012>.
- Caunt, Christopher J., and Stephen M. Keyse. 2013. "Dual-Specificity MAP Kinase Phosphatases (MKPs): Shaping the Outcome of MAP Kinase Signalling." *The FEBS Journal* 280 (2): 489–504. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08716.x>.
- Caunt, Christopher J., Matthew J. Sale, Paul D. Smith, and Simon J. Cook. 2015. "MEK1 and MEK2 Inhibitors and Cancer Therapy: The Long and Winding Road." *Nature Reviews Cancer* 15 (10): 577–92. <https://doi.org/10.1038/nrc4000>.
- Caye, Aurélie, Marion Strullu, Fabien Guidez, Bruno Cassinat, Steven Gazal, Odile Fenneteau, Elodie Lainey, et al. 2015. "Juvenile Myelomonocytic Leukemia Displays Mutations in Components of the RAS Pathway and the PRC2 Network." *Nature Genetics* 47 (11): 1334–40. <https://doi.org/10.1038/ng.3420>.

- Cerrano, Marco, and Raphael Itzykson. 2019. "New Treatment Options for Acute Myeloid Leukemia in 2019." *Current Oncology Reports* 21 (2): 16. <https://doi.org/10.1007/s11912-019-0764-8>.
- Chan, Gordon, Laurene S. Cheung, Wentian Yang, Michael Milyavsky, Ashley D. Sanders, Shengqing Gu, Wan Xing Hong, et al. 2011. "Essential Role for Ptpn11 in Survival of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells." *Blood* 117 (16): 4253–61. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-11-319517>.
- Chan, Gordon, Demetrios Kalaitzidis, Tatiana Usenko, Jeffery L. Kutok, Wentian Yang, M. Golam Mohi, and Benjamin G. Neel. 2009. "Leukemogenic Ptpn11 Causes Fatal Myeloproliferative Disorder via Cell-Autonomous Effects on Multiple Stages of Hematopoiesis." *Blood* 113 (18): 4414–24. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-10-182626>.
- Chan, Iris T., Jeffery L. Kutok, Ifor R. Williams, Sarah Cohen, Lauren Kelly, Hirokazu Shigematsu, Leisa Johnson, et al. 2004. "Conditional Expression of Oncogenic K-Ras from Its Endogenous Promoter Induces a Myeloproliferative Disease." *The Journal of Clinical Investigation* 113 (4): 528–38. <https://doi.org/10.1172/JCI20476>.
- Chan, Rebecca J., and Gen-Sheng Feng. 2007. "PTPN11 Is the First Identified Proto-Oncogene That Encodes a Tyrosine Phosphatase." *Blood* 109 (3): 862–67. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-07-028829>.
- Chan, Rebecca J., Melissa B. Leedy, Veerendra Munugalavadla, Cara S. Voorhorst, Yanjun Li, Menggang Yu, and Reuben Kapur. 2005. "Human Somatic PTPN11 Mutations Induce Hematopoietic-Cell Hypersensitivity to Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor." *Blood* 105 (9): 3737–42. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-10-4002>.
- Chang, Matthew T., Saurabh Asthana, Sizhi Paul Gao, Byron H. Lee, Jocelyn S. Chapman, Cyriac Kandoth, JianJiong Gao, et al. 2016. "Identifying Recurrent Mutations in Cancer Reveals Widespread Lineage Diversity and Mutational Specificity." *Nature Biotechnology* 34 (2): 155–63. <https://doi.org/10.1038/nbt.3391>.
- Chang, Tiffany, Kimberly Krisman, Emily Harding Theobald, Jin Xu, Jon Akutagawa, Jennifer O. Lauchle, Scott Kogan, Benjamin S. Braun, and Kevin Shannon. 2013. "Sustained MEK Inhibition Abrogates Myeloproliferative Disease in Nf1 Mutant Mice." *The Journal of Clinical Investigation* 123 (1): 335–39. <https://doi.org/10.1172/JCI63193>.
- Chang, Yuan-I., Alisa Damernsawad, Guangyao Kong, Xiaona You, Demin Wang, and Jing Zhang. 2017. "The Mystery of Oncogenic KRAS: Lessons from Studying Its Wild-Type Counter Part." *Small GTPases* 8 (4): 233–36. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1215656>.
- Chatterjee, Devasis, Yin Bai, Zhe Wang, Sandy Beach, Stephanie Mott, Rajat Roy, Corey Braastad, et al. 2004. "RKIP Sensitizes Prostate and Breast Cancer Cells to Drug-Induced Apoptosis." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (17): 17515–23. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313816200>.
- Chen, Bin, Li Ma, Hyojung Paik, Marina Sirota, Wei Wei, Mei-Sze Chua, Samuel So, and Atul J. Butte. 2017. "Reversal of Cancer Gene Expression Correlates with Drug Efficacy and Reveals Therapeutic Targets." *Nature Communications* 8: 16022. <https://doi.org/10.1038/ncomms16022>.
- Chen, C., N. Pore, A. Behrooz, F. Ismail-Beigi, and A. Maity. 2001. "Regulation of Glut1 mRNA by Hypoxia-Inducible Factor-1. Interaction between H-Ras and Hypoxia." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (12): 9519–25. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010144200>.
- Chen, L., W. Chen, M. Mysliwski, J. Serio, J. Ropa, F. A. Abulwerdi, R. J. Chan, et al. 2015. "Mutated Ptpn11 Alters Leukemic Stem Cell Frequency and Reduces the Sensitivity of Acute Myeloid Leukemia Cells to Mcl1 Inhibition." *Leukemia* 29 (6): 1290–1300. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.18>.
- Chen, Ying-Nan P., Matthew J. LaMarche, Ho Man Chan, Peter Fekkes, Jorge Garcia-Fortanet, Michael G. Acker, Brandon Antonakos, et al. 2016. "Allosteric Inhibition of SHP2 Phosphatase Inhibits Cancers Driven by Receptor Tyrosine Kinases." *Nature* 535 (7610): 148–52. <https://doi.org/10.1038/nature18621>.
- Chiaradonna, F., E. Sacco, R. Manzoni, M. Giorgio, M. Vanoni, and L. Alberghina. 2006. "Ras-Dependent Carbon Metabolism and Transformation in Mouse Fibroblasts." *Oncogene* 25 (39): 5391–5404. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209528>.
- Chin, L., A. Tam, J. Pomerantz, M. Wong, J. Holash, N. Bardeesy, Q. Shen, et al. 1999. "Essential Role for Oncogenic Ras in Tumour Maintenance." *Nature* 400 (6743): 468–72. <https://doi.org/10.1038/22788>.
- Chiu, Vi K., Trever Bivona, Angela Hach, J. Bernard Sajous, Joseph Silletti, Heidi Wiener, Ronald L. Johnson, Adrienne D. Cox, and Mark R. Philips. 2002. "Ras Signalling on the Endoplasmic Reticulum and the Golgi." *Nature Cell Biology* 4 (5): 343–50. <https://doi.org/10.1038/ncb783>.



- Chong, Huiru, Haris G. Vikis, and Kun-Liang Guan. 2003. "Mechanisms of Regulating the Raf Kinase Family." *Cellular Signalling* 15 (5): 463–69.
- Choudhary, Chunaram, Jesper V. Olsen, Christian Brandts, Jürgen Cox, Pavankumar N. G. Reddy, Frank D. Böhmer, Volker Gerke, et al. 2009. "Mislocalized Activation of Oncogenic RTKs Switches Downstream Signaling Outcomes." *Molecular Cell* 36 (2): 326–39. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.09.019>.
- Chow, Hoi Yee, Adrian M. Jubb, Jennifer N. Koch, Zahara M. Jaffer, Dina Stepanova, David A. Campbell, Sergio G. Duron, et al. 2012. "P21-Activated Kinase 1 Is Required for Efficient Tumor Formation and Progression in a Ras-Mediated Skin Cancer Model." *Cancer Research* 72 (22): 5966–75. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2246>.
- Choy, E., V. K. Chiu, J. Silletti, M. Feoktistov, T. Morimoto, D. Michaelson, I. E. Ivanov, and M. R. Philips. 1999. "Endomembrane Trafficking of Ras: The CAAX Motif Targets Proteins to the ER and Golgi." *Cell* 98 (1): 69–80. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80607-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80607-8).
- Chung, Vincent, Shannon McDonough, Philip A. Philip, Dana Cardin, Andrea Wang-Gillam, Laifong Hui, Mohamedtaki A. Tejani, et al. 2017. "Effect of Selumetinib and MK-2206 vs Oxaliplatin and Fluorouracil in Patients With Metastatic Pancreatic Cancer After Prior Therapy: SWOG S1115 Study Randomized Clinical Trial." *JAMA Oncology* 3 (4): 516–22. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.5383>.
- Churpek, Jane E., Khateriia Pyrtel, Krishna-Latha Kanchi, Jin Shao, Daniel Koboldt, Christopher A. Miller, Dong Shen, et al. 2015. "Genomic Analysis of Germ Line and Somatic Variants in Familial Myelodysplasia/Acute Myeloid Leukemia." *Blood* 126 (22): 2484–90. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-04-641100>.
- Clark, Carolyn E., Sunil R. Hingorani, Rosemarie Mick, Chelsea Combs, David A. Tuveson, and Robert H. Vonderheide. 2007. "Dynamics of the Immune Reaction to Pancreatic Cancer from Inception to Invasion." *Cancer Research* 67 (19): 9518–27. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0175>.
- Coelho, Matthew A., Sophie de Carné Trécesson, Sareena Rana, Davide Zecchin, Christopher Moore, Miriam Molina-Arcas, Philip East, et al. 2017. "Oncogenic RAS Signaling Promotes Tumor Immuno-resistance by Stabilizing PD-L1 mRNA." *Immunity* 47 (6): 1083-1099.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.11.016>.
- Collisson, Eric A., Christy L. Trejo, Jillian M. Silva, Shenda Gu, James E. Korkola, Laura M. Heiser, Roch-Philippe Charles, et al. 2012. "A Central Role for RAF→MEK→ERK Signaling in the Genesis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Cancer Discovery* 2 (8): 685–93. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-11-0347>.
- Commisso, Cosimo, Shawn M. Davidson, Rengin G. Soydaner-Azeloglu, Seth J. Parker, Jurre J. Kamphorst, Sean Hackett, Elda Grabocka, et al. 2013. "Macropinocytosis of Protein Is an Amino Acid Supply Route in Ras-Transformed Cells." *Nature* 497 (7451): 633–37. <https://doi.org/10.1038/nature12138>.
- Cooper, Zachary A., Vikram R. Juneja, Peter T. Sage, Dennie T. Frederick, Adriano Piris, Devarati Mitra, Jennifer A. Lo, et al. 2014. "Response to BRAF Inhibition in Melanoma Is Enhanced When Combined with Immune Checkpoint Blockade." *Cancer Immunology Research* 2 (7): 643–54. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0215>.
- Corbalan-Garcia, S., S. S. Yang, K. R. Degenhardt, and D. Bar-Sagi. 1996. "Identification of the Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphorylation Sites on Human Sos1 That Regulate Interaction with Grb2." *Molecular and Cellular Biology* 16 (10): 5674–82.
- Corces-Zimmerman, M. Ryan, Wan-Jen Hong, Irving L. Weissman, Bruno C. Medeiros, and Ravindra Majeti. 2014. "Preleukemic Mutations in Human Acute Myeloid Leukemia Affect Epigenetic Regulators and Persist in Remission." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (7): 2548–53. <https://doi.org/10.1073/pnas.1324297111>.
- Corcoran, Ryan B., Thierry André, Chloe E. Atreya, Jan H. M. Schellens, Takayuki Yoshino, Johanna C. Bendell, Antoine Hollebecque, et al. 2018. "Combined BRAF, EGFR, and MEK Inhibition in Patients with BRAFV600E-Mutant Colorectal Cancer." *Cancer Discovery* 8 (4): 428–43. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-1226>.
- Corcoran, Ryan B., Katherine A. Cheng, Aaron N. Hata, Anthony C. Faber, Hiromichi Ebi, Erin M. Coffee, Patricia Greninger, et al. 2013. "Synthetic Lethal Interaction of Combined BCL-XL and MEK Inhibition Promotes Tumor Regressions in KRAS Mutant Cancer Models." *Cancer Cell* 23 (1): 121–28. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.11.007>.
- Cornelissen, Jan J., and Didier Blaise. 2016. "Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Patients with AML in First Complete Remission." *Blood* 127 (1): 62–70. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-07-604546>.

- Cortes, Jorge E., Martin S. Tallman, Gary J. Schiller, Denise Trone, Guy Gammon, Stuart L. Goldberg, Alexander E. Perl, et al. 2018. "Phase 2b Study of 2 Dosing Regimens of Quizartinib Monotherapy in FLT3-ITD-Mutated, Relapsed or Refractory AML." *Blood* 132 (6): 598–607. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-01-821629>.
- Cox, Adrienne D., and Channing J. Der. 2003. "The Dark Side of Ras: Regulation of Apoptosis." *Oncogene* 22 (56): 8999–9006. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207111>.
- Cox, Adrienne D., Stephen W. Fesik, Alec C. Kimmelman, Ji Luo, and Channing J. Der. 2014. "Drugging the Undruggable RAS: Mission Possible?" *Nature Reviews Drug Discovery* 13 (11): 828–51. <https://doi.org/10.1038/nrd4389>.
- Cuevas, B. D., A. N. Abell, and G. L. Johnson. 2007. "Role of Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinases in Signal Integration." *Oncogene* 26 (22): 3159–71. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210409>.
- Cullen, Peter J., and Peter J. Lockyer. 2002. "Integration of Calcium and Ras Signalling." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 3 (5): 339–48. <https://doi.org/10.1038/nrm808>.
- Cutts, Briony A., Anna-Karin M. Sjogren, Karin M. E. Andersson, Annika M. Wahlstrom, Christin Karlsson, Birgitta Swolin, and Martin O. Bergo. 2009. "Nf1 Deficiency Cooperates with Oncogenic K-RAS to Induce Acute Myeloid Leukemia in Mice." *Blood* 114 (17): 3629–32. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-205146>.
- Daigle, Scott R., Edward J. Olhava, Carly A. Therkelsen, Christina R. Majer, Christopher J. Sneeringer, Jeffrey Song, L. Danielle Johnston, et al. 2011. "Selective Killing of Mixed Lineage Leukemia Cells by a Potent Small-Molecule DOT1L Inhibitor." *Cancer Cell* 20 (1): 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.06.009>.
- Dail, Monique, Qing Li, Andrew McDaniel, Jason Wong, Keiko Akagi, Ben Huang, Hio Chung Kang, et al. 2010. "Mutant Irf1, KrasG12D, and Notch1 Cooperate in T Lineage Leukemogenesis and Modulate Responses to Targeted Agents." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (11): 5106–11. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001064107>.
- Damnernsawad, Alisa, Guangyao Kong, Zhi Wen, Yangang Liu, Adhithi Rajagopalan, Xiaona You, Jinyong Wang, et al. 2016. "Kras Is Required for Adult Hematopoiesis." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 34 (7): 1859–71. <https://doi.org/10.1002/stem.2355>.
- D'Angelo, Igor, Stefan Welti, Fabien Bonneau, and Klaus Scheffzek. 2006. "A Novel Bipartite Phospholipid-Binding Module in the Neurofibromatosis Type 1 Protein." *EMBO Reports* 7 (2): 174–79. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400602>.
- Daniels, Mark A., Emma Teixeira, Jason Gill, Barbara Hausmann, Dominique Roubaty, Kaisa Holmberg, Guy Werlen, Georg A. Holländer, Nicholas R. J. Gascoigne, and Ed Palmer. 2006. "Thymic Selection Threshold Defined by Compartmentalization of Ras/MAPK Signalling." *Nature* 444 (7120): 724–29. <https://doi.org/10.1038/nature05269>.
- Dard, L., N. Bellance, D. Lacombe, and R. Rossignol. 2018. "RAS Signalling in Energy Metabolism and Rare Human Diseases." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 20th European Bioenergetics Conference, 1859 (9): 845–67. <https://doi.org/10.1016/j.bbabo.2018.05.003>.
- Dasgupta, Biplab, Yijun Yi, David Y. Chen, Jason D. Weber, and David H. Gutmann. 2005. "Proteomic Analysis Reveals Hyperactivation of the Mammalian Target of Rapamycin Pathway in Neurofibromatosis 1-Associated Human and Mouse Brain Tumors." *Cancer Research* 65 (7): 2755–60. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4058>.
- Daver, Naval, Guillermo Garcia-Manero, Sreyashi Basu, Prajwal C. Boddur, Mansour Alfayez, Jorge E. Cortes, Marina Konopleva, et al. 2019. "Efficacy, Safety, and Biomarkers of Response to Azacitidine and Nivolumab in Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia: A Nonrandomized, Open-Label, Phase II Study." *Cancer Discovery* 9 (3): 370–83. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0774>.
- Davis, A. J., J. T. Butt, J. H. Walker, S. E. Moss, and D. J. Gawler. 1996. "The Ca<sup>2+</sup>-Dependent Lipid Binding Domain of P120GAP Mediates Protein-Protein Interactions with Ca<sup>2+</sup>-Dependent Membrane-Binding Proteins. Evidence for a Direct Interaction between Annexin VI and P120GAP." *The Journal of Biological Chemistry* 271 (40): 24333–36.
- De Melo, M. B., I. Lorand-Metze, C. S. Lima, S. T. Saad, and F. F. Costa. 1997. "N-Ras Gene Point Mutations in Brazilian Acute Myelogenous Leukemia Patients Correlate with a Poor Prognosis." *Leukemia & Lymphoma* 24 (3–4): 309–17. <https://doi.org/10.3109/10428199709039018>.
- De Raedt, Thomas, Eline Beert, Eric Pasmant, Armelle Luscan, Hilde Brems, Nicolas Ortonne, Kristian Helin, et al. 2014. "PRC2 Loss Amplifies Ras-Driven Transcription and Confers Sensitivity to BRD4-Based Therapies." *Nature* 514 (7521): 247–51. <https://doi.org/10.1038/nature13561>.

- Decroocq, Justine, Raphaël Itzykson, Stéphane Vigouroux, Mauricette Michallet, Ibrahim Yakoub-Agha, Anne Huynh, Florence Beckerich, et al. 2018. "Similar Outcome of Allogeneic Stem Cell Transplantation after Myeloablative and Sequential Conditioning Regimen in Patients with Refractory or Relapsed Acute Myeloid Leukemia: A Study from the Société Francophone de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire." *American Journal of Hematology* 93 (3): 416–23. <https://doi.org/10.1002/ajh.25004>.
- Deng, Longfei, Yunlong Lei, Rui Liu, Jingyi Li, Kefei Yuan, Yi Li, Yi Chen, et al. 2013. "Pyrvinium Targets Autophagy Addiction to Promote Cancer Cell Death." *Cell Death & Disease* 4 (May): e614. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.142>.
- Dhillon, Amardeep S., Claire Pollock, Helge Steen, Peter E. Shaw, Harald Mischak, and Walter Kolch. 2002. "Cyclic AMP-Dependent Kinase Regulates Raf-1 Kinase Mainly by Phosphorylation of Serine 259." *Molecular and Cellular Biology* 22 (10): 3237–46.
- Dick, John E. 2005. "Acute Myeloid Leukemia Stem Cells." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1044 (June): 1–5. <https://doi.org/10.1196/annals.1349.001>.
- Dimitri, Christopher A., William Dowdle, Jeffrey P. MacKeigan, John Blenis, and Leon O. Murphy. 2005. "Spatially Separate Docking Sites on ERK2 Regulate Distinct Signaling Events in Vivo." *Current Biology: CB* 15 (14): 1319–24. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.06.037>.
- DiNardo, Courtney D., Keith Pratz, Vinod Pullarkat, Brian A. Jonas, Martha Arellano, Pamela S. Becker, Olga Frankfurt, et al. 2019. "Venetoclax Combined with Decitabine or Azacitidine in Treatment-Naive, Elderly Patients with Acute Myeloid Leukemia." *Blood* 133 (1): 7–17. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-08-868752>.
- DiNardo, Courtney D., Eytan M. Stein, Stéphane de Botton, Gail J. Roboz, Jessica K. Altman, Alice S. Mims, Ronan Swords, et al. 2018. "Durable Remissions with Ivosidenib in IDH1-Mutated Relapsed or Refractory AML." *The New England Journal of Medicine* 378 (25): 2386–98. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1716984>.
- Dinulescu, Daniela M., Tan A. Ince, Bradley J. Quade, Sarah A. Shafer, Denise Crowley, and Tyler Jacks. 2005. "Role of K-Ras and Pten in the Development of Mouse Models of Endometriosis and Endometrioid Ovarian Cancer." *Nature Medicine* 11 (1): 63–70. <https://doi.org/10.1038/nm1173>.
- Döhner, Hartmut, Elihu Estey, David Grimwade, Sergio Amadori, Frederick R. Appelbaum, Thomas Büchner, Hervé Dombret, et al. 2017. "Diagnosis and Management of AML in Adults: 2017 ELN Recommendations from an International Expert Panel." *Blood* 129 (4): 424–47. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-733196>.
- Döhner, Hartmut, Daniel J. Weisdorf, and Clara D. Bloomfield. 2015. "Acute Myeloid Leukemia." *The New England Journal of Medicine* 373 (12): 1136–52. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1406184>.
- Dombi, Eva, Andrea Baldwin, Leigh J. Marcus, Michael J. Fisher, Brian Weiss, AeRang Kim, Patricia Whitcomb, et al. 2016. "Activity of Selumetinib in Neurofibromatosis Type 1-Related Plexiform Neurofibromas." *The New England Journal of Medicine* 375 (26): 2550–60. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1605943>.
- Dombret, Hervé, John F. Seymour, Aleksandra Butrym, Agnieszka Wierzbowska, Dominik Selleslag, Jun Ho Jang, Rajat Kumar, et al. 2015. "International Phase 3 Study of Azacitidine vs Conventional Care Regimens in Older Patients with Newly Diagnosed AML with >30% Blasts." *Blood* 126 (3): 291–99. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-01-621664>.
- Dong, Lei, Wen-Mei Yu, Hong Zheng, Mignon L. Loh, Silvia T. Bunting, Melinda Pauly, Gang Huang, et al. 2016. "Leukaemogenic Effects of Ptpn11 Activating Mutations in the Stem Cell Microenvironment." *Nature* 539 (7628): 304–8. <https://doi.org/10.1038/nature20131>.
- Donovan, Shane, Wendy See, Jeannette Bonifas, David Stokoe, and Kevin M. Shannon. 2002. "Hyperactivation of Protein Kinase B and ERK Have Discrete Effects on Survival, Proliferation, and Cytokine Expression in Nf1-Deficient Myeloid Cells." *Cancer Cell* 2 (6): 507–14. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(02\)00214-3](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(02)00214-3).
- Dougherty, Michele K., Jürgen Müller, Daniel A. Ritt, Ming Zhou, Xiao Zhen Zhou, Terry D. Copeland, Thomas P. Conrads, Timothy D. Veenstra, Kun Ping Lu, and Deborah K. Morrison. 2005. "Regulation of Raf-1 by Direct Feedback Phosphorylation." *Molecular Cell* 17 (2): 215–24. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.055>.
- Downward, Julian. 2015. "RAS Synthetic Lethal Screens Revisited: Still Seeking the Elusive Prize?" *Clinical Cancer Research* 21 (8): 1802–9. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2180>.

- Drosten, Matthias, Alma Dhawahir, Eleanor Y. M. Sum, Jelena Urosevic, Carmen G. Lechuga, Luis M. Esteban, Esther Castellano, Carmen Guerra, Eugenio Santos, and Mariano Barbacid. 2010. "Genetic Analysis of Ras Signalling Pathways in Cell Proliferation, Migration and Survival." *The EMBO Journal* 29 (6): 1091–1104. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.7>.
- Duncan, James S., Martin C. Whittle, Kazuhiro Nakamura, Amy N. Abell, Alicia A. Midland, Jon S. Zawistowski, Nancy L. Johnson, et al. 2012. "Dynamic Reprogramming of the Kinome in Response to Targeted MEK Inhibition in Triple-Negative Breast Cancer." *Cell* 149 (2): 307–21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.053>.
- Dunzendorfer-Matt, Theresia, Ellen L. Mercado, Karl Maly, Frank McCormick, and Klaus Scheffzek. 2016. "The Neurofibromin Recruitment Factor Spred1 Binds to the GAP Related Domain without Affecting Ras Inactivation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (27): 7497–7502. <https://doi.org/10.1073/pnas.1607298113>.
- Ebert, Peter J. R., Jeanne Cheung, Yagai Yang, Erin McNamara, Rebecca Hong, Marina Moskalenko, Stephen E. Gould, et al. 2016. "MAP Kinase Inhibition Promotes T Cell and Anti-Tumor Activity in Combination with PD-L1 Checkpoint Blockade." *Immunity* 44 (3): 609–21. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.01.024>.
- Ebinu, J. O., D. A. Bottorff, E. Y. Chan, S. L. Stang, R. J. Dunn, and J. C. Stone. 1998. "RasGRP, a Ras Guanyl Nucleotide- Releasing Protein with Calcium- and Diacylglycerol-Binding Motifs." *Science (New York, N.Y.)* 280 (5366): 1082–86.
- Eblen, Scott T., Jill K. Slack, Michael J. Weber, and Andrew D. Catling. 2002. "Rac-PAK Signaling Stimulates Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) Activation by Regulating Formation of MEK1-ERK Complexes." *Molecular and Cellular Biology* 22 (17): 6023–33.
- Eblen, Scott T., Jill K. Slack-Davis, Adel Tarcsafalvi, J. Thomas Parsons, Michael J. Weber, and Andrew D. Catling. 2004. "Mitogen-Activated Protein Kinase Feedback Phosphorylation Regulates MEK1 Complex Formation and Activation during Cellular Adhesion." *Molecular and Cellular Biology* 24 (6): 2308–17.
- Eferl, Robert, and Erwin F. Wagner. 2003. "AP-1: A Double-Edged Sword in Tumorigenesis." *Nature Reviews. Cancer* 3 (11): 859–68. <https://doi.org/10.1038/nrc1209>.
- Eisfeld, Ann-Kathrin, Jessica Kohlschmidt, Krzysztof Mrózek, Alice Mims, Christopher J. Walker, James S. Blachly, Deedra Nicolet, et al. 2018. "NF1 Mutations Are Recurrent in Adult Acute Myeloid Leukemia and Confer Poor Outcome." *Leukemia* 32 (12): 2536–45. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0147-4>.
- Emanuel, P. D., L. J. Bates, S. W. Zhu, R. P. Castleberry, R. J. Gualtieri, and K. S. Zuckerman. 1991. "The Role of Monocyte-Derived Hemopoietic Growth Factors in the Regulation of Myeloproliferation in Juvenile Chronic Myelogenous Leukemia." *Experimental Hematology* 19 (10): 1017–24.
- Engelman, Jeffrey A., Liang Chen, Xiaohong Tan, Katherine Crosby, Alexander R. Guimaraes, Rabi Upadhyay, Michel Maira, et al. 2008. "Effective Use of PI3K and MEK Inhibitors to Treat Mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R Murine Lung Cancers." *Nature Medicine* 14 (12): 1351–56. <https://doi.org/10.1038/nm.1890>.
- Eppert, Kolja, Katsuto Takenaka, Eric R. Lechman, Levi Waldron, Björn Nilsson, Peter van Galen, Klaus H. Metzeler, et al. 2011. "Stem Cell Gene Expression Programs Influence Clinical Outcome in Human Leukemia." *Nature Medicine* 17 (9): 1086–93. <https://doi.org/10.1038/nm.2415>.
- Erba, Harry P., Megan Othus, Roland B. Walter, Mark H. Kirschbaum, Martin S. Tallman, Richard A. Larson, Marilyn L. Slovak, Kenneth J. Kopecsky, Holly M. Gundacker, and Frederick R. Appelbaum. 2014. "Four Different Regimens of Farnesyltransferase Inhibitor Tipifarnib in Older, Untreated Acute Myeloid Leukemia Patients: North American Intergroup Phase II Study SWOG S0432." *Leukemia Research* 38 (3): 329–33. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2013.12.001>.
- Faderl, Stefan, Meir Wetzler, David Rizzieri, Gary Schiller, Madan Jagasia, Robert Stuart, Siddhartha Ganguly, et al. 2012. "Clofarabine plus Cytarabine Compared with Cytarabine Alone in Older Patients with Relapsed or Refractory Acute Myelogenous Leukemia: Results from the CLASSIC I Trial." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 30 (20): 2492–99. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.37.9743>.
- Farge, Thomas, Estelle Saland, Fabienne de Toni, Nesrine Aroua, Mohsen Hosseini, Robin Perry, Claudie Bosc, et al. 2017. "Chemotherapy-Resistant Human Acute Myeloid Leukemia Cells Are Not Enriched for Leukemic Stem Cells but Require Oxidative Metabolism." *Cancer Discovery* 7 (7): 716–35. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0441>.
- Fedele, Carmine, Hao Ran, Brian Diskin, Wei Wei, Jayu Jen, Mitchell J. Geer, Kiyomi Araki, et al. 2018. "SHP2 Inhibition Prevents Adaptive Resistance to MEK Inhibitors in Multiple Cancer Models." *Cancer Discovery* 8 (10): 1237–49. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0444>.

- Fehrenbacher, Nicole, Dafna Bar-Sagi, and Mark Philips. 2009. "Ras/MAPK Signaling from Endomembranes." *Molecular Oncology* 3 (4): 297–307. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2009.06.004>.
- Fenaux, Pierre, Ghulam J. Mufti, Eva Hellström-Lindberg, Valeria Santini, Norbert Gattermann, Ulrich Germing, Guillermo Sanz, et al. 2010. "Azacitidine Prolongs Overall Survival Compared With Conventional Care Regimens in Elderly Patients With Low Bone Marrow Blast Count Acute Myeloid Leukemia." *Journal of Clinical Oncology* 28 (4): 562–69. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.8329>.
- Feng, Liping, Shunji Yunoue, Hiroshi Tokuo, Tatsuya Ozawa, Dongwei Zhang, Siriporn Patrakitkomjorn, Toru Ichimura, Hideyuki Saya, and Norie Araki. 2004. "PKA Phosphorylation and 14-3-3 Interaction Regulate the Function of Neurofibromatosis Type I Tumor Suppressor, Neurofibromin." *FEBS Letters* 557 (1–3): 275–82.
- Ferro, Elisa, and Lorenza Trabalzini. 2010. "RalGDS Family Members Couple Ras to Ral Signalling and That's Not All." *Cellular Signalling* 22 (12): 1804–10. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.05.010>.
- Fisher, Kurt W., Binita Das, Robert L. Kortum, Oleg V. Chaika, and Robert E. Lewis. 2011. "Kinase Suppressor of Ras 1 (KSR1) Regulates PGC1 $\alpha$  and Estrogen-Related Receptor  $\alpha$  to Promote Oncogenic Ras-Dependent Anchorage-Independent Growth." *Molecular and Cellular Biology* 31 (12): 2453–61. <https://doi.org/10.1128/MCB.05255-11>.
- Fiskus, Warren, Yongchao Wang, Arun Sreekumar, Kathleen M. Buckley, Huidong Shi, Anand Jillella, Celalettin Ustun, et al. 2009. "Combined Epigenetic Therapy with the Histone Methyltransferase EZH2 Inhibitor 3-Deazaneplanocin A and the Histone Deacetylase Inhibitor Panobinostat against Human AML Cells." *Blood* 114 (13): 2733–43. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-213496>.
- Fivaz, Marc, and Tobias Meyer. 2005. "Reversible Intracellular Translocation of KRas but Not HRas in Hippocampal Neurons Regulated by Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin." *The Journal of Cell Biology* 170 (3): 429–41. <https://doi.org/10.1083/jcb.200409157>.
- Flynn, P. J., W. J. Miller, D. J. Weisdorf, D. C. Arthur, R. Brunning, and R. F. Branda. 1983. "Retinoic Acid Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia: In Vitro and in Vivo Observations." *Blood* 62 (6): 1211–17.
- Formstecher, E., J. W. Ramos, M. Fauquet, D. A. Calderwood, J. C. Hsieh, B. Canton, X. T. Nguyen, et al. 2001. "PEA-15 Mediates Cytoplasmic Sequestration of ERK MAP Kinase." *Developmental Cell* 1 (2): 239–50.
- Fu, Jen-Fen, Sung-Tzu Liang, Ying-Jung Huang, Kung-Hao Liang, Tzung-Hai Yen, Der-Cherng Liang, and Lee-Yung Shih. 2017. "Cooperation of MLL/AF10(OM-LZ) with PTPN11 Activating Mutation Induced Monocytic Leukemia with a Shorter Latency in a Mouse Bone Marrow Transplantation Model." *International Journal of Cancer* 140 (5): 1159–72. <https://doi.org/10.1002/ijc.30515>.
- Fu, Yu-Hsuan, Wen-Hui Lu, Pei-Qi Lan, Chung-Yi Hu, Chien-Yuan Chen, Da-Liang Ou, Hwei-Fang Tien, and Liang-In Lin. 2018. "Pyrvinium Pamoate Overcomes Cabozantinib-Resistance of FLT3-ITD AML Cells through Modulating the Mitochondria Functions and Signaling Pathways." *Blood* 132 (Suppl 1): 4683–4683. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-118476>.
- Gandre-Babbe, Shilpa, Prasuna Paluru, Chiaka Aribéana, Stella T. Chou, Silvia Bresolin, Lin Lu, Spencer K. Sullivan, et al. 2013. "Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells Recapitulate Hematopoietic Abnormalities of Juvenile Myelomonocytic Leukemia." *Blood* 121 (24): 4925–29. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-01-478412>.
- Gardin, Claude, Sylvie Chevret, Cécile Pautas, Pascal Turlure, Emmanuel Raffoux, Xavier Thomas, Bruno Quesnel, et al. 2013. "Superior Long-Term Outcome with Idarubicin Compared with High-Dose Daunorubicin in Patients with Acute Myeloid Leukemia Age 50 Years and Older." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 31 (3): 321–27. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.40.3642>.
- Genovese, Giulio, Anna K. Kähler, Robert E. Handsaker, Johan Lindberg, Samuel A. Rose, Samuel F. Bakhom, Kimberly Chambert, et al. 2014. "Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence." *The New England Journal of Medicine* 371 (26): 2477–87. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1409405>.
- Gentile, Daniel R., Manoj K. Rathinaswamy, Meredith L. Jenkins, Steven M. Moss, Braden D. Siempelkamp, Adam R. Renslo, John E. Burke, and Kevan M. Shokat. 2017. "Ras Binder Induces a Modified Switch-II Pocket in GTP and GDP States." *Cell Chemical Biology* 24 (12): 1455–1466.e14. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.08.025>.
- Gerstung, Moritz, Elli Papaemmanuil, Inigo Martincorena, Lars Bullinger, Verena I. Gaidzik, Peter Paschka, Michael Heuser, et al. 2017. "Precision Oncology for Acute Myeloid Leukemia Using a Knowledge Bank Approach." *Nature Genetics* 49 (3): 332–40. <https://doi.org/10.1038/ng.3756>.

- Gigoux, Veronique, Sebastien L'Hoste, Françoise Raynaud, Jacques Camonis, and Christiane Garbay. 2002. "Identification of Aurora Kinases as RasGAP Src Homology 3 Domain-Binding Proteins." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (26): 23742–46. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200121200>.
- Gille, H., and J. Downward. 1999. "Multiple Ras Effector Pathways Contribute to G(1) Cell Cycle Progression." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (31): 22033–40.
- Goldman, J. M., and J. V. Melo. 2001. "Targeting the BCR-ABL Tyrosine Kinase in Chronic Myeloid Leukemia." *The New England Journal of Medicine* 344 (14): 1084–86. <https://doi.org/10.1056/NEJM200104053441409>.
- González-García, Ana, Catrin A. Pritchard, Hugh F. Paterson, Georgia Mavria, Gordon Stamp, and Christopher J. Marshall. 2005. "RalGDS Is Required for Tumor Formation in a Model of Skin Carcinogenesis." *Cancer Cell* 7 (3): 219–26. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.01.029>.
- Good, Matthew C., Jesse G. Zalatan, and Wendell A. Lim. 2011. "Scaffold Proteins: Hubs for Controlling the Flow of Cellular Information." *Science (New York, N.Y.)* 332 (6030): 680–86. <https://doi.org/10.1126/science.1198701>.
- Goodwin, J. Shawn, Kimberly R. Drake, Carl Rogers, Latasha Wright, Jennifer Lippincott-Schwartz, Mark R. Philips, and Anne K. Kenworthy. 2005. "Depalmitoylated Ras Traffics to and from the Golgi Complex via a Nonvesicular Pathway." *The Journal of Cell Biology* 170 (2): 261–72. <https://doi.org/10.1083/jcb.200502063>.
- Gopal, Y. N. Vashisht, Helen Rizos, Guo Chen, Wanleng Deng, Dennie T. Frederick, Zachary A. Cooper, Richard A. Scolyer, et al. 2014. "Inhibition of MTORC1/2 Overcomes Resistance to MAPK Pathway Inhibitors Mediated by PGC1 $\alpha$  and Oxidative Phosphorylation in Melanoma." *Cancer Research* 74 (23): 7037–47. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1392>.
- Goulard, Marie, Christine Dosquet, and Dominique Bonnet. 2018. "Role of the Microenvironment in Myeloid Malignancies." *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 75 (8): 1377–91. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2725-4>.
- Gratwohl, A., J. Hermans, J. M. Goldman, W. Arcese, E. Carreras, A. Devergie, F. Frassoni, et al. 1998. "Risk Assessment for Patients with Chronic Myeloid Leukaemia before Allogeneic Blood or Marrow Transplantation. Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation." *Lancet (London, England)* 352 (9134): 1087–92.
- Grimwade, David, Robert K. Hills, Anthony V. Moorman, Helen Walker, Stephen Chatters, Anthony H. Goldstone, Keith Wheatley, Christine J. Harrison, Alan K. Burnett, and National Cancer Research Institute Adult Leukaemia Working Group. 2010. "Refinement of Cytogenetic Classification in Acute Myeloid Leukemia: Determination of Prognostic Significance of Rare Recurring Chromosomal Abnormalities among 5876 Younger Adult Patients Treated in the United Kingdom Medical Research Council Trials." *Blood* 116 (3): 354–65. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-11-254441>.
- Gritsman, Kira, Haluk Yuzugullu, Thanh Von, Howard Yan, Linda Clayton, Christine Fritsch, Sauveur-Michel Maira, et al. 2014. "Hematopoiesis and RAS-Driven Myeloid Leukemia Differentially Require PI3K Isoform P110 $\alpha$ ." *The Journal of Clinical Investigation* 124 (4): 1794–1809. <https://doi.org/10.1172/JCI69927>.
- Groof, Ad J. C. de, Mariska M. te Lindert, Michiel M. T. van Dommelen, Min Wu, Marieke Willemse, Amy L. Smift, Mike Winer, et al. 2009. "Increased OXPHOS Activity Precedes Rise in Glycolytic Rate in H-RasV12/E1A Transformed Fibroblasts That Develop a Warburg Phenotype." *Molecular Cancer* 8 (July): 54. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-8-54>.
- Gross, Matt I., Susan D. Demo, Jennifer B. Dennison, Lijing Chen, Tania Chernov-Rogan, Bindu Goyal, Julie R. Janes, et al. 2014. "Antitumor Activity of the Glutaminase Inhibitor CB-839 in Triple-Negative Breast Cancer." *Molecular Cancer Therapeutics* 13 (4): 890–901. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0870>.
- Grossmann, Katja S., Marta Rosário, Carmen Birchmeier, and Walter Birchmeier. 2010. "Chapter 2 - The Tyrosine Phosphatase Shp2 in Development and Cancer." In *Advances in Cancer Research*, edited by George F. Vande Woude and George Klein, 106:53–89. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(10\)06002-1](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(10)06002-1).
- Guerra, Carmen, Nieves Mijimolle, Alma Dhawahir, Pierre Dubus, Marta Barradas, Manuel Serrano, Victoria Campuzano, and Mariano Barbacid. 2003. "Tumor Induction by an Endogenous K-Ras Oncogene Is Highly Dependent on Cellular Context." *Cancer Cell* 4 (2): 111–20.
- Guerrero, C., J. M. Rojas, M. Chedid, L. M. Esteban, D. B. Zimonjic, N. C. Popescu, J. Font de Mora, and E. Santos. 1996. "Expression of Alternative Forms of Ras Exchange Factors GRF and SOS1 in Different Human Tissues and Cell Lines." *Oncogene* 12 (5): 1097–1107.

- Guitard, E., I. Barlat, F. Maurier, F. Schweighoffer, and B. Tocque. 1998. "Sam68 Is a Ras-GAP-Associated Protein in Mitosis." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 245 (2): 562–66. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8374>.
- Guo, Jessie Yanxiang, and Eileen White. 2013. "Autophagy Is Required for Mitochondrial Function, Lipid Metabolism, Growth, and Fate of KRAS(G12D)-Driven Lung Tumors." *Autophagy* 9 (10): 1636–38. <https://doi.org/10.4161/auto.26123>.
- Gupta, Surbhi, Antoine R. Ramjaun, Paula Haiko, Yihua Wang, Patricia H. Warne, Barbara Nicke, Emma Nye, Gordon Stamp, Kari Alitalo, and Julian Downward. 2007. "Binding of Ras to Phosphoinositide 3-Kinase P110alpha Is Required for Ras-Driven Tumorigenesis in Mice." *Cell* 129 (5): 957–68. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.051>.
- Gutmann, David H., Michael D. McLellan, Ibrahim Hussain, John W. Wallis, Lucinda L. Fulton, Robert S. Fulton, Vincent Magrini, et al. 2013. "Somatic Neurofibromatosis Type 1 (NF1) Inactivation Characterizes NF1-Associated Pilocytic Astrocytoma." *Genome Research* 23 (3): 431–39. <https://doi.org/10.1101/gr.142604.112>.
- Gyori, David, Tamara Chessa, Phillip T. Hawkins, and Len R. Stephens. 2017. "Class (I) Phosphoinositide 3-Kinases in the Tumor Microenvironment." *Cancers* 9 (3). <https://doi.org/10.3390/cancers9030024>.
- Haferlach, C., V. Grossmann, A. Kohlmann, S. Schindela, W. Kern, S. Schnittger, and T. Haferlach. 2012. "Deletion of the Tumor-Suppressor Gene NF1 Occurs in 5% of Myeloid Malignancies and Is Accompanied by a Mutation in the Remaining Allele in Half of the Cases." *Leukemia* 26 (4): 834–39. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.296>.
- Haga, Raquel B., and Anne J. Ridley. 2016. "Rho GTPases: Regulation and Roles in Cancer Cell Biology." *Small GTPases* 7 (4): 207–21. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1232583>.
- Hagemann, C., and U. R. Rapp. 1999. "Isotype-Specific Functions of Raf Kinases." *Experimental Cell Research* 253 (1): 34–46. <https://doi.org/10.1006/excr.1999.4689>.
- Haigis, Kevin M., Krystle R. Kendall, Yufang Wang, Ann Cheung, Marcia C. Haigis, Jonathan N. Glickman, Michiko Niwa-Kawakita, et al. 2008. "Differential Effects of Oncogenic K-Ras and N-Ras on Proliferation, Differentiation and Tumor Progression in the Colon." *Nature Genetics* 40 (5): 600–608. <https://doi.org/10.1038/ng.115>.
- Hall, Amy B., Natalia Jura, John DaSilva, Yeon Joo Jang, Delquin Gong, and Dafna Bar-Sagi. 2003. "HSpry2 Is Targeted to the Ubiquitin-Dependent Proteasome Pathway by c-Cbl." *Current Biology: CB* 13 (4): 308–14.
- Hamad, Nesrin M., Joel H. Elconin, Antoine E. Karnoub, Wenli Bai, Jeremy N. Rich, Robert T. Abraham, Channing J. Der, and Christopher M. Counter. 2002. "Distinct Requirements for Ras Oncogenesis in Human versus Mouse Cells." *Genes & Development* 16 (16): 2045–57. <https://doi.org/10.1101/gad.993902>.
- Hanafusa, Hiroshi, Satoru Torii, Takayuki Yasunaga, Kunihiro Matsumoto, and Eisuke Nishida. 2004. "Shp2, an SH2-Containing Protein-Tyrosine Phosphatase, Positively Regulates Receptor Tyrosine Kinase Signaling by Dephosphorylating and Inactivating the Inhibitor Sprouty." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (22): 22992–95. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312498200>.
- Hanafusa, Hiroshi, Satoru Torii, Takayuki Yasunaga, and Eisuke Nishida. 2002. "Sprouty1 and Sprouty2 Provide a Control Mechanism for the Ras/MAPK Signalling Pathway." *Nature Cell Biology* 4 (11): 850–58. <https://doi.org/10.1038/ncb867>.
- Hanahan, D., and R. A. Weinberg. 2000. "The Hallmarks of Cancer." *Cell* 100 (1): 57–70.
- Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. 2011. "Hallmarks of Cancer: The next Generation." *Cell* 144 (5): 646–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- Hancock, John F. 2003. "Ras Proteins: Different Signals from Different Locations." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4 (5): 373–85. <https://doi.org/10.1038/nrm1105>.
- Hanekamp, Diana, Jacqueline Cloos, and Gerrit Jan Schuurhuis. 2017. "Leukemic Stem Cells: Identification and Clinical Application." *International Journal of Hematology* 105 (5): 549–57. <https://doi.org/10.1007/s12185-017-2221-5>.
- Haq, Rizwan, Jonathan Shoag, Pedro Andreu-Perez, Satoru Yokoyama, Hannah Edelman, Glenn C. Rowe, Dennie T. Frederick, et al. 2013. "Oncogenic BRAF Regulates Oxidative Metabolism via PGC1 $\alpha$  and MITF." *Cancer Cell* 23 (3): 302–15. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.02.003>.
- Harada, Yasuo, Isao Ishii, Kiyohiko Hatake, and Tadashi Kasahara. 2012. "Pyruvium Pamoate Inhibits Proliferation of Myeloma/Erythroleukemia Cells by Suppressing Mitochondrial Respiratory Complex I and STAT3." *Cancer Letters* 319 (1): 83–88. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.12.034>.

- Harousseau, Jean-Luc, Giovanni Martinelli, Wieslaw W. Jedrzejczak, Joseph M. Brandwein, Dominique Bordessoule, Tamas Masszi, Gert J. Ossenkoppele, et al. 2009. "A Randomized Phase 3 Study of Tipifarnib Compared with Best Supportive Care, Including Hydroxyurea, in the Treatment of Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia in Patients 70 Years or Older." *Blood* 114 (6): 1166–73. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-01-198093>.
- Hartzell, Catherine, Olga Ksionda, Ed Lemmens, Kristen Coakley, Ming Yang, Monique Dail, Richard C. Harvey, et al. 2013. "Dysregulated RasGRP1 Responds to Cytokine Receptor Input in T Cell Leukemogenesis." *Sci. Signal.* 6 (268): ra21–ra21. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2003848>.
- Heath, E. M., S. M. Chan, M. D. Minden, T. Murphy, L. I. Shlush, and A. D. Schimmer. 2017. "Biological and Clinical Consequences of *NPM1* Mutations in AML." *Leukemia* 31 (4): 798–807. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.30>.
- Hedman, Andrew C., Jessica M. Smith, and David B. Sacks. 2015. "The Biology of IQGAP Proteins: Beyond the Cytoskeleton." *EMBO Reports* 16 (4): 427–46. <https://doi.org/10.15252/embr.201439834>.
- Heide, E. K. von der, M. Neumann, S. Vosberg, A. R. James, M. P. Schroeder, J. Ortiz-Tanchez, K. Isaakidis, et al. 2017. "Molecular Alterations in Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells Derived from Acute Myeloid Leukemia Patients." *Leukemia* 31 (5): 1069–78. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.324>.
- Hennig, Anne, Robby Markwart, Manuel A. Esparza-Franco, Graham Ladds, and Ignacio Rubio. 2015. "Ras Activation Revisited: Role of GEF and GAP Systems." *Biological Chemistry* 396 (8): 831–48. <https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0257>.
- Herr, A.-L., M. Labopin, D. Blaise, N. Milpied, M. Potter, M. Michallet, W. Heit, et al. 2007. "HLA-Identical Sibling Allogeneic Peripheral Blood Stem Cell Transplantation with Reduced Intensity Conditioning Compared to Autologous Peripheral Blood Stem Cell Transplantation for Elderly Patients with de Novo Acute Myeloid Leukemia." *Leukemia* 21 (1): 129–35. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404461>.
- Hills, Robert K., Sylvie Castaigne, Frederick R. Appelbaum, Jacques Delaunay, Stephen Petersdorf, Megan Othus, Elihu H. Estey, et al. 2014. "Addition of Gemtuzumab Ozogamicin to Induction Chemotherapy in Adult Patients with Acute Myeloid Leukaemia: A Meta-Analysis of Individual Patient Data from Randomised Controlled Trials." *The Lancet Oncology* 15 (9): 986–96. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70281-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70281-5).
- Hingorani, Sunil R., Lifu Wang, Asha S. Multani, Chelsea Combs, Therese B. Deramandt, Ralph H. Hruban, Anil K. Rustgi, Sandy Chang, and David A. Tuveson. 2005. "Trp53R172H and KrasG12D Cooperate to Promote Chromosomal Instability and Widely Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma in Mice." *Cancer Cell* 7 (5): 469–83. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.04.023>.
- Hirata, Yasuko, Hilde Brems, Mayu Suzuki, Mitsuhiro Kanamori, Masahiro Okada, Rimpei Morita, Isabel Llano-Rivas, et al. 2016. "Interaction between a Domain of the Negative Regulator of the Ras-ERK Pathway, SPRED1 Protein, and the GTPase-Activating Protein-Related Domain of Neurofibromin Is Implicated in Legius Syndrome and Neurofibromatosis Type 1." *The Journal of Biological Chemistry* 291 (7): 3124–34. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.703710>.
- Hirbe, Angela C., and David H. Gutmann. 2014. "Neurofibromatosis Type 1: A Multidisciplinary Approach to Care." *The Lancet Neurology* 13 (8): 834–43. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70063-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70063-8).
- Hirsch, Pierre, Yanyan Zhang, Ruoping Tang, Virginie Joulin, H el ene Boutroux, Elodie Pronier, Hannah Moatti, et al. 2016. "Genetic Hierarchy and Temporal Variagation in the Clonal History of Acute Myeloid Leukaemia." *Nature Communications* 7: 12475. <https://doi.org/10.1038/ncomms12475>.
- Ho, Tzu-Chieh, Mark LaMere, Brett M. Stevens, John M. Ashton, Jason R. Myers, Kristen M. O'Dwyer, Jane L. Liesveld, et al. 2016. "Evolution of Acute Myelogenous Leukemia Stem Cell Properties after Treatment and Progression." *Blood* 128 (13): 1671–78. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-02-695312>.
- Hobbs, G. Aaron, Channing J. Der, and Kent L. Rossman. 2016. "RAS Isoforms and Mutations in Cancer at a Glance." *Journal of Cell Science* 129 (7): 1287–92. <https://doi.org/10.1242/jcs.182873>.
- Holderfield, Matthew, Hanne Merritt, John Chan, Marco Wallroth, Laura Tandeske, Huili Zhai, John Tellew, et al. 2013. "RAF Inhibitors Activate the MAPK Pathway by Relieving Inhibitory Autophosphorylation." *Cancer Cell* 23 (5): 594–602. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.03.033>.
- Hollstein, Pablo E., and Karen Cichowski. 2013. "Identifying the Ubiquitin Ligase Complex That Regulates the NF1 Tumor Suppressor and Ras." *Cancer Discovery* 3 (8): 880–93. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0146>.



- Holowiecki, Jerzy, Sebastian Grosicki, Sebastian Giebel, Tadeusz Robak, Slawomira Kyrz-Krzemien, Kazimierz Kuliczowski, Aleksander B. Skotnicki, et al. 2012. "Cladribine, but Not Fludarabine, Added to Daunorubicin and Cytarabine during Induction Prolongs Survival of Patients with Acute Myeloid Leukemia: A Multicenter, Randomized Phase III Study." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 30 (20): 2441–48. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.37.1286>.
- Horiike, S., S. Misawa, H. Nakai, H. Kaneko, S. Yokota, M. Taniwaki, Y. Yamane, J. Inazawa, T. Abe, and K. Kashima. 1994. "N-Ras Mutation and Karyotypic Evolution Are Closely Associated with Leukemic Transformation in Myelodysplastic Syndrome." *Leukemia* 8 (8): 1331–36.
- Horn, Thomas, Stéphane Ferretti, Nicolas Ebel, Angela Tam, Samuel Ho, Fred Harbinski, Ali Farsidjani, et al. 2016. "High-Order Drug Combinations Are Required to Effectively Kill Colorectal Cancer Cells." *Cancer Research* 76 (23): 6950–63. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-3425>.
- Hoshii, Takayuki, Yuko Tadokoro, Kazuhito Naka, Takako Ooshio, Teruyuki Muraguchi, Naoyuki Sugiyama, Tomoyoshi Soga, Kimi Araki, Ken-Ichi Yamamura, and Atsushi Hirao. 2012. "MTORC1 Is Essential for Leukemia Propagation but Not Stem Cell Self-Renewal." *The Journal of Clinical Investigation* 122 (6): 2114–29. <https://doi.org/10.1172/JCI62279>.
- Hou, Hsin-An, Chieh-Yu Liu, Yuan-Yeh Kuo, Wen-Chien Chou, Cheng-Hong Tsai, Chien-Chin Lin, Liang-In Lin, et al. 2016. "Splicing Factor Mutations Predict Poor Prognosis in Patients with de Novo Acute Myeloid Leukemia." *Oncotarget* 7 (8): 9084–9101. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7000>.
- Hourigan, Christopher S., and Judith E. Karp. 2013. "Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukaemia." *Nature Reviews. Clinical Oncology* 10 (8): 460–71. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.100>.
- Huang, Hui, Andrew J. Woo, Zachary Waldon, Yocheved Schindler, Tyler B. Moran, Helen H. Zhu, Gen-Sheng Feng, Hanno Steen, and Alan B. Cantor. 2012. "A Src Family Kinase-Shp2 Axis Controls RUNX1 Activity in Megakaryocyte and T-Lymphocyte Differentiation." *Genes & Development* 26 (14): 1587–1601. <https://doi.org/10.1101/gad.192054.112>.
- Huls, Gerwin, Dana A. Chitu, Violaine Havelange, Mojca Jongen-Lavrencic, Arjan A. van de Loosdrecht, Bart J. Biemond, Harm Sinnige, et al. 2019. "Azacitidine Maintenance after Intensive Chemotherapy Improves DFS in Older AML Patients." *Blood* 133 (13): 1457–64. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-10-879866>.
- Hunter, John C., Anuj Manandhar, Martin A. Carrasco, Deepak Gurbani, Sudershan Gondi, and Kenneth D. Westover. 2015. "Biochemical and Structural Analysis of Common Cancer-Associated KRAS Mutations." *Molecular Cancer Research: MCR* 13 (9): 1325–35. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-15-0203>.
- Iida, M., M. Towatari, A. Nakao, H. Iida, H. Kiyoi, Y. Nakano, M. Tanimoto, H. Saito, and T. Naoe. 1999. "Lack of Constitutive Activation of MAP Kinase Pathway in Human Acute Myeloid Leukemia Cells with N-Ras Mutation." *Leukemia* 13 (4): 585–89.
- Illmer, Thomas, Christian Thiede, Anke Fredersdorf, Sylvia Stadler, Andreas Neubauer, Gerhard Ehninger, and Markus Schaich. 2005. "Activation of the RAS Pathway Is Predictive for a Chemosensitive Phenotype of Acute Myelogenous Leukemia Blasts." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 11 (9): 3217–24. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2232>.
- Innocenti, Metello, Pierluigi Tenca, Emanuela Frittoli, Mario Faretta, Arianna Tocchetti, Pier Paolo Di Fiore, and Giorgio Scita. 2002. "Mechanisms through Which Sos-1 Coordinates the Activation of Ras and Rac." *The Journal of Cell Biology* 156 (1): 125–36. <https://doi.org/10.1083/jcb.200108035>.
- Ito, Sawa, A. John Barrett, Amalia Dutra, Evgenia Pak, Samantha Miner, Keyvan Keyvanfar, Nancy F. Hensel, et al. 2015. "Long Term Maintenance of Myeloid Leukemic Stem Cells Cultured with Unrelated Human Mesenchymal Stromal Cells." *Stem Cell Research* 14 (1): 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2014.11.007>.
- Itzykson, Raphael, Nicolas Duployez, Annette Fasan, Gauthier Decool, Alice Marceau-Renaut, Manja Meggendorfer, Eric Jourdan, et al. 2018. "Clonal Interference of Signaling Mutations Worsens Prognosis in Core-Binding Factor Acute Myeloid Leukemia." *Blood* 132 (2): 187–96. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-03-837781>.
- Ivanoff, Sarah, Berengere Gruson, Sylvain P. Chantepie, Emilie Lemasle, Lavinia Merlusca, Veronique Harrivel, Amandine Charbonnier, Patrick Votte, Bruno Royer, and Jean-Pierre Marolleau. 2013. "5-Azacitidine Treatment for Relapsed or Refractory Acute Myeloid Leukemia after Intensive Chemotherapy." *American Journal of Hematology* 88 (7): 601–5. <https://doi.org/10.1002/ajh.23464>.

- Ivey, Adam, Robert K. Hills, Michael A. Simpson, Jelena V. Jovanovic, Amanda Gilkes, Angela Grech, Yashma Patel, et al. 2016. "Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML." *The New England Journal of Medicine* 374 (5): 422–33. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1507471>.
- Iwasa, Hiroaki, Shakhawoat Hossain, and Yutaka Hata. 2018. "Tumor Suppressor C-RASSF Proteins." *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 75 (10): 1773–87. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2756-5>.
- Iwig, Jeffrey S., Yvonne Vercoulen, Rahul Das, Tiago Barros, Andre Limnander, Yan Che, Jeffrey G. Pelton, David E. Wemmer, Jeroen P. Roose, and John Kuriyan. 2013. "Structural Analysis of Autoinhibition in the Ras-Specific Exchange Factor RasGRP1." *ELife* 2 (July): e00813. <https://doi.org/10.7554/eLife.00813>.
- Jabbour, Elias, Naval Daver, Richard Champlin, Michael Mathisen, Betul Oran, Stefan Ciurea, Issa Khouri, et al. 2014. "Allogeneic Stem Cell Transplantation as Initial Salvage for Patients with Acute Myeloid Leukemia Refractory to High-Dose Cytarabine-Based Induction Chemotherapy." *American Journal of Hematology* 89 (4): 395–98. <https://doi.org/10.1002/ajh.23655>.
- Jacks, T., T. S. Shih, E. M. Schmitt, R. T. Bronson, A. Bernards, and R. A. Weinberg. 1994. "Tumour Predisposition in Mice Heterozygous for a Targeted Mutation in Nf1." *Nature Genetics* 7 (3): 353–61. <https://doi.org/10.1038/ng0794-353>.
- Jackson, J. H., C. G. Cochrane, J. R. Bourne, P. A. Soltski, J. E. Buss, and C. J. Der. 1990. "Farnesol Modification of Kirsten-Ras Exon 4B Protein Is Essential for Transformation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (8): 3042–46.
- Jacque, Nathalie, Anne Marie Ronchetti, Clément Larrue, Godelieve Meunier, Rudy Birsens, Lise Willems, Estelle Saland, et al. 2015. "Targeting Glutaminolysis Has Antileukemic Activity in Acute Myeloid Leukemia and Synergizes with BCL-2 Inhibition." *Blood* 126 (11): 1346–56. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-01-621870>.
- Jain, Nitin, Emily Curran, Neil M. Iyengar, Ernesto Diaz-Flores, Rangesh Kunnavakkam, Leslie Popplewell, Mark H. Kirschbaum, et al. 2014. "Phase II Study of the Oral MEK Inhibitor Selumetinib in Advanced Acute Myelogenous Leukemia: A University of Chicago Phase II Consortium Trial." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 20 (2): 490–98. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1311>.
- Jaiswal, Siddhartha, Pierre Fontanillas, Jason Flannick, Alisa Manning, Peter V. Grauman, Brenton G. Mar, R. Coleman Lindsley, et al. 2014. "Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes." *The New England Journal of Medicine* 371 (26): 2488–98. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1408617>.
- Janes, Matthew R., Jingchuan Zhang, Lian-Sheng Li, Rasmus Hansen, Ulf Peters, Xin Guo, Yuching Chen, et al. 2018. "Targeting KRAS Mutant Cancers with a Covalent G12C-Specific Inhibitor." *Cell* 172 (3): 578–589.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.006>.
- Jänne, Pasi A., Michel M. van den Heuvel, Fabrice Barlesi, Manuel Cobo, Julien Mazieres, Lucio Crinò, Sergey Orlov, et al. 2017. "Selumetinib Plus Docetaxel Compared With Docetaxel Alone and Progression-Free Survival in Patients With KRAS-Mutant Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: The SELECT-1 Randomized Clinical Trial." *JAMA* 317 (18): 1844–53. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.3438>.
- Janssen, J. W., A. C. Steenvoorden, J. Lyons, B. Anger, J. U. Böhlke, J. L. Bos, H. Seliger, and C. R. Bartram. 1987. "RAS Gene Mutations in Acute and Chronic Myelocytic Leukemias, Chronic Myeloproliferative Disorders, and Myelodysplastic Syndromes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (24): 9228–32. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.24.9228>.
- Jeng, Hao-Hsuan, Laura J. Taylor, and Dafna Bar-Sagi. 2012. "Sos-Mediated Cross-Activation of Wild-Type Ras by Oncogenic Ras Is Essential for Tumorigenesis." *Nature Communications* 3: 1168. <https://doi.org/10.1038/ncomms2173>.
- Jing, Junping, Joel Greshock, Joanna Dawn Holbrook, Aidan Gilmartin, Xiping Zhang, Elizabeth McNeil, Theresa Conway, et al. 2012. "Comprehensive Predictive Biomarker Analysis for MEK Inhibitor GSK1120212." *Molecular Cancer Therapeutics* 11 (3): 720–29. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0505>.
- Johannessen, Cory M., Bryan W. Johnson, Sybil M. Genther Williams, Annie W. Chan, Elizabeth E. Reczek, Ryan C. Lynch, Matthew J. Rioth, Andrea McClatchey, Sandra Ryeom, and Karen Cichowski. 2008. "TORC1 Is Essential for NF1-Associated Malignancies." *Current Biology: CB* 18 (1): 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.11.066>.

- Johnson, L., D. Greenbaum, K. Cichowski, K. Mercer, E. Murphy, E. Schmitt, R. T. Bronson, et al. 1997. "K-Ras Is an Essential Gene in the Mouse with Partial Functional Overlap with N-Ras." *Genes & Development* 11 (19): 2468–81. <https://doi.org/10.1101/gad.11.19.2468>.
- Johnson, L., K. Mercer, D. Greenbaum, R. T. Bronson, D. Crowley, D. A. Tuveson, and T. Jacks. 2001. "Somatic Activation of the K-Ras Oncogene Causes Early Onset Lung Cancer in Mice." *Nature* 410 (6832): 1111–16. <https://doi.org/10.1038/35074129>.
- Jones, Courtney L., Brett M. Stevens, Angelo D'Alessandro, Julie A. Reisz, Rachel Culp-Hill, Travis Nemkov, Shanshan Pei, et al. 2018. "Inhibition of Amino Acid Metabolism Selectively Targets Human Leukemia Stem Cells." *Cancer Cell* 34 (5): 724–740.e4. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.10.005>.
- Jones, Richard J., and Scott A. Armstrong. 2008. "Cancer Stem Cells in Hematopoietic Malignancies." *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 14 (Supplement 1): 12–16. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2007.10.012>.
- Jordan, C. T. 2002. "Unique Molecular and Cellular Features of Acute Myelogenous Leukemia Stem Cells." *Leukemia* 16 (4): 559–62. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402446>.
- Jost, Marco, Yuwen Chen, Luke A. Gilbert, Max A. Horlbeck, Lenno Krenning, Grégory Menchon, Ankit Rai, et al. 2017. "Combined CRISPR/a-Based Chemical Genetic Screens Reveal That Rigosertib Is a Microtubule-Destabilizing Agent." *Molecular Cell* 68 (1): 210–223.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.09.012>.
- Juliusson, Gunnar, Vladimir Lazarevic, Ann-Sofi Hörstedt, Oskar Hagberg, Martin Höglund, and Swedish Acute Leukemia Registry Group. 2012. "Acute Myeloid Leukemia in the Real World: Why Population-Based Registries Are Needed." *Blood* 119 (17): 3890–99. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-12-379008>.
- Kaduwal, Saluja, Woo-Jeong Jeong, Jong-Chan Park, Kug Hwa Lee, Young-Mi Lee, Soung-Hoo Jeon, Yong-Beom Lim, Do Sik Min, and Kang-Yell Choi. 2015. "Sur8/Shoc2 Promotes Cell Motility and Metastasis through Activation of Ras-PI3K Signaling." *Oncotarget* 6 (32): 33091–105. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5173>.
- Kallunki, T., B. Su, I. Tsigelny, H. K. Sluss, B. Dérijard, G. Moore, R. Davis, and M. Karin. 1994. "JNK2 Contains a Specificity-Determining Region Responsible for Efficient c-Jun Binding and Phosphorylation." *Genes & Development* 8 (24): 2996–3007.
- Kandoth, Cyriac, Michael D. McLellan, Fabio Vandin, Kai Ye, Beifang Niu, Charles Lu, Mingchao Xie, et al. 2013. "Mutational Landscape and Significance across 12 Major Cancer Types." *Nature* 502 (7471): 333–39. <https://doi.org/10.1038/nature12634>.
- Kantarjian, Hagop M., Xavier G. Thomas, Anna Dmoszynska, Agnieszka Wierzbowska, Grzegorz Mazur, Jiri Mayer, Jyh-Pyng Gau, et al. 2012. "Multicenter, Randomized, Open-Label, Phase III Trial of Decitabine versus Patient Choice, with Physician Advice, of Either Supportive Care or Low-Dose Cytarabine for the Treatment of Older Patients with Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 30 (21): 2670–77. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.38.9429>.
- Karamitopoulou, Eva, Inti Zlobec, Beat Gloor, Agathi Kondi-Pafiti, Alessandro Lugli, and Aurel Perren. 2013. "Loss of Raf-1 Kinase Inhibitor Protein (RKIP) Is Strongly Associated with High-Grade Tumor Budding and Correlates with an Aggressive Phenotype in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC)." *Journal of Translational Medicine* 11 (December): 311. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-311>.
- Kashatus, David F. 2013. "Ral GTPases in Tumorigenesis: Emerging from the Shadows." *Experimental Cell Research* 319 (15): 2337–42. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.06.020>.
- Kelly, Louise M., and D. Gary Gilliland. 2002. "Genetics of Myeloid Leukemias." *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 3: 179–98. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.3.032802.115046>.
- Kelly, Priscilla N., Aleksandar Dakic, Jerry M. Adams, Stephen L. Nutt, and Andreas Strasser. 2007. "Tumor Growth Need Not Be Driven by Rare Cancer Stem Cells." *Science (New York, N.Y.)* 317 (5836): 337. <https://doi.org/10.1126/science.1142596>.
- Keyse, S. M. 2000. "Protein Phosphatases and the Regulation of Mitogen-Activated Protein Kinase Signalling." *Current Opinion in Cell Biology* 12 (2): 186–92.
- Khalade, Abdul, Maritta S. Jaakkola, Eero Pukkala, and Jouni J. K. Jaakkola. 2010. "Exposure to Benzene at Work and the Risk of Leukemia: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Environmental Health: A Global Access Science Source* 9: 31. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-9-31>.

- Khosravi-Far, R., M. A. White, J. K. Westwick, P. A. Solski, M. Chrzanowska-Wodnicka, L. Van Aelst, M. H. Wigler, and C. J. Der. 1996. "Oncogenic Ras Activation of Raf/Mitogen-Activated Protein Kinase-Independent Pathways Is Sufficient to Cause Tumorigenic Transformation." *Molecular and Cellular Biology* 16 (7): 3923–33.
- Kikuchi, Hirotochi, Maria S. Pino, Min Zeng, Senji Shirasawa, and Daniel C. Chung. 2009. "Oncogenic KRAS and BRAF Differentially Regulate Hypoxia-Inducible Factor-1alpha and -2alpha in Colon Cancer." *Cancer Research* 69 (21): 8499–8506. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2213>.
- Kim, D., S. Kim, H. Koh, S. O. Yoon, A. S. Chung, K. S. Cho, and J. Chung. 2001. "Akt/PKB Promotes Cancer Cell Invasion via Increased Motility and Metalloproteinase Production." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15 (11): 1953–62. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0198com>.
- Kim, Hong Joo, and Dafna Bar-Sagi. 2004. "Modulation of Signalling by Sprouty: A Developing Story." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 5 (6): 441–50. <https://doi.org/10.1038/nrm1400>.
- Kim, Min-Jung, Soo-Jung Woo, Chang-Hwan Yoon, Jae-Seong Lee, Sungkwan An, Yung-Hyun Choi, Sang-Gu Hwang, Gyesoon Yoon, and Su-Jae Lee. 2011. "Involvement of Autophagy in Oncogenic K-Ras-Induced Malignant Cell Transformation." *The Journal of Biological Chemistry* 286 (15): 12924–32. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.138958>.
- Kimmelman, Alec C. 2015. "Metabolic Dependencies in RAS-Driven Cancers." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 21 (8): 1828–34. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2425>.
- King, A. J., H. Sun, B. Diaz, D. Barnard, W. Miao, S. Bagrodia, and M. S. Marshall. 1998. "The Protein Kinase Pak3 Positively Regulates Raf-1 Activity through Phosphorylation of Serine 338." *Nature* 396 (6707): 180–83. <https://doi.org/10.1038/24184>.
- Kiyoi, H., T. Naoe, Y. Nakano, S. Yokota, S. Minami, S. Miyawaki, N. Asou, et al. 1999. "Prognostic Implication of FLT3 and N-RAS Gene Mutations in Acute Myeloid Leukemia." *Blood* 93 (9): 3074–80.
- Kjeldgaard, M., J. Nyborg, and B. F. Clark. 1996. "The GTP Binding Motif: Variations on a Theme." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 10 (12): 1347–68.
- Kodaki, T., R. Woscholski, B. Hallberg, P. Rodriguez-Viciana, J. Downward, and P. J. Parker. 1994. "The Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase by Ras." *Current Biology: CB* 4 (9): 798–806.
- Kolch, Walter. 2005. "Coordinating ERK/MAPK Signalling through Scaffolds and Inhibitors." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 6 (11): 827–37. <https://doi.org/10.1038/nrm1743>.
- Kong, G., Y.-I. Chang, A. Damnernasawad, X. You, J. Du, E. A. Ranheim, W. Lee, et al. 2016. "Loss of Wild-Type *Kras* Promotes Activation of All Ras Isoforms in Oncogenic *Kras*-Induced Leukemogenesis." *Leukemia* 30 (7): 1542–51. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.40>.
- Kotecha, Nikesh, Nikki J. Flores, Jonathan M. Irish, Erin F. Simonds, Debbie S. Sakai, Sophie Archambeault, Ernesto Diaz-Flores, et al. 2008. "Single-Cell Profiling Identifies Aberrant STAT5 Activation in Myeloid Malignancies with Specific Clinical and Biologic Correlates." *Cancer Cell* 14 (4): 335–43. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.08.014>.
- Krauthammer, Michael, Yong Kong, Byung Hak Ha, Perry Evans, Antonella Bacchiocchi, James P. McCusker, Elaine Cheng, et al. 2012. "Exome Sequencing Identifies Recurrent Somatic RAC1 Mutations in Melanoma." *Nature Genetics* 44 (9): 1006–14. <https://doi.org/10.1038/ng.2359>.
- Krygowska, Agata Adelajda, and Esther Castellano. 2018. "PI3K: A Crucial Piece in the RAS Signaling Puzzle." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 8 (6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031450>.
- Kurosawa, Saiko, Takuhiro Yamaguchi, Shuichi Miyawaki, Naoyuki Uchida, Toru Sakura, Heiwa Kanamori, Kensuke Usuki, et al. 2010. "Prognostic Factors and Outcomes of Adult Patients with Acute Myeloid Leukemia after First Relapse." *Haematologica* 95 (11): 1857–64. <https://doi.org/10.3324/haematol.2010.027516>.
- Kyriakis, J. M., H. App, X. F. Zhang, P. Banerjee, D. L. Brautigan, U. R. Rapp, and J. Avruch. 1992. "Raf-1 Activates MAP Kinase-Kinase." *Nature* 358 (6385): 417–21. <https://doi.org/10.1038/358417a0>.
- Lake, David, Sonia A. L. Corrêa, and Jürgen Müller. 2016. "Negative Feedback Regulation of the ERK1/2 MAPK Pathway." *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 73 (23): 4397–4413. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2297-8>.

- Lambert, John M., Que T. Lambert, Gary W. Reuther, Angeliki Malliri, David P. Siderovski, John Sondek, John G. Collard, and Channing J. Der. 2002. "Tiam1 Mediates Ras Activation of Rac by a PI(3)K-Independent Mechanism." *Nature Cell Biology* 4 (8): 621–25. <https://doi.org/10.1038/ncb833>.
- Lancet, Jeffrey E., Ivana Gojo, Jason Gotlib, Eric J. Feldman, Jacqueline Greer, Jane L. Liesveld, Laura M. Bruzek, et al. 2007. "A Phase 2 Study of the Farnesyltransferase Inhibitor Tipifarnib in Poor-Risk and Elderly Patients with Previously Untreated Acute Myelogenous Leukemia." *Blood* 109 (4): 1387–94. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-014357>.
- Lancet, Jeffrey E., Geoffrey L. Uy, Jorge E. Cortes, Laura F. Newell, Tara L. Lin, Ellen K. Ritchie, Robert K. Stuart, et al. 2018. "CPX-351 (Cytarabine and Daunorubicin) Liposome for Injection Versus Conventional Cytarabine Plus Daunorubicin in Older Patients With Newly Diagnosed Secondary Acute Myeloid Leukemia." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 36 (26): 2684–92. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.77.6112>.
- Largaespada, D. A., C. I. Brannan, N. A. Jenkins, and N. G. Copeland. 1996. "Nf1 Deficiency Causes Ras-Mediated Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor Hypersensitivity and Chronic Myeloid Leukaemia." *Nature Genetics* 12 (2): 137–43. <https://doi.org/10.1038/ng0296-137>.
- Larson, Richard A. 2007. "Is Secondary Leukemia an Independent Poor Prognostic Factor in Acute Myeloid Leukemia?" *Best Practice & Research. Clinical Haematology* 20 (1): 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2006.10.006>.
- Lauchle, Jennifer O., Doris Kim, Doan T. Le, Keiko Akagi, Michael Crone, Kimberly Krisman, Kegan Warner, et al. 2009. "Response and Resistance to MEK Inhibition in Leukaemias Initiated by Hyperactive Ras." *Nature* 461 (7262): 411–14. <https://doi.org/10.1038/nature08279>.
- Lavoie, Hugo, Malha Sahmi, Pierre Maisonneuve, Sara A. Marullo, Neroshan Thevakumaran, Ting Jin, Igor Kurinov, Frank Sicheri, and Marc Therrien. 2018. "MEK Drives BRAF Activation through Allosteric Control of KSR Proteins." *Nature* 554 (7693): 549–53. <https://doi.org/10.1038/nature25478>.
- Lavoie, Hugo, and Marc Therrien. 2015. "Regulation of RAF Protein Kinases in ERK Signalling." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16 (5): 281–98. <https://doi.org/10.1038/nrm3979>.
- Le, Doan T., Namie Kong, Yuan Zhu, Jennifer O. Lauchle, Abigail Aiyigari, Benjamin S. Braun, Endi Wang, et al. 2004. "Somatic Inactivation of Nf1 in Hematopoietic Cells Results in a Progressive Myeloproliferative Disorder." *Blood* 103 (11): 4243–50. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-08-2650>.
- Le Pogam, Carole, Patricia Krief, Stephanie Beurlet, Annie Soulié, Nicole Balitrand, Bruno Cassinat, Helene Cavé, et al. 2013. "Localization of the NRAS:BCL-2 Complex Determines Anti-Apoptotic Features Associated with Progressive Disease in Myelodysplastic Syndromes." *Leukemia Research* 37 (3): 312–19. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2012.10.018>.
- Léauté-Labrèze, Christine, Eric Dumas de la Roque, Thomas Hubiche, Franck Boralevi, Jean-Benoît Thambo, and Alain Taïeb. 2008. "Propranolol for Severe Hemangiomas of Infancy." *The New England Journal of Medicine* 358 (24): 2649–51. <https://doi.org/10.1056/NEJMc0708819>.
- Ledford, Heidi. 2015. "Cancer: The Ras Renaissance." *Nature News* 520 (7547): 278. <https://doi.org/10.1038/520278a>.
- Lee, Chih-Shia, Liam C. Lee, Tina L. Yuan, Sirisha Chakka, Christof Fellmann, Scott W. Lowe, Natasha J. Caplen, Frank McCormick, and Ji Luo. 2019. "MAP Kinase and Autophagy Pathways Cooperate to Maintain RAS Mutant Cancer Cell Survival." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, February. <https://doi.org/10.1073/pnas.1817494116>.
- Lee, William, Sewit Teckie, Thomas Wiesner, Leili Ran, Carlos N. Prieto Granada, Mingyan Lin, Sinan Zhu, et al. 2014. "PRC2 Is Recurrently Inactivated through EED or SUZ12 Loss in Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors." *Nature Genetics* 46 (11): 1227–32. <https://doi.org/10.1038/ng.3095>.
- Lenarduzzi, Michelle, Angela B. Y. Hui, Nehad M. Alajez, Wei Shi, Justin Williams, Shijun Yue, Brian O'Sullivan, and Fei-Fei Liu. 2013. "MicroRNA-193b Enhances Tumor Progression via down Regulation of Neurofibromin 1." *PLoS One* 8 (1): e53765. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053765>.
- Levchenko, A., J. Bruck, and P. W. Sternberg. 2000. "Scaffold Proteins May Biphasically Affect the Levels of Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling and Reduce Its Threshold Properties." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (11): 5818–23.

- Li, Qing, Kevin M. Haigis, Andrew McDaniel, Emily Harding-Theobald, Scott C. Kogan, Keiko Akagi, Jasmine C. Y. Wong, et al. 2011. "Hematopoiesis and Leukemogenesis in Mice Expressing Oncogenic NrasG12D from the Endogenous Locus." *Blood* 117 (6): 2022–32. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-04-280750>.
- Li, Siqi, Allan Balmain, and Christopher M. Counter. 2018. "A Model for RAS Mutation Patterns in Cancers: Finding the Sweet Spot." *Nature Reviews. Cancer* 18 (12): 767–77. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0076-6>.
- Li, W., R. Nishimura, A. Kashishian, A. G. Batzer, W. J. Kim, J. A. Cooper, and J. Schlessinger. 1994. "A New Function for a Phosphotyrosine Phosphatase: Linking GRB2-Sos to a Receptor Tyrosine Kinase." *Molecular and Cellular Biology* 14 (1): 509–17.
- Li, Y., G. Bollag, R. Clark, J. Stevens, L. Conroy, D. Fults, K. Ward, E. Friedman, W. Samowitz, and M. Robertson. 1992. "Somatic Mutations in the Neurofibromatosis 1 Gene in Human Tumors." *Cell* 69 (2): 275–81.
- Lim, Ji-Hong, Eun-Seo Lee, Ho-Jin You, Jung Weon Lee, Jong-Wan Park, and Yang-Sook Chun. 2004. "Ras-Dependent Induction of HIF-1 $\alpha$ 785 via the Raf/MEK/ERK Pathway: A Novel Mechanism of Ras-Mediated Tumor Promotion." *Oncogene* 23 (58): 9427–31. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208003>.
- Lito, Piro, Martha Solomon, Lian-Sheng Li, Rasmus Hansen, and Neal Rosen. 2016. "Allele-Specific Inhibitors Inactivate Mutant KRAS G12C by a Trapping Mechanism." *Science (New York, N.Y.)* 351 (6273): 604–8. <https://doi.org/10.1126/science.aad6204>.
- Little, Annette S., Kathryn Balmanno, Matthew J. Sale, Scott Newman, Jonathan R. Dry, Mark Hampson, Paul A. W. Edwards, Paul D. Smith, and Simon J. Cook. 2011. "Amplification of the Driving Oncogene, KRAS or BRAF, Underpins Acquired Resistance to MEK1/2 Inhibitors in Colorectal Cancer Cells." *Science Signaling* 4 (166): ra17. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2001752>.
- Liu, Meng, Anna-Karin M. Sjogren, Christin Karlsson, Mohamed X. Ibrahim, Karin M. E. Andersson, Frida J. Olofsson, Annika M. Wahlstrom, et al. 2010. "Targeting the Protein Prenyltransferases Efficiently Reduces Tumor Development in Mice with K-RAS-Induced Lung Cancer." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (14): 6471–76. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908396107>.
- Liu, Qing, Simon A. Walker, Dingcheng Gao, James A. Taylor, Yan-Feng Dai, Rebecca S. Arkell, Martin D. Bootman, H. Llewelyn Roderick, Peter J. Cullen, and Peter J. Lockyer. 2005. "CAPRI and RASAL Impose Different Modes of Information Processing on Ras Due to Contrasting Temporal Filtering of Ca<sup>2+</sup>." *The Journal of Cell Biology* 170 (2): 183–90. <https://doi.org/10.1083/jcb.200504167>.
- Liu, Xin, Qing Ye, Xi-Pin Zhao, Peng-Bo Zhang, Si Li, Rong-Qing Li, and Xi-Long Zhao. 2019. "RAS Mutations in Acute Myeloid Leukaemia Patients: A Review and Meta-Analysis." *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 489 (February): 254–60. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.08.040>.
- Loh, Mignon L., Shashaank Vattikuti, Suzanne Schubert, Melissa G. Reynolds, Elaine Carlson, Kenneth H. Lieu, Jennifer W. Cheng, et al. 2004. "Mutations in PTPN11 Implicate the SHP-2 Phosphatase in Leukemogenesis." *Blood* 103 (6): 2325–31. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-09-3287>.
- Loh, Po-Ru, Giulio Genovese, Robert E. Handsaker, Hilary K. Finucane, Yakir A. Reshef, Pier Francesco Palamara, Brenda M. Birmann, et al. 2018. "Insights into Clonal Haematopoiesis from 8,342 Mosaic Chromosomal Alterations." *Nature* 559 (7714): 350–55. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0321-x>.
- Löhr, Matthias, Günter Klöppel, Patrick Maisonneuve, Albert B. Lowenfels, and Jutta Lüttges. 2005. "Frequency of K-Ras Mutations in Pancreatic Intraductal Neoplasias Associated with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Chronic Pancreatitis: A Meta-Analysis." *Neoplasia (New York, N.Y.)* 7 (1): 17–23. <https://doi.org/10.1593/neo.04445>.
- Loi, Sherene, Sathana Dushyanthen, Paul A. Beavis, Roberto Salgado, Carsten Denkert, Peter Savas, Susan Combs, et al. 2016. "RAS/MAPK Activation Is Associated with Reduced Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple-Negative Breast Cancer: Therapeutic Cooperation Between MEK and PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint Inhibitors." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 22 (6): 1499–1509. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1125>.
- Long, Georgina V., Daniil Stroyakovskiy, Helen Gogas, Evgeny Levchenko, Filippo de Braud, James Larkin, Claus Garbe, et al. 2014. "Combined BRAF and MEK Inhibition versus BRAF Inhibition Alone in Melanoma." *The New England Journal of Medicine* 371 (20): 1877–88. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1406037>.

- Löwenberg, Bob, Gert J. Ossenkoppele, Wim van Putten, Harry C. Schouten, Carlos Graux, Augustin Ferrant, Pieter Sonneveld, et al. 2009. "High-Dose Daunorubicin in Older Patients with Acute Myeloid Leukemia." *The New England Journal of Medicine* 361 (13): 1235–48. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0901409>.
- Löwenberg, Bob, Thomas Pabst, Johan Maertens, Yvette van Norden, Bart J. Biemond, Harry C. Schouten, Olivier Spertini, et al. 2017. "Therapeutic Value of Clofarabine in Younger and Middle-Aged (18-65 Years) Adults with Newly Diagnosed AML." *Blood* 129 (12): 1636–45. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-10-740613>.
- Lu, Albert, Francesc Tebar, Blanca Alvarez-Moya, Cristina López-Alcalá, Maria Calvo, Carlos Enrich, Neus Agell, Takeshi Nakamura, Michiyuki Matsuda, and Oriol Bachs. 2009. "A Clathrin-Dependent Pathway Leads to KRas Signaling on Late Endosomes En Route to Lysosomes." *The Journal of Cell Biology* 184 (6): 863–79. <https://doi.org/10.1083/jcb.200807186>.
- Luo, Ji, Brendan D. Manning, and Lewis C. Cantley. 2003. "Targeting the PI3K-Akt Pathway in Human Cancer: Rationale and Promise." *Cancer Cell* 4 (4): 257–62.
- Lusk, Jay B., Vanessa Y. M. Lam, and Nicholas S. Tolwinski. 2017. "Epidermal Growth Factor Pathway Signaling in Drosophila Embryogenesis: Tools for Understanding Cancer." *Cancers* 9 (2). <https://doi.org/10.3390/cancers9020016>.
- MacKenzie, K. L., A. Dolnikov, M. Millington, Y. Shounan, and G. Symonds. 1999. "Mutant N-Ras Induces Myeloproliferative Disorders and Apoptosis in Bone Marrow Repopulated Mice." *Blood* 93 (6): 2043–56.
- Maes, Tamara, Cristina Mascaró, Iñigo Tirapu, Angels Estiarte, Filippo Ciceri, Serena Lunardi, Nathalie Guibourt, et al. 2018. "ORY-1001, a Potent and Selective Covalent KDM1A Inhibitor, for the Treatment of Acute Leukemia." *Cancer Cell* 33 (3): 495–511.e12. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.02.002>.
- Mainardi, Sara, Antonio Mulero-Sánchez, Anirudh Prahallad, Giovanni Germano, Astrid Bosma, Paul Krimpenfort, Cor Lieftink, et al. 2018. "SHP2 Is Required for Growth of KRAS-Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer in Vivo." *Nature Medicine* 24 (7): 961–67. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0023-9>.
- Maiti, Abhishek, Kiran Naqvi, Tapan M. Kadia, Gautam Borthakur, Koichi Takahashi, Prithviraj Bose, Naval G. Daver, et al. 2019. "Phase II Trial of MEK Inhibitor Binimetinib (MEK162) in RAS-Mutant Acute Myeloid Leukemia." *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia* 19 (3): 142–148.e1. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2018.12.009>.
- Mali, Raghuveer Singh, Peilin Ma, Li-Fan Zeng, Holly Martin, Baskar Ramdas, Yantao He, Emily Sims, et al. 2012. "Role of SHP2 Phosphatase in KIT-Induced Transformation: Identification of SHP2 as a Druggable Target in Diseases Involving Oncogenic KIT." *Blood* 120 (13): 2669–78. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-375873>.
- Malliri, Angeliki, Rob A. van der Kammen, Kristopher Clark, Maarten van der Valk, Frits Michiels, and John G. Collard. 2002. "Mice Deficient in the Rac Activator Tiam1 Are Resistant to Ras-Induced Skin Tumours." *Nature* 417 (6891): 867–71. <https://doi.org/10.1038/nature00848>.
- Margarit, S. Mariana, Holger Sondermann, Brian E. Hall, Bhushan Nagar, Andre Hoelz, Michelle Pirruccello, Dafna Bar-Sagi, and John Kuriyan. 2003. "Structural Evidence for Feedback Activation by Ras.GTP of the Ras-Specific Nucleotide Exchange Factor SOS." *Cell* 112 (5): 685–95.
- Margueron, Raphaël, and Danny Reinberg. 2011. "The Polycomb Complex PRC2 and Its Mark in Life." *Nature* 469 (7330): 343–49. <https://doi.org/10.1038/nature09784>.
- Marusiak, Anna A., Zoe C. Edwards, Willy Hugo, Eleanor W. Trotter, Maria R. Girotti, Natalie L. Stephenson, Xiangju Kong, et al. 2014. "Mixed Lineage Kinases Activate MEK Independently of RAF to Mediate Resistance to RAF Inhibitors." *Nature Communications* 5 (May): 3901. <https://doi.org/10.1038/ncomms4901>.
- Massagué, J. 2000. "How Cells Read TGF-Beta Signals." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 1 (3): 169–78. <https://doi.org/10.1038/35043051>.
- McCarthy, S. A., M. L. Samuels, C. A. Pritchard, J. A. Abraham, and M. McMahon. 1995. "Rapid Induction of Heparin-Binding Epidermal Growth Factor/Diphtheria Toxin Receptor Expression by Raf and Ras Oncogenes." *Genes & Development* 9 (16): 1953–64.
- McCormick, F., H. Adari, M. Trahey, R. Halenbeck, K. Koths, G. A. Martin, W. J. Crosier, K. Watt, B. Rubinfeld, and G. Wong. 1988. "Interaction of Ras P21 Proteins with GTPase Activating Protein." *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 53 Pt 2: 849–54.

- McCormick, F., B. F. Clark, T. F. la Cour, M. Kjeldgaard, L. Norskov-Lauritsen, and J. Nyborg. 1985. "A Model for the Tertiary Structure of P21, the Product of the Ras Oncogene." *Science (New York, N.Y.)* 230 (4721): 78–82.
- McGillcuddy, Lauren T., Jody A. Fromm, Pablo E. Hollstein, Sara Kubek, Rameen Beroukhim, Thomas De Raedt, Bryan W. Johnson, et al. 2009. "Proteasomal and Genetic Inactivation of the NF1 Tumor Suppressor in Gliomagenesis." *Cancer Cell* 16 (1): 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.05.009>.
- McKay, M. M., and D. K. Morrison. 2007. "Integrating Signals from RTKs to ERK/MAPK." *Oncogene* 26 (22): 3113–21. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210394>.
- Milella, M., S. M. Kornblau, Z. Estrov, B. Z. Carter, H. Lapillonne, D. Harris, M. Konopleva, S. Zhao, E. Estey, and M. Andreeff. 2001. "Therapeutic Targeting of the MEK/MAPK Signal Transduction Module in Acute Myeloid Leukemia." *The Journal of Clinical Investigation* 108 (6): 851–59. <https://doi.org/10.1172/JCI12807>.
- Milella, M., C. M. Precupanu, C. Gregorj, M. R. Ricciardi, M. T. Petrucci, S. M. Kornblau, A. Tafuri, and M. Andreeff. 2005. "Beyond Single Pathway Inhibition: MEK Inhibitors as a Platform for the Development of Pharmacological Combinations with Synergistic Anti-Leukemic Effects." *Current Pharmaceutical Design* 11 (21): 2779–95.
- Milella, Michele, Zeev Estrov, Steven M. Kornblau, Bing Z. Carter, Marina Konopleva, Ana Tari, Wendy D. Schober, et al. 2002. "Synergistic Induction of Apoptosis by Simultaneous Disruption of the Bcl-2 and MEK/MAPK Pathways in Acute Myelogenous Leukemia." *Blood* 99 (9): 3461–64.
- Miller, Arlo J., and Martin C. Mihm. 2006. "Melanoma." *The New England Journal of Medicine* 355 (1): 51–65. <https://doi.org/10.1056/NEJMra052166>.
- Mizuki, M., R. Fenski, H. Halfter, I. Matsumura, R. Schmidt, C. Müller, W. Grüning, 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 (12): 3907–14.
- Mochizuki, N., S. Yamashita, K. Kurokawa, Y. Ohba, T. Nagai, A. Miyawaki, and M. Matsuda. 2001. "Spatio-Temporal Images of Growth-Factor-Induced Activation of Ras and Rap1." *Nature* 411 (6841): 1065–68. <https://doi.org/10.1038/35082594>.
- Mohi, M. Golam, Ifor R. Williams, Charles R. Dearolf, Gordon Chan, Jeffery L. Kutok, Sarah Cohen, Kelly Morgan, et al. 2005. "Prognostic, Therapeutic, and Mechanistic Implications of a Mouse Model of Leukemia Evoked by Shp2 (PTPN11) Mutations." *Cancer Cell* 7 (2): 179–91. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.01.010>.
- Mohty, Mohamad, Florent Malard, Didier Blaise, Noel Milpied, Gerard Socie, Anne Huynh, Oumedaly Reman, et al. 2016. "Sequential Regimen of Clofarabine, Cytosine Arabinoside and Reduced Intensity Transplantation for Primary Refractory Acute Myeloid Leukemia." *Haematologica*, August. <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.150326>.
- Moison, Céline, Vincent-Philippe Lavallée, Clarisse Thiollier, Bernhard Lehnertz, Isabel Boivin, Nadine Mayotte, Yves Gareau, et al. 2019. "Complex Karyotype AML Displays G2/M Signature and Hypersensitivity to PLK1 Inhibition." *Blood Advances* 3 (4): 552–63. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018028480>.
- Molina, Jennifer R., Yuting Sun, Marina Protopopova, Sonal Gera, Madhavi Bandi, Christopher Bristow, Timothy McAfoos, et al. 2018. "An Inhibitor of Oxidative Phosphorylation Exploits Cancer Vulnerability." *Nature Medicine* 24 (7): 1036–46. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0052-4>.
- Momtazi-Borojeni, Amir A., Elham Abdollahi, Faezeh Ghasemi, Michele Caraglia, and Amirhossein Sahebkar. 2018. "The Novel Role of Pyrvinium in Cancer Therapy." *Journal of Cellular Physiology* 233 (4): 2871–81. <https://doi.org/10.1002/jcp.26006>.
- Morgan, Michael A., Oliver Dolp, and Christoph W. M. Reuter. 2001. "Cell-Cycle-Dependent Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase (MEK-1/2) in Myeloid Leukemia Cell Lines and Induction of Growth Inhibition and Apoptosis by Inhibitors of RAS Signaling." *Blood* 97 (6): 1823–34. <https://doi.org/10.1182/blood.V97.6.1823>.
- Moriya, Kunihiko, Makiko Suzuki, Yohei Watanabe, Takeshi Takahashi, Yoko Aoki, Toru Uchiyama, Satoru Kumaki, et al. 2012. "Development of a Multi-Step Leukemogenesis Model of MLL-Rearranged Leukemia Using Humanized Mice." *PLoS One* 7 (6): e37892. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037892>.
- Morris, Erick J., Sharda Jha, Clifford R. Restaino, Priya Dayananth, Hugh Zhu, Alan Cooper, Donna Carr, et al. 2013. "Discovery of a Novel ERK Inhibitor with Activity in Models of Acquired Resistance to BRAF and MEK Inhibitors." *Cancer Discovery* 3 (7): 742–50. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0070>.



- Morrison, D. K., G. Heidecker, U. R. Rapp, and T. D. Copeland. 1993. "Identification of the Major Phosphorylation Sites of the Raf-1 Kinase." *The Journal of Biological Chemistry* 268 (23): 17309–16.
- Mott, Helen R., and Darerca Owen. 2015. "Structures of Ras Superfamily Effector Complexes: What Have We Learnt in Two Decades?" *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 50 (2): 85–133. <https://doi.org/10.3109/10409238.2014.999191>.
- Müller, J., S. Ory, T. Copeland, H. Piwnica-Worms, and D. K. Morrison. 2001. "C-TAK1 Regulates Ras Signaling by Phosphorylating the MAPK Scaffold, KSR1." *Molecular Cell* 8 (5): 983–93.
- Murakami, Norihiro, Yusuke Okuno, Kenichi Yoshida, Yuichi Shiraishi, Genta Nagae, Kyogo Suzuki, Atsushi Narita, et al. 2018. "Integrated Molecular Profiling of Juvenile Myelomonocytic Leukemia." *Blood* 131 (14): 1576–86. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-07-798157>.
- Nabinger, S. C., X. J. Li, B. Ramdas, Y. He, X. Zhang, L. Zeng, B. Richine, et al. 2013. "The Protein Tyrosine Phosphatase, Shp2, Positively Contributes to FLT3-ITD-Induced Hematopoietic Progenitor Hyperproliferation and Malignant Disease in Vivo." *Leukemia* 27 (2): 398–408. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.308>.
- Nagel, Gabriele, D. Weber, E. Fromm, S. Erhardt, M. Lübbert, W. Fiedler, T. Kindler, et al. 2017. "Epidemiological, Genetic, and Clinical Characterization by Age of Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia Based on an Academic Population-Based Registry Study (AML5G BiO)." *Annals of Hematology* 96 (12): 1993–2003. <https://doi.org/10.1007/s00277-017-3150-3>.
- Nassar, N., G. Horn, C. Herrmann, A. Scherer, F. McCormick, and A. Wittinghofer. 1995. "The 2.2 Å Crystal Structure of the Ras-Binding Domain of the Serine/Threonine Kinase c-Raf1 in Complex with Rap1A and a GTP Analogue." *Nature* 375 (6532): 554–60. <https://doi.org/10.1038/375554a0>.
- Neel, Benjamin G., Haihua Gu, and Lily Pao. 2003. "The 'Shp'ing News: SH2 Domain-Containing Tyrosine Phosphatases in Cell Signaling." *Trends in Biochemical Sciences* 28 (6): 284–93. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(03\)00091-4](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(03)00091-4).
- Nichols, Robert J., Franziska Haderk, Carlos Stahlhut, Christopher J. Schulze, Golzar Hemmati, David Wildes, Christos Tzitzilionis, et al. 2018. "RAS Nucleotide Cycling Underlies the SHP2 Phosphatase Dependence of Mutant BRAF-, NF1- and RAS-Driven Cancers." *Nature Cell Biology* 20 (9): 1064–73. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0169-1>.
- Niemeyer, Charlotte M., Michelle W. Kang, Danielle H. Shin, Ingrid Furlan, Miriam Erlacher, Nancy J. Bunin, Severa Bunda, et al. 2010. "Germline CBL Mutations Cause Developmental Abnormalities and Predispose to Juvenile Myelomonocytic Leukemia." *Nature Genetics* 42 (9): 794–800. <https://doi.org/10.1038/ng.641>.
- Noble, Catherine, Kathryn Mercer, Jahan Hussain, Linda Carragher, Susan Giblett, Robert Hayward, Cam Patterson, Richard Marais, and Catrin A. Pritchard. 2008. "CRAF Autophosphorylation of Serine 621 Is Required to Prevent Its Proteasome-Mediated Degradation." *Molecular Cell* 31 (6): 862–72. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.08.026>.
- Noël, Laura A., Florence A. Arts, Carmen P. Montano-Almendras, Luk Cox, Olga Gielen, Federica Toffalini, Catherine Y. Marbehant, Jan Cools, and Jean-Baptiste Demoulin. 2014. "The Tyrosine Phosphatase SHP2 Is Required for Cell Transformation by the Receptor Tyrosine Kinase Mutants FIP1L1-PDGFR $\alpha$  and PDGFR $\alpha$  D842V." *Molecular Oncology* 8 (3): 728–40. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2014.02.003>.
- Nonami, Atsushi, Martin Sattler, Ellen Weisberg, Qingsong Liu, Jianming Zhang, Matthew P. Patricelli, Amanda L. Christie, et al. 2015. "Identification of Novel Therapeutic Targets in Acute Leukemias with NRAS Mutations Using a Pharmacologic Approach." *Blood* 125 (20): 3133–43. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-615906>.
- Nussinov, Ruth, Chung-Jung Tsai, and Hyunbum Jang. 2018. "Oncogenic Ras Isoforms Signaling Specificity at the Membrane." *Cancer Research* 78 (3): 593–602. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-2727>.
- Okumura, Shunsuke, and Pasi A. Jänne. 2014. "Molecular Pathways: The Basis for Rational Combination Using MEK Inhibitors in KRAS-Mutant Cancers." *Clinical Cancer Research* 20 (16): 4193–99. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2365>.
- Omerovic, J., D. E. Hammond, M. J. Clague, and I. A. Prior. 2008. "Ras Isoform Abundance and Signalling in Human Cancer Cell Lines." *Oncogene* 27 (19): 2754–62. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210925>.
- Omidvar, Nader, Scott Kogan, Stephanie Beurlet, Carole le Pogam, Anne Janin, Robert West, Maria-Elena Noguera, et al. 2007. "BCL-2 and Mutant NRAS Interact Physically and Functionally in a Mouse Model of Progressive Myelodysplasia." *Cancer Research* 67 (24): 11657–67. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0196>.

- Onken, Brian, Heidi Wiener, Mark R. Philips, and Eric C. Chang. 2006. "Compartmentalized Signaling of Ras in Fission Yeast." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (24): 9045–50. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603318103>.
- Østgård, L. S. G., J. M. Nørgaard, H. Sengeløv, M. Severinsen, L. S. Friis, C. W. Marcher, I. H. Dufva, and M. Nørgaard. 2015. "Comorbidity and Performance Status in Acute Myeloid Leukemia Patients: A Nation-Wide Population-Based Cohort Study." *Leukemia* 29 (3): 548–55. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.234>.
- Ostrem, Jonathan M., Ulf Peters, Martin L. Sos, James A. Wells, and Kevan M. Shokat. 2013. "K-Ras(G12C) Inhibitors Allosterically Control GTP Affinity and Effector Interactions." *Nature* 503 (7477): 548–51. <https://doi.org/10.1038/nature12796>.
- Othus, Megan, Frederick R. Appelbaum, Stephen H. Petersdorf, Kenneth J. Kopecky, Marilyn Slovak, Thomas Nevill, Joseph Brandwein, et al. 2015. "Fate of Patients with Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia Who Fail Primary Induction Therapy." *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 21 (3): 559–64. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2014.10.025>.
- Palmer, Daniel H., Svein Dueland, Juan W. Valle, and Anne-Kirsti Aksnes. 2017. "A Phase I/II Trial of TG01/GM-CSF and Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Treating Patients with Resected RAS-Mutant Adenocarcinoma of the Pancreas." *Journal of Clinical Oncology* 35 (15\_suppl): 4119–4119. [https://doi.org/10.1200/JCO.2017.35.15\\_suppl.4119](https://doi.org/10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.4119).
- Pandey, Ruchi, Mallika Saxena, and Reuben Kapur. 2017. "Role of SHP2 in Hematopoiesis and Leukemogenesis." *Current Opinion in Hematology* 24 (4): 307–13. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000345>.
- Papaemmanuil, Elli, Moritz Gerstung, Lars Bullinger, Verena I. Gaidzik, Peter Paschka, Nicola D. Roberts, Nicola E. Potter, et al. 2016. "Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia." *The New England Journal of Medicine* 374 (23): 2209–21. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1516192>.
- Papandreou, Ioanna, Rob A. Cairns, Lucrezia Fontana, Ai Lin Lim, and Nicholas C. Denko. 2006. "HIF-1 Mediates Adaptation to Hypoxia by Actively Downregulating Mitochondrial Oxygen Consumption." *Cell Metabolism* 3 (3): 187–97. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.01.012>.
- Parikh, Chaitali, Ramesh Subrahmanyam, and Ruibao Ren. 2006. "Oncogenic NRAS Rapidly and Efficiently Induces CMML- and AML-like Diseases in Mice." *Blood* 108 (7): 2349–57. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-08-009498>.
- . 2007. "Oncogenic NRAS, KRAS, and HRAS Exhibit Different Leukemogenic Potentials in Mice." *Cancer Research* 67 (15): 7139–46. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0778>.
- Park, B. K., X. Zeng, and R. I. Glazer. 2001. "Akt1 Induces Extracellular Matrix Invasion and Matrix Metalloproteinase-2 Activity in Mouse Mammary Epithelial Cells." *Cancer Research* 61 (20): 7647–53.
- Parkin, Brian, Peter Ouilllette, Yin Wang, Yan Liu, Whitney Wright, Diane Roulston, Anjali Purkayastha, et al. 2010. "NF1 Inactivation in Adult Acute Myelogenous Leukemia." *Clinical Cancer Research* 16 (16): 4135–47. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-2639>.
- Paschou, Maria, and Epaminondas Doxakis. 2012. "Neurofibromin 1 Is a MiRNA Target in Neurons." *PLoS One* 7 (10): e46773. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046773>.
- Patel, Jay P, Mithat Gönen, Maria E Figueroa, Hugo Fernandez, Zhuoxin Sun, Janis Racevskis, Pieter Van Vlierberghe, et al. 2012. "Prognostic Relevance of Integrated Genetic Profiling in Acute Myeloid Leukemia." *The New England Journal of Medicine* 366 (12): 1079–89. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1112304>.
- Patricelli, Matthew P., Matthew R. Janes, Lian-Sheng Li, Rasmus Hansen, Ulf Peters, Linda V. Kessler, Yuching Chen, et al. 2016. "Selective Inhibition of Oncogenic KRAS Output with Small Molecules Targeting the Inactive State." *Cancer Discovery* 6 (3): 316–29. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-1105>.
- Pedersen-Bjergaard, J., M. K. Andersen, M. T. Andersen, and D. H. Christiansen. 2008. "Genetics of Therapy-Related Myelodysplasia and Acute Myeloid." *Leukemia* 22 (2): 240–48. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2405078>.
- Pemovska, Tea, Mika Kontro, Bhagwan Yadav, Henrik Edgren, Samuli Eldfors, Agnieszka Sz wajda, Henrikki Almusa, et al. 2013. "Individualized Systems Medicine Strategy to Tailor Treatments for Patients with Chemorefractory Acute Myeloid Leukemia." *Cancer Discovery* 3 (12): 1416–29. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0350>.

- Pérez, B., F. Mechinaud, C. Galambrun, N. Ben Romdhane, B. Isidor, N. Philip, J. Derain-Court, et al. 2010. "Germline Mutations of the CBL Gene Define a New Genetic Syndrome with Predisposition to Juvenile Myelomonocytic Leukaemia." *Journal of Medical Genetics* 47 (10): 686–91. <https://doi.org/10.1136/jmg.2010.076836>.
- Perl, Alexander E., Jessica K. Altman, Jorge Cortes, Catherine Smith, Mark Litzow, Maria R. Baer, David Claxton, et al. 2017. "Selective Inhibition of FLT3 by Gilteritinib in Relapsed or Refractory Acute Myeloid Leukaemia: A Multicentre, First-in-Human, Open-Label, Phase 1-2 Study." *The Lancet. Oncology* 18 (8): 1061–75. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30416-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30416-3).
- Pfeiffer, Tim, Michael Schleuning, Jiri Mayer, Karl-Heinz Haude, Johanna Tischer, Stefanie Buchholz, Donald Bunjes, et al. 2013. "Influence of Molecular Subgroups on Outcome of Acute Myeloid Leukemia with Normal Karyotype in 141 Patients Undergoing Salvage Allogeneic Stem Cell Transplantation in Primary Induction Failure or beyond First Relapse." *Haematologica* 98 (4): 518–25. <https://doi.org/10.3324/haematol.2012.070235>.
- Piloto, Abdulio, Melissa Wright, Patrick Brown, Kyu-Tae Kim, Mark Levis, and Donald Small. 2007. "Prolonged Exposure to FLT3 Inhibitors Leads to Resistance via Activation of Parallel Signaling Pathways." *Blood* 109 (4): 1643–52. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-023804>.
- Pollyea, Daniel A., and Craig T. Jordan. 2017. "Therapeutic Targeting of Acute Myeloid Leukemia Stem Cells." *Blood* 129 (12): 1627–35. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-10-696039>.
- Pollyea, Daniel A., Brett M. Stevens, Courtney L. Jones, Amanda Winters, Shanshan Pei, Mohammad Minhajuddin, Angelo D'Alessandro, et al. 2018. "Venetoclax with Azacitidine Disrupts Energy Metabolism and Targets Leukemia Stem Cells in Patients with Acute Myeloid Leukemia." *Nature Medicine* 24 (12): 1859–66. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0233-1>.
- Pollyea, Daniel A., Martin S. Tallman, Stéphane de Botton, Hagop M. Kantarjian, Robert Collins, Anthony S. Stein, Mark G. Frattini, et al. 2019. "Enasidenib, an Inhibitor of Mutant IDH2 Proteins, Induces Durable Remissions in Older Patients with Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia." *Leukemia*, April. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0472-2>.
- Posch, Christian, Homayoun Moslehi, Luzviminda Feeney, Gary A. Green, Anoosheh Ebaee, Valentin Feichtenschlager, Kim Chong, et al. 2013. "Combined Targeting of MEK and PI3K/MTOR Effector Pathways Is Necessary to Effectively Inhibit NRAS Mutant Melanoma in Vitro and in Vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (10): 4015–20. <https://doi.org/10.1073/pnas.1216013110>.
- Poulikakos, Poulikos I., Chao Zhang, Gideon Bollag, Kevan M. Shokat, and Neal Rosen. 2010. "RAF Inhibitors Transactivate RAF Dimers and ERK Signalling in Cells with Wild-Type BRAF." *Nature* 464 (7287): 427–30. <https://doi.org/10.1038/nature08902>.
- Powers, S. 1992. "Genetic Analysis of Ras Homologs in Yeasts." *Seminars in Cancer Biology* 3 (4): 209–18.
- Pritchard, C. A., M. L. Samuels, E. Bosch, and M. McMahon. 1995. "Conditionally Oncogenic Forms of the A-Raf and B-Raf Protein Kinases Display Different Biological and Biochemical Properties in NIH 3T3 Cells." *Molecular and Cellular Biology* 15 (11): 6430–42.
- Purvis, Jeremy E., Kyle W. Karhohs, Caroline Mock, Eric Batchelor, Alexander Loewer, and Galit Lahav. 2012. "P53 Dynamics Control Cell Fate." *Science (New York, N.Y.)* 336 (6087): 1440–44. <https://doi.org/10.1126/science.1218351>.
- Pylayeva-Gupta, Yuliya, Elda Grabocka, and Dafna Bar-Sagi. 2011. "RAS Oncogenes: Weaving a Tumorigenic Web." *Nature Reviews. Cancer* 11 (11): 761–74. <https://doi.org/10.1038/nrc3106>.
- Rajakulendran, Thanashan, Malha Sahmi, Martin Lefrançois, Frank Sicheri, and Marc Therrien. 2009. "A Dimerization-Dependent Mechanism Drives RAF Catalytic Activation." *Nature* 461 (7263): 542–45. <https://doi.org/10.1038/nature08314>.
- Ran, Hao, Ryouhei Tsutsumi, Toshiyuki Araki, and Benjamin G. Neel. 2016. "Sticking It to Cancer with Molecular Glue for SHP2." *Cancer Cell* 30 (2): 194–96. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.07.010>.
- Ratner, Nancy, and Shyra J. Miller. 2015. "A RASopathy Gene Commonly Mutated in Cancer: The Neurofibromatosis Type 1 Tumour Suppressor." *Nature Reviews. Cancer* 15 (5): 290–301. <https://doi.org/10.1038/nrc3911>.
- Rauen, K. A. 2007. "HRAS and the Costello Syndrome." *Clinical Genetics* 71 (2): 101–8. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2007.00743.x>.
- Ravandi, F., A. Pigneux, D. J. DeAngelo, E. Raffoux, J. Delaunay, X. Thomas, T. Kadia, et al. 2015. "Clinical, Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Data for the MEK1/2 Inhibitor Pimasertib in Patients with Advanced Hematologic Malignancies." *Blood Cancer Journal* 5 (December): e375. <https://doi.org/10.1038/bcj.2015.103>.

- Rebecca, Vito W., Gretchen M. Alicea, Kim H. T. Paraiso, Harshani Lawrence, Geoffrey T. Gibney, and Keiran S. M. Smalley. 2014. "Vertical Inhibition of the MAPK Pathway Enhances Therapeutic Responses in NRAS-Mutant Melanoma." *Pigment Cell & Melanoma Research* 27 (6): 1154–58. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12303>.
- Reikvam, Håkon, Annette K. Brenner, Karen Marie Hagen, Knut Liseth, Silje Skrede, Kimberley Joanne Hatfield, and Øystein Bruserud. 2015. "The Cytokine-Mediated Crosstalk between Primary Human Acute Myeloid Cells and Mesenchymal Stem Cells Alters the Local Cytokine Network and the Global Gene Expression Profile of the Mesenchymal Cells." *Stem Cell Research* 15 (3): 530–41. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2015.09.008>.
- Ren, Jian-Guo, Zhigang Li, and David B. Sacks. 2007. "IQGAP1 Modulates Activation of B-Raf." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (25): 10465–69. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611308104>.
- Ren, Yuan, Zhengming Chen, Liwei Chen, Nicholas T. Woods, Gary W. Reuther, Jin Q. Cheng, Hong-gang Wang, and Jie Wu. 2007. "Shp2E76K Mutant Confers Cytokine-Independent Survival of TF-1 Myeloid Cells by Up-Regulating Bcl-XL." *Journal of Biological Chemistry* 282 (50): 36463–73. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705789200>.
- Repasky, Gretchen A., Emily J. Chenette, and Channing J. Der. 2004. "Renewing the Conspiracy Theory Debate: Does Raf Function Alone to Mediate Ras Oncogenesis?" *Trends in Cell Biology* 14 (11): 639–47. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.09.014>.
- Ricciardi, M. R., T. McQueen, D. Chism, M. Milella, E. Estey, E. Kaldjian, J. Sebolt-Leopold, M. Konopleva, and M. Andreeff. 2005. "Quantitative Single Cell Determination of ERK Phosphorylation and Regulation in Relapsed and Refractory Primary Acute Myeloid Leukemia." *Leukemia* 19 (9): 1543–49. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403859>.
- Ricciardi, Maria Rosaria, Maria Cristina Scerpa, Paola Bergamo, Ludovica Ciuffreda, Maria Teresa Petrucci, Sabina Chiaretti, Simona Tavolaro, et al. 2012. "Therapeutic Potential of MEK Inhibition in Acute Myelogenous Leukemia: Rationale for 'Vertical' and 'Lateral' Combination Strategies." *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 90 (10): 1133–44. <https://doi.org/10.1007/s00109-012-0886-z>.
- Ritt, Daniel A., Daniel M. Monson, Suzanne I. Specht, and Deborah K. Morrison. 2010. "Impact of Feedback Phosphorylation and Raf Heterodimerization on Normal and Mutant B-Raf Signaling." *Molecular and Cellular Biology* 30 (3): 806–19. <https://doi.org/10.1128/MCB.00569-09>.
- Ritt, Daniel A., Ming Zhou, Thomas P. Conrads, Timothy D. Veenstra, Terry D. Copeland, and Deborah K. Morrison. 2007. "CK2 Is a Component of the KSR1 Scaffold Complex That Contributes to Raf Kinase Activation." *Current Biology: CB* 17 (2): 179–84. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.11.061>.
- Ritter, Markus, Theo Daniel Kim, Petra Lisske, Christian Thiede, Markus Schaich, and Andreas Neubauer. 2004. "Prognostic Significance of N-RAS and K-RAS Mutations in 232 Patients with Acute Myeloid Leukemia." *Haematologica* 89 (11): 1397–99.
- Rodenhiser, D. I., J. D. Andrews, D. N. Mancini, J. H. Jung, and S. M. Singh. 1997. "Homonucleotide Tracts, Short Repeats and CpG/CpNpG Motifs Are Frequent Sites for Heterogeneous Mutations in the Neurofibromatosis Type 1 (NF1) Tumour-Suppressor Gene." *Mutation Research* 373 (2): 185–95.
- Rodriguez-Viciano, P., P. H. Warne, R. Dhand, B. Vanhaesebroeck, I. Gout, M. J. Fry, M. D. Waterfield, and J. Downward. 1994. "Phosphatidylinositol-3-OH Kinase as a Direct Target of Ras." *Nature* 370 (6490): 527–32. <https://doi.org/10.1038/370527a0>.
- Rodriguez-Viciano, Pablo, Juan Osés-Prieto, Alma Burlingame, Mike Fried, and Frank McCormick. 2006. "A Phosphatase Holoenzyme Comprised of Shoc2/Sur8 and the Catalytic Subunit of PP1 Functions as an M-Ras Effector to Modulate Raf Activity." *Molecular Cell* 22 (2): 217–30. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.03.027>.
- Rodriguez-Viciano, Pablo, Celine Sabatier, and Frank McCormick. 2004. "Signaling Specificity by Ras Family GTPases Is Determined by the Full Spectrum of Effectors They Regulate." *Molecular and Cellular Biology* 24 (11): 4943–54. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.11.4943-4954.2004>.
- Ross, P. J., M. George, D. Cunningham, F. DiStefano, H. J. Andreyev, P. Workman, and P. A. Clarke. 2001. "Inhibition of Kirsten-Ras Expression in Human Colorectal Cancer Using Rationally Selected Kirsten-Ras Antisense Oligonucleotides." *Molecular Cancer Therapeutics* 1 (1): 29–41.
- Ross, Sarah J., Alexey S. Revenko, Lyndsey L. Hanson, Rebecca Ellston, Anna Staniszevska, Nicky Whalley, Sanjay K. Pandey, et al. 2017. "Targeting KRAS-Dependent Tumors with AZD4785, a High-Affinity Therapeutic Antisense Oligonucleotide Inhibitor of KRAS." *Science Translational Medicine* 9 (394). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aal5253>.

- Rowe, Jacob M., Haesook T. Kim, Peter A. Cassileth, Hillard M. Lazarus, Mark R. Litzow, Peter H. Wiernik, and Martin S. Tallman. 2010. "Adult Patients with Acute Myeloid Leukemia Who Achieve Complete Remission after 1 or 2 Cycles of Induction Have a Similar Prognosis: A Report on 1980 Patients Registered to 6 Studies Conducted by the Eastern Cooperative Oncology Group." *Cancer* 116 (21): 5012–21. <https://doi.org/10.1002/cncr.25263>.
- Roy, François, Gino Laberge, Mélanie Douziech, David Ferland-McCollough, and Marc Therrien. 2002. "KSR Is a Scaffold Required for Activation of the ERK/MAPK Module." *Genes & Development* 16 (4): 427–38. <https://doi.org/10.1101/gad.962902>.
- Roy, Sandrine, Bruce Wyse, and John F. Hancock. 2002. "H-Ras Signaling and K-Ras Signaling Are Differentially Dependent on Endocytosis." *Molecular and Cellular Biology* 22 (14): 5128–40.
- Rubinfeld, H., T. Hanoch, and R. Seger. 1999. "Identification of a Cytoplasmic-Retention Sequence in ERK2." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (43): 30349–52.
- Rubio, I., P. Rodriguez-Viciano, J. Downward, and R. Wetzker. 1997. "Interaction of Ras with Phosphoinositide 3-Kinase Gamma." *The Biochemical Journal* 326 ( Pt 3) (September): 891–95.
- Ruiz, Sergio, Eugenio Santos, and Xosé R. Bustelo. 2007. "RasGRF2, a Guanosine Nucleotide Exchange Factor for Ras GTPases, Participates in T-Cell Signaling Responses." *Molecular and Cellular Biology* 27 (23): 8127–42. <https://doi.org/10.1128/MCB.00912-07>.
- Rushworth, Linda K., Alison D. Hindley, Eric O'Neill, and Walter Kolch. 2006. "Regulation and Role of Raf-1/B-Raf Heterodimerization." *Molecular and Cellular Biology* 26 (6): 2262–72. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.6.2262-2272.2006>.
- Ryan, Meagan B., and Ryan B. Corcoran. 2018. "Therapeutic Strategies to Target RAS-Mutant Cancers." *Nature Reviews. Clinical Oncology* 15 (11): 709–20. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0105-0>.
- Sa, Gaurisankar, and Dennis W. Stacey. 2004. "P27 Expression Is Regulated by Separate Signaling Pathways, Downstream of Ras, in Each Cell Cycle Phase." *Experimental Cell Research* 300 (2): 427–39. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.07.032>.
- Sabnis, Amit J., Laurene S. Cheung, Monique Dail, Hio Chung Kang, Marianne Santaguida, Michelle L. Hermiston, Emmanuelle Passegué, Kevin Shannon, and Benjamin S. Braun. 2009. "Oncogenic Kras Initiates Leukemia in Hematopoietic Stem Cells." *PLOS Biology* 7 (3): e1000059. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000059>.
- Sallman, David A., Amy E. DeZern, David P. Steensma, Kendra L. Sweet, Thomas Cluzeau, Mikkael A. Sekeres, Guillermo Garcia-Manero, et al. 2018. "Phase 1b/2 Combination Study of APR-246 and Azacitidine (AZA) in Patients with TP53 Mutant Myelodysplastic Syndromes (MDS) and Acute Myeloid Leukemia (AML)." *Blood* 132 (Suppl 1): 3091–3091. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-119990>.
- Samuels, Yardena, Zhenghe Wang, Alberto Bardelli, Natalie Silliman, Janine Ptak, Steve Szabo, Hai Yan, et al. 2004. "High Frequency of Mutations of the PIK3CA Gene in Human Cancers." *Science (New York, N.Y.)* 304 (5670): 554. <https://doi.org/10.1126/science.1096502>.
- Sansom, Owen J., Valerie Meniel, Julie A. Wilkins, Alicia M. Cole, Karin A. Oien, Victoria Marsh, Thomas J. Jamieson, et al. 2006. "Loss of Apc Allows Phenotypic Manifestation of the Transforming Properties of an Endogenous K-Ras Oncogene in Vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (38): 14122–27. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604130103>.
- Santos, Eugenio. 2014. "Dimerization Opens New Avenues into Ras Signaling Research." *Science Signaling* 7 (324): pe12. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005318>.
- Sarkozy, Clémentine, Claude Gardin, Nathalie Gachard, Fathia Merabet, Pascal Turlure, Jean-Valère Malfuson, Cécile Pautas, et al. 2013. "Outcome of Older Patients with Acute Myeloid Leukemia in First Relapse." *American Journal of Hematology* 88 (9): 758–64. <https://doi.org/10.1002/ajh.23498>.
- Sarry, Jean-Emmanuel, Kathleen Murphy, Robin Perry, Patricia V. Sanchez, Anthony Secreto, Cathy Keefer, Cezary R. Swider, et al. 2011. "Human Acute Myelogenous Leukemia Stem Cells Are Rare and Heterogeneous When Assayed in NOD/SCID/IL2R $\gamma$ -Deficient Mice." *The Journal of Clinical Investigation* 121 (1): 384–95. <https://doi.org/10.1172/JCI41495>.
- Sasaki, Atsuo, Takaharu Taketomi, Reiko Kato, Kazuko Saeki, Atsushi Nonami, Mika Sasaki, Masamitsu Kuriyama, Naoaki Saito, Masabumi Shibuya, and Akihiko Yoshimura. 2003. "Mammalian Sprouty4 Suppresses Ras-Independent ERK Activation by Binding to Raf1." *Nature Cell Biology* 5 (5): 427–32. <https://doi.org/10.1038/ncb978>.

- Scheffzek, K., M. R. Ahmadian, W. Kabsch, L. Wiesmüller, A. Lautwein, F. Schmitz, and A. Wittinghofer. 1997. "The Ras-RasGAP Complex: Structural Basis for GTPase Activation and Its Loss in Oncogenic Ras Mutants." *Science (New York, N.Y.)* 277 (5324): 333–38.
- Schenk, Tino, Weihsu Claire Chen, Stefanie Göllner, Louise Howell, Liqing Jin, Katja Hebestreit, Hans-Ulrich Klein, et al. 2012. "Inhibition of the LSD1 (KDM1A) Demethylase Reactivates the All-Trans-Retinoic Acid Differentiation Pathway in Acute Myeloid Leukemia." *Nature Medicine* 18 (4): 605–11. <https://doi.org/10.1038/nm.2661>.
- Schlenk, Richard F., Konstanze Döhner, Jürgen Krauter, Stefan Fröhling, Andrea Corbacioglu, Lars Bullinger, Marianne Habdank, et al. 2008. "Mutations and Treatment Outcome in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia." *The New England Journal of Medicine* 358 (18): 1909–18. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa074306>.
- Schmick, Malte, Nachiket Vartak, Björn Papke, Marija Kovacevic, Dina C. Truxius, Lisaweta Rossmannek, and Philippe I. H. Bastiaens. 2014. "KRas Localizes to the Plasma Membrane by Spatial Cycles of Solubilization, Trapping and Vesicular Transport." *Cell* 157 (2): 459–71. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.051>.
- Schmid, Christoph, Michael Schleuning, Georg Ledderose, Johanna Tischer, and Hans-Jochem Kolb. 2005. "Sequential Regimen of Chemotherapy, Reduced-Intensity Conditioning for Allogeneic Stem-Cell Transplantation, and Prophylactic Donor Lymphocyte Transfusion in High-Risk Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndrome." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 23 (24): 5675–87. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.07.061>.
- Schmidt, Enrico K., Serge Fichelson, and Stephan M. Feller. 2004. "PI3 Kinase Is Important for Ras, MEK and Erk Activation of Epo-Stimulated Human Erythroid Progenitors." *BMC Biology* 2 (May): 7. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-2-7>.
- Schubbert, Suzanne, Kevin Shannon, and Gideon Bollag. 2007. "Hyperactive Ras in Developmental Disorders and Cancer." *Nature Reviews. Cancer* 7 (4): 295–308. <https://doi.org/10.1038/nrc2109>.
- Schuijter, Marion M., Frauke Bataille, Suzanne Hagan, Walter Kolch, and Anja-Katrin Bosserhoff. 2004. "Reduction in Raf Kinase Inhibitor Protein Expression Is Associated with Increased Ras-Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling in Melanoma Cell Lines." *Cancer Research* 64 (15): 5186–92. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-3861>.
- Selfors, L. M., J. L. Schutzman, C. Z. Borland, and M. J. Stern. 1998. "Soc-2 Encodes a Leucine-Rich Repeat Protein Implicated in Fibroblast Growth Factor Receptor Signaling." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (12): 6903–8.
- Seliger, B., C. Harders, S. Lohmann, F. Momburg, S. Urlinger, R. Tampé, and C. Huber. 1998. "Down-Regulation of the MHC Class I Antigen-Processing Machinery after Oncogenic Transformation of Murine Fibroblasts." *European Journal of Immunology* 28 (1): 122–33. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199801\)28:01<122::AID-IMMU122>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199801)28:01<122::AID-IMMU122>3.0.CO;2-F).
- Serasinghe, Madhavika N., Jesse D. Gelles, Kent Li, Lauren Zhao, Franco Abbate, Marie Syku, Jarvier N. Mohammed, et al. 2018. "Dual Suppression of Inner and Outer Mitochondrial Membrane Functions Augments Apoptotic Responses to Oncogenic MAPK Inhibition." *Cell Death & Disease* 9 (2): 29. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0044-1>.
- Shain, A. Hunter, Maria Garrido, Thomas Botton, Eric Talevich, Iwei Yeh, J. Zachary Sanborn, Jongsuk Chung, et al. 2015. "Exome Sequencing of Desmoplastic Melanoma Identifies Recurrent NFKB1 Promoter Mutations and Diverse Activating Mutations in the MAPK Pathway." *Nature Genetics* 47 (10): 1194–99. <https://doi.org/10.1038/ng.3382>.
- Shannon, K. M., P. O'Connell, G. A. Martin, D. Paderanga, K. Olson, P. Dinndorf, and F. McCormick. 1994. "Loss of the Normal NF1 Allele from the Bone Marrow of Children with Type 1 Neurofibromatosis and Malignant Myeloid Disorders." *The New England Journal of Medicine* 330 (9): 597–601. <https://doi.org/10.1056/NEJM199403033300903>.
- Sheridan, Clare, Gabriela Brumatti, and Seamus J. Martin. 2008. "Oncogenic B-RafV600E Inhibits Apoptosis and Promotes ERK-Dependent Inactivation of Bad and Bim." *The Journal of Biological Chemistry* 283 (32): 22128–35. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800271200>.
- Shlush, Liran I., Sasan Zandi, Amanda Mitchell, Weihsu Claire Chen, Joseph M. Brandwein, Vikas Gupta, James A. Kennedy, et al. 2014. "Identification of Pre-Leukaemic Haematopoietic Stem Cells in Acute Leukaemia." *Nature* 506 (7488): 328–33. <https://doi.org/10.1038/nature13038>.
- Side, L., B. Taylor, M. Cayouette, E. Conner, P. Thompson, M. Luce, and K. Shannon. 1997. "Homozygous Inactivation of the NF1 Gene in Bone Marrow Cells from Children with Neurofibromatosis Type 1 and Malignant Myeloid Disorders." *The New England Journal of Medicine* 336 (24): 1713–20. <https://doi.org/10.1056/NEJM199706123362404>.

- Sieburth, D. S., Q. Sun, and M. Han. 1998. "SUR-8, a Conserved Ras-Binding Protein with Leucine-Rich Repeats, Positively Regulates Ras-Mediated Signaling in *C. Elegans*." *Cell* 94 (1): 119–30.
- Siljamäki, Elina, and Daniel Abankwa. 2016. "SPRED1 Interferes with K-Ras but Not H-Ras Membrane Anchorage and Signaling." *Molecular and Cellular Biology* 36 (20): 2612–25. <https://doi.org/10.1128/MCB.00191-16>.
- Simanshu, Dharendra K., Dwight V. Nissley, and Frank McCormick. 2017. "RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease." *Cell* 170 (1): 17–33. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.009>.
- Singhal, S., R. Powles, P. J. Henslee-Downey, K. Y. Chiang, J. Treleaven, K. Godder, S. Kulkarni, et al. 2002. "Allogeneic Transplantation from HLA-Matched Sibling or Partially HLA-Mismatched Related Donors for Primary Refractory Acute Leukemia." *Bone Marrow Transplantation* 29 (4): 291–95. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1703373>.
- Skrtić, Marko, Shrivani Sriskanthadevan, Bozhena Jhas, Marinella Gebbia, Xiaoming Wang, Zezhou Wang, Rose Hurren, et al. 2011. "Inhibition of Mitochondrial Translation as a Therapeutic Strategy for Human Acute Myeloid Leukemia." *Cancer Cell* 20 (5): 674–88. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.10.015>.
- Smith, Matthew J., Benjamin G. Neel, and Mitsuhiro Ikura. 2013. "NMR-Based Functional Profiling of RASopathies and Oncogenic RAS Mutations." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (12): 4574–79. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218173110>.
- Smith, Matthew L., Robert K. Hills, and David Grimwade. 2011. "Independent Prognostic Variables in Acute Myeloid Leukaemia." *Blood Reviews* 25 (1): 39–51. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2010.10.002>.
- Sodhi, A., S. Montaner, H. Miyazaki, and J. S. Gutkind. 2001. "MAPK and Akt Act Cooperatively but Independently on Hypoxia Inducible Factor-1alpha in RasV12 Upregulation of VEGF." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 287 (1): 292–300. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5532>.
- Son, Jaekyoung, Costas A. Lyssiotis, Haoqiang Ying, Xiaoxu Wang, Sujun Hua, Matteo Ligorio, Rushika M. Perera, et al. 2013. "Glutamine Supports Pancreatic Cancer Growth through a KRAS-Regulated Metabolic Pathway." *Nature* 496 (7443): 101–5. <https://doi.org/10.1038/nature12040>.
- Sondermann, Holger, Stephen M. Soisson, Sean Boykevich, Shao-Song Yang, Dafna Bar-Sagi, and John Kuriyan. 2004. "Structural Analysis of Autoinhibition in the Ras Activator Son of Sevenless." *Cell* 119 (3): 393–405. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.10.005>.
- Sondka, Zbyslaw, Sally Bamford, Charlotte G. Cole, Sari A. Ward, Ian Dunham, and Simon A. Forbes. 2018. "The COSMIC Cancer Gene Census: Describing Genetic Dysfunction across All Human Cancers." *Nature Reviews Cancer* 18 (11): 696. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0060-1>.
- Sorror, Mohamed L., Michael B. Maris, Rainer Storb, Frederic Baron, Brenda M. Sandmaier, David G. Maloney, and Barry Storer. 2005. "Hematopoietic Cell Transplantation (HCT)-Specific Comorbidity Index: A New Tool for Risk Assessment before Allogeneic HCT." *Blood* 106 (8): 2912–19. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-05-2004>.
- Spencer, David H., David A. Russler-Germain, Shamika Ketkar, Nichole M. Helton, Tamara L. Lamprecht, Robert S. Fulton, Catrina C. Fronick, et al. 2017. "CpG Island Hypermethylation Mediated by DNMT3A Is a Consequence of AML Progression." *Cell* 168 (5): 801–816.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.021>.
- Sperlich, Benjamin, Shobhna Kapoor, Herbert Waldmann, Roland Winter, and Katrin Weise. 2016. "Regulation of K-Ras4B Membrane Binding by Calmodulin." *Biophysical Journal* 111 (1): 113–22. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.05.042>.
- Spinner, Michael A., Lauren A. Sanchez, Amy P. Hsu, Pamela A. Shaw, Christa S. Zerbe, Katherine R. Calvo, Diane C. Arthur, et al. 2014. "GATA2 Deficiency: A Protean Disorder of Hematopoiesis, Lymphatics, and Immunity." *Blood* 123 (6): 809–21. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-07-515528>.
- Stacey, D. W., and H. F. Kung. 1984. "Transformation of NIH 3T3 Cells by Microinjection of Ha-Ras P21 Protein." *Nature* 310 (5977): 508–11.
- Steelman, Linda S., Stephen L. Abrams, John G. Shelton, William H. Chappell, Jörg Bäsecke, Franca Stivala, Marco Donia, et al. 2010. "Dominant Roles of the Raf/MEK/ERK Pathway in Cell Cycle Progression, Prevention of Apoptosis and Sensitivity to Chemotherapeutic Drugs." *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 9 (8): 1629–38. <https://doi.org/10.4161/cc.9.8.11487>.

- Steensma, David P., Rafael Bejar, Siddhartha Jaiswal, R. Coleman Lindsley, Mikkael A. Sekeres, Robert P. Hasserjian, and Benjamin L. Ebert. 2015. "Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential and Its Distinction from Myelodysplastic Syndromes." *Blood* 126 (1): 9–16. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-03-631747>.
- Stein, Eytan M., Courtney D. DiNardo, Amir T. Fathi, Daniel A. Pollyea, Richard M. Stone, Jessica K. Altman, Gail J. Roboz, et al. 2019. "Molecular Remission and Response Patterns in Patients with Mutant-IDH2 Acute Myeloid Leukemia Treated with Enasidenib." *Blood* 133 (7): 676–87. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-08-869008>.
- Stein, Eytan M., Guillermo Garcia-Manero, David A. Rizzieri, Raoul Tibes, Jesus G. Berdeja, Michael R. Savona, Mojca Jongen-Lavrenic, et al. 2018. "The DOT1L Inhibitor Pinometostat Reduces H3K79 Methylation and Has Modest Clinical Activity in Adult Acute Leukemia." *Blood* 131 (24): 2661–69. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-12-818948>.
- Stephen, Andrew G., Dominic Esposito, Rachel K. Bagni, and Frank McCormick. 2014. "Dragging Ras Back in the Ring." *Cancer Cell* 25 (3): 272–81. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.02.017>.
- Stieglitz, Elliot, Amaro N. Taylor-Weiner, Tiffany Y. Chang, Laura C. Gelston, Yong-Dong Wang, Tali Mazor, Emilio Esquivel, et al. 2015. "The Genomic Landscape of Juvenile Myelomonocytic Leukemia." *Nature Genetics* 47 (11): 1326–33. <https://doi.org/10.1038/ng.3400>.
- Stone, Richard M., Sumithra J. Mandrekar, Ben L. Sanford, Kristina Laumann, Susan Geyer, Clara D. Bloomfield, Christian Thiede, et al. 2017. "Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation." *The New England Journal of Medicine* 377 (5): 454–64. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1614359>.
- Stowe, Irma B., Ellen L. Mercado, Timothy R. Stowe, Erika L. Bell, Juan A. Oses-Prieto, Hilda Hernández, Alma L. Burlingame, and Frank McCormick. 2012. "A Shared Molecular Mechanism Underlies the Human Rasopathies Legius Syndrome and Neurofibromatosis-1." *Genes & Development* 26 (13): 1421–26. <https://doi.org/10.1101/gad.190876.112>.
- Strullu, M., A. Caye, B. Cassinat, O. Fenneteau, F. Touzot, T. Blauwblomme, R. Rodriguez, et al. 2013. "In Hematopoietic Cells with a Germline Mutation of CBL, Loss of Heterozygosity Is Not a Signature of Juvenile Myelo-Monocytic Leukemia." *Leukemia* 27 (12): 2404–7. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.203>.
- Suela, Javier, Cristina Largo, Bibiana Ferreira, Sara Álvarez, Mercedes Robledo, Anna González-Neira, Maria José Calasanz, and Juan C. Cigudosa. 2007. "Neurofibromatosis 1, and Not TP53, Seems to Be the Main Target of Chromosome 17 Deletions in De Novo Acute Myeloid Leukemia." *Journal of Clinical Oncology* 25 (9): 1151–52. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.09.3013>.
- Sujobert, Pierre, Valerie Bardet, Pascale Cornillet-Lefebvre, Joel S. Hayflick, Nolwen Prie, Frederic Verdier, Bart Vanhaesebroeck, et al. 2005. "Essential Role for the P110delta Isoform in Phosphoinositide 3-Kinase Activation and Cell Proliferation in Acute Myeloid Leukemia." *Blood* 106 (3): 1063–66. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-08-3225>.
- Swarthout, John T., Sandra Lobo, Lynn Farh, Monica R. Croke, Wendy K. Greentree, Robert J. Deschenes, and Maurine E. Linder. 2005. "DHHC9 and GCP16 Constitute a Human Protein Fatty Acyltransferase with Specificity for H- and N-Ras." *The Journal of Biological Chemistry* 280 (35): 31141–48. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504113200>.
- Tajan, Mylène, Romain Paccoud, Sophie Branka, Thomas Edouard, and Armelle Yart. 2018. "The RASopathy Family: Consequences of Germline Activation of the RAS/MAPK Pathway." *Endocrine Reviews* 39 (5): 676–700. <https://doi.org/10.1210/er.2017-00232>.
- Takam Kamga, Paul, Giulio Bassi, Adriana Cassaro, Martina Midolo, Mariano Di Trapani, Alessandro Gatti, Roberta Carusone, et al. 2016. "Notch Signalling Drives Bone Marrow Stromal Cell-Mediated Chemoresistance in Acute Myeloid Leukemia." *Oncotarget* 7 (16): 21713–27. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7964>.
- Tamburini, Jerome, Caroline Elie, Valérie Bardet, Nicolas Chapuis, Sophie Park, Philippe Broët, Pascale Cornillet-Lefebvre, et al. 2007. "Constitutive Phosphoinositide 3-Kinase/Akt Activation Represents a Favorable Prognostic Factor in de Novo Acute Myelogenous Leukemia Patients." *Blood* 110 (3): 1025–28. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-12-061283>.
- Tamburini, Jerome, Alexa S Green, Valerie Bardet, Nicolas Chapuis, Sophie Park, Lise Willems, Madalina Uzunov, et al. 2009. "Protein Synthesis Is Resistant to Rapamycin and Constitutes a Promising Therapeutic Target in Acute Myeloid Leukemia." *Blood* 114 (8): 1618–27. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-10-184515>.
- Tang, Y., Z. Chen, D. Ambrose, J. Liu, J. B. Gibbs, J. Chernoff, and J. Field. 1997. "Kinase-Deficient Pak1 Mutants Inhibit Ras Transformation of Rat-1 Fibroblasts." *Molecular and Cellular Biology* 17 (8): 4454–64.



- Tartaglia, Marco, Charlotte M. Niemeyer, Alessandra Fragale, Xiaoling Song, Jochen Buechner, Andreas Jung, Karel Hählen, Henrik Hasle, Jonathan D. Licht, and Bruce D. Gelb. 2003. "Somatic Mutations in PTPN11 in Juvenile Myelomonocytic Leukemia, Myelodysplastic Syndromes and Acute Myeloid Leukemia." *Nature Genetics* 34 (2): 148–50. <https://doi.org/10.1038/ng1156>.
- Tawana, Kiran, Jun Wang, Aline Renneville, Csaba Bödör, Robert Hills, Chey Loveday, Aleksandar Savic, et al. 2015. "Disease Evolution and Outcomes in Familial AML with Germline CEBPA Mutations." *Blood* 126 (10): 1214–23. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-05-647172>.
- Teis, David, Winfried Wunderlich, and Lukas A. Huber. 2002. "Localization of the MP1-MAPK Scaffold Complex to Endosomes Is Mediated by P14 and Required for Signal Transduction." *Developmental Cell* 3 (6): 803–14.
- Telang, Sucheta, Andrew N. Lane, Kristin K. Nelson, Sengodagounder Arumugam, and Jason Chesney. 2007. "The Oncoprotein H-RasV12 Increases Mitochondrial Metabolism." *Molecular Cancer* 6 (December): 77. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-6-77>.
- Thevakumaran, Neroshan, Hugo Lavoie, David A. Critton, Andrew Tebben, Anne Marinier, Frank Sicheri, and Marc Therrien. 2015. "Crystal Structure of a BRAF Kinase Domain Monomer Explains Basis for Allosteric Regulation." *Nature Structural & Molecular Biology* 22 (1): 37–43. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2924>.
- Thol, Felicitas, Robin Bollin, Marten Gehlhaar, Carolin Walter, Martin Dugas, Karl Josef Suchanek, Aylin Kirchner, et al. 2014. "Mutations in the Cohesin Complex in Acute Myeloid Leukemia: Clinical and Prognostic Implications." *Blood* 123 (6): 914–20. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-07-518746>.
- Thomas, Xavier, Stéphane de Botton, Sylvie Chevret, Denis Caillot, Emmanuel Raffoux, Emilie Lemasle, Jean-Pierre Marolleau, et al. 2017. "Randomized Phase II Study of Clofarabine-Based Consolidation for Younger Adults With Acute Myeloid Leukemia in First Remission." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, February, JCO2016704551. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.70.4551>.
- Thorne, Curtis A., Alison J. Hanson, Judsen Schneider, Emilios Tahinci, Darren Orton, Christopher S. Cselenyi, Kristin K. Jernigan, et al. 2010. "Small-Molecule Inhibition of Wnt Signaling through Activation of Casein Kinase 1 $\alpha$ ." *Nature Chemical Biology* 6 (11): 829–36. <https://doi.org/10.1038/nchembio.453>.
- To, Minh D., Christine E. Wong, Anthony N. Karnezis, Reyno Del Rosario, Roberto Di Lauro, and Allan Balmain. 2008. "Kras Regulatory Elements and Exon 4A Determine Mutation Specificity in Lung Cancer." *Nature Genetics* 40 (10): 1240–44. <https://doi.org/10.1038/ng.211>.
- Tonks, Nicholas K. 2006. "Protein Tyrosine Phosphatases: From Genes, to Function, to Disease." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 7 (11): 833–46. <https://doi.org/10.1038/nrm2039>.
- Torii, Satoru, Morioh Kusakabe, Takuya Yamamoto, Momoko Maekawa, and Eisuke Nishida. 2004. "Sef Is a Spatial Regulator for Ras/MAP Kinase Signaling." *Developmental Cell* 7 (1): 33–44. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.05.019>.
- Tothova, Zuzana, and Benjamin L. Ebert. 2017. "Doubling Down on Mutant RAS Can MEK or Break Leukemia." *Cell* 168 (5): 749–50. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.013>.
- Towatari, M., H. Iida, M. Tanimoto, H. Iwata, M. Hamaguchi, and H. Saito. 1997. "Constitutive Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in Acute Leukemia Cells." *Leukemia* 11 (4): 479–84.
- Trakul, Nicholas, Raymond E. Menard, George R. Schade, Zhijian Qian, and Marsha Rich Rosner. 2005. "Raf Kinase Inhibitory Protein Regulates Raf-1 but Not B-Raf Kinase Activation." *The Journal of Biological Chemistry* 280 (26): 24931–40. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413929200>.
- Tran, Eric, Paul F. Robbins, Yong-Chen Lu, Todd D. Prickett, Jared J. Gartner, Li Jia, Anna Pasetto, et al. 2016. "T-Cell Transfer Therapy Targeting Mutant KRAS in Cancer." *The New England Journal of Medicine* 375 (23): 2255–62. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1609279>.
- Tran Thang, Nhu Nam, Madiha Derouazi, Géraldine Philippin, Séverine Arcidiaco, Wilma Di Bernardino-Besson, Frédéric Masson, Sabine Hoepner, et al. 2010. "Immune Infiltration of Spontaneous Mouse Astrocytomas Is Dominated by Immunosuppressive Cells from Early Stages of Tumor Development." *Cancer Research* 70 (12): 4829–39. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3074>.

- Tsapogas, Panagiotis, Ciaran James Mooney, Geoffrey Brown, and Antonius Rolink. 2017. "The Cytokine Flt3-Ligand in Normal and Malignant Hematopoiesis." *International Journal of Molecular Sciences* 18 (6). <https://doi.org/10.3390/ijms18061115>.
- Tuval, Amos, and Liran I. Shlush. 2019. "Evolutionary Trajectory of Leukemic Clones and Its Clinical Implications." *Haematologica* 104 (5): 872–80. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.195289>.
- Tyner, Jeffrey W., Heidi Erickson, Michael W. N. Deininger, Stephanie G. Willis, Christopher A. Eide, Ross L. Levine, Michael C. Heinrich, et al. 2009. "High-Throughput Sequencing Screen Reveals Novel, Transforming RAS Mutations in Myeloid Leukemia Patients." *Blood* 113 (8): 1749–55. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-04-152157>.
- Tyner, Jeffrey W., Cristina E. Tognon, Daniel Bottomly, Beth Wilmot, Stephen E. Kurtz, Samantha L. Savage, Nicola Long, et al. 2018. "Functional Genomic Landscape of Acute Myeloid Leukaemia." *Nature* 562 (7728): 526–31. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0623-z>.
- Usenko, Tatiana, Gordon Chan, Emina Torlakovic, Ursula Klingmüller, and Benjamin G. Neel. 2014. "Leukemogenic Ptpn11 Allele Causes Defective Erythropoiesis in Mice." *PLoS One* 9 (10): e109682. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109682>.
- Vaidyanathan, Hema, John Opoku-Ansah, Sandra Pastorino, Hema Renganathan, Michelle L. Matter, and Joe W. Ramos. 2007. "ERK MAP Kinase Is Targeted to RSK2 by the Phosphoprotein PEA-15." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (50): 19837–42. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704514104>.
- Vandepoele, Karl, Joni Van der Meulen, and Barbara Denys. 2018. "The NF1 Hotspot in Acute Myeloid Leukemia: What's in a Name?" *Leukemia* 32 (12): 2715. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0266-y>.
- Vellenga, Edo, Wim van Putten, Gert J. Ossenkoppele, Leo F. Verdonck, Matthias Theobald, Jan J. Cornelissen, Peter C. Huijgens, et al. 2011. "Autologous Peripheral Blood Stem Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia." *Blood* 118 (23): 6037–42. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-370247>.
- Vetter, I. R., and A. Wittinghofer. 2001. "The Guanine Nucleotide-Binding Switch in Three Dimensions." *Science (New York, N.Y.)* 294 (5545): 1299–1304. <https://doi.org/10.1126/science.1062023>.
- Virchis, Andres, Mickey Koh, Peter Rankin, Atul Mehta, Michael Potter, A. Victor Hoffbrand, and H. Grant Prentice. 2004. "Fludarabine, Cytosine Arabinoside, Granulocyte-Colony Stimulating Factor with or without Idarubicin in the Treatment of High Risk Acute Leukaemia or Myelodysplastic Syndromes." *British Journal of Haematology* 124 (1): 26–32.
- Visser, O, A Trama, M Maynadié, C Stiller, R Marcos-Gragera, R De Angelis, S Mallone, et al. 2012. "Incidence, Survival and Prevalence of Myeloid Malignancies in Europe." *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 48 (17): 3257–66. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.05.024>.
- Voisin, Laure, Marc K. Saba-El-Leil, Catherine Julien, Christophe Frémin, and Sylvain Meloche. 2010. "Genetic Demonstration of a Redundant Role of Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 (ERK1) and ERK2 Mitogen-Activated Protein Kinases in Promoting Fibroblast Proliferation." *Molecular and Cellular Biology* 30 (12): 2918–32. <https://doi.org/10.1128/MCB.00131-10>.
- Vojtek, A. B., S. M. Hollenberg, and J. A. Cooper. 1993. "Mammalian Ras Interacts Directly with the Serine/Threonine Kinase Raf." *Cell* 74 (1): 205–14.
- Vos, A. M. de, L. Tong, M. V. Milburn, P. M. Matias, J. Jancarik, S. Noguchi, S. Nishimura, K. Miura, E. Ohtsuka, and S. H. Kim. 1988. "Three-Dimensional Structure of an Oncogene Protein: Catalytic Domain of Human c-H-Ras P21." *Science (New York, N.Y.)* 239 (4842): 888–93.
- Wahlstrom, Annika M., Briony A. Cutts, Christin Karlsson, Karin M. E. Andersson, Meng Liu, Anna-Karin M. Sjogren, Birgitta Swolin, Stephen G. Young, and Martin O. Bergo. 2007. "Rce1 Deficiency Accelerates the Development of K-RAS-Induced Myeloproliferative Disease." *Blood* 109 (2): 763–68. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-024752>.
- Wakioka, T., A. Sasaki, R. Kato, T. Shouda, A. Matsumoto, K. Miyoshi, M. Tsuneoka, S. Komiya, R. Baron, and A. Yoshimura. 2001. "Spry Is a Sprouty-Related Suppressor of Ras Signalling." *Nature* 412 (6847): 647–51. <https://doi.org/10.1038/35088082>.
- Walter, R. B., M. Othus, A. K. Burnett, B. Löwenberg, H. M. Kantarjian, G. J. Ossenkoppele, R. K. Hills, et al. 2015. "Resistance Prediction in AML: Analysis of 4601 Patients from MRC/NCRI, HOVON/SAKK, SWOG and MD Anderson Cancer Center." *Leukemia* 29 (2): 312–20. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.242>.

- Wan, Paul T. C., Mathew J. Garnett, S. Mark Roe, Sharlene Lee, Dan Niculescu-Duvaz, Valerie M. Good, C. Michael Jones, et al. 2004. "Mechanism of Activation of the RAF-ERK Signaling Pathway by Oncogenic Mutations of B-RAF." *Cell* 116 (6): 855–67.
- Wandzioch, Ewa, Charlotte E. Edling, Ruth H. Palmer, Leif Carlsson, and Bengt Hallberg. 2004. "Activation of the MAP Kinase Pathway by C-Kit Is PI-3 Kinase Dependent in Hematopoietic Progenitor/Stem Cell Lines." *Blood* 104 (1): 51–57. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-07-2554>.
- Wang, Eunice S., Richard M. Stone, Martin S. Tallman, Roland B. Walter, John R. Eckardt, and Robert Collins. 2016. "Crenolanib, a Type I FLT3 TKI, Can Be Safely Combined with Cytarabine and Anthracycline Induction Chemotherapy and Results in High Response Rates in Patients with Newly Diagnosed FLT3 Mutant Acute Myeloid Leukemia (AML)." *Blood* 128 (22): 1071–1071.
- Wang, Fang, Jeremy Travins, Byron DeLaBarre, Virginie Penard-Lacronique, Stefanie Schalm, Erica Hansen, Kimberly Straley, et al. 2013. "Targeted Inhibition of Mutant IDH2 in Leukemia Cells Induces Cellular Differentiation." *Science (New York, N.Y.)* 340 (6132): 622–26. <https://doi.org/10.1126/science.1234769>.
- Wang, Jinyong, Yangang Liu, Zeyang Li, Juan Du, Myung-Jeom Ryu, Philip R. Taylor, Mark D. Fleming, Ken H. Young, Henry Pitot, and Jing Zhang. 2010. "Endogenous Oncogenic Nras Mutation Promotes Aberrant GM-CSF Signaling in Granulocytic/Monocytic Precursors in a Murine Model of Chronic Myelomonocytic Leukemia." *Blood* 116 (26): 5991–6002. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-04-281527>.
- Wang, Jinyong, Yangang Liu, Zeyang Li, Zhongde Wang, Li Xuan Tan, Myung-Jeom Ryu, Benjamin Meline, et al. 2011. "Endogenous Oncogenic Nras Mutation Initiates Hematopoietic Malignancies in a Dose- and Cell Type-Dependent Manner." *Blood* 118 (2): 368–79. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-326058>.
- Wang, Lei, Haichuan Hu, Yunjian Pan, Rui Wang, Yuan Li, Lei Shen, Yongfu Yu, et al. 2014. "PIK3CA Mutations Frequently Coexist with EGFR/KRAS Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer and Suggest Poor Prognosis in EGFR/KRAS Wildtype Subgroup." *PLoS One* 9 (2): e88291. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088291>.
- Wang, Tim, Haiyan Yu, Nicholas W. Hughes, Bingxu Liu, Arek Kendirli, Klara Klein, Walter W. Chen, Eric S. Lander, and David M. Sabatini. 2017. "Gene Essentiality Profiling Reveals Gene Networks and Synthetic Lethal Interactions with Oncogenic Ras." *Cell* 168 (5): 890–903.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.013>.
- Ward, Y., W. Wang, E. Woodhouse, I. Linnoila, L. Liotta, and K. Kelly. 2001. "Signal Pathways Which Promote Invasion and Metastasis: Critical and Distinct Contributions of Extracellular Signal-Regulated Kinase and Ral-Specific Guanine Exchange Factor Pathways." *Molecular and Cellular Biology* 21 (17): 5958–69.
- Warner, Jennifer K., Jean C. Y. Wang, Kristin J. Hope, Liqing Jin, and John E. Dick. 2004. "Concepts of Human Leukemic Development." *Oncogene* 23 (43): 7164–77. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207933>.
- Warrington, Nicole M., Scott M. Gianino, Erin Jackson, Patricia Goldhoff, Joel R. Garbow, David Piwnicka-Worms, David H. Gutmann, and Joshua B. Rubin. 2010. "Cyclic AMP Suppression Is Sufficient to Induce Gliomagenesis in a Mouse Model of Neurofibromatosis-1." *Cancer Research* 70 (14): 5717–27. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3769>.
- Watkins, Fiona, Carrie Fidler, Jacqueline Boulwood, and James S. Wainscoat. 2004. "Mutations in PTPN11 Are Rare in Adult Myelodysplastic Syndromes and Acute Myeloid Leukemia." *American Journal of Hematology* 76 (4): 417–417. <https://doi.org/10.1002/ajh.20134>.
- Wei, Andrew H., Stephen A. Strickland, Jing-Zhou Hou, Walter Fiedler, Tara L. Lin, Roland B. Walter, Anoop Enjeti, et al. 2019. "Venetoclax Combined With Low-Dose Cytarabine for Previously Untreated Patients With Acute Myeloid Leukemia: Results From a Phase Ib/II Study." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 37 (15): 1277–84. <https://doi.org/10.1200/JCO.18.01600>.
- Weinberg, Frank, Robert Hamanaka, William W. Wheaton, Samuel Weinberg, Joy Joseph, Marcos Lopez, Balaraman Kalyanaraman, Gökhan M. Mutlu, G. R. Scott Budinger, and Navdeep S. Chandel. 2010. "Mitochondrial Metabolism and ROS Generation Are Essential for Kras-Mediated Tumorigenicity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (19): 8788–93. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003428107>.
- Weinstein, I. Bernard. 2002. "Cancer. Addiction to Oncogenes—the Achilles Heal of Cancer." *Science (New York, N.Y.)* 297 (5578): 63–64. <https://doi.org/10.1126/science.1073096>.

- Weinstein, I. Bernard, and Andrew K. Joe. 2006. "Mechanisms of Disease: Oncogene Addiction--a Rationale for Molecular Targeting in Cancer Therapy." *Nature Clinical Practice. Oncology* 3 (8): 448–57. <https://doi.org/10.1038/ncponc0558>.
- Weise, Katrin, Shobhna Kapoor, Christian Denter, Jörg Nikolaus, Norbert Opitz, Sebastian Koch, Gemma Triola, Andreas Herrmann, Herbert Waldmann, and Roland Winter. 2011. "Membrane-Mediated Induction and Sorting of K-Ras Microdomain Signaling Platforms." *Journal of the American Chemical Society* 133 (4): 880–87. <https://doi.org/10.1021/ja107532q>.
- Welch, Heidi C. E., W. John Coadwell, Christian D. Ellson, G. John Ferguson, Simon R. Andrews, Hediye Erdjument-Bromage, Paul Tempst, Phillip T. Hawkins, and Len R. Stephens. 2002. "P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>- and Gbetagamma-Regulated Guanine-Nucleotide Exchange Factor for Rac." *Cell* 108 (6): 809–21.
- Welch, John S, Timothy J Ley, Daniel C Link, Christopher A Miller, David E Larson, Daniel C Koboldt, Lukas D Wartman, et al. 2012. "The Origin and Evolution of Mutations in Acute Myeloid Leukemia." *Cell* 150 (2): 264–78. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.023>.
- Welsch, Matthew E., Anna Kaplan, Jennifer M. Chambers, Michael E. Stokes, Pieter H. Bos, Arie Zask, Yan Zhang, et al. 2017. "Multivalent Small-Molecule Pan-RAS Inhibitors." *Cell* 168 (5): 878-889.e29. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.006>.
- Wennerberg, Krister, Kent L. Rossman, and Channing J. Der. 2005. "The Ras Superfamily at a Glance." *Journal of Cell Science* 118 (Pt 5): 843–46. <https://doi.org/10.1242/jcs.01660>.
- Whyte, D. B., P. Kirschmeier, T. N. Hockenberry, I. Nunez-Oliva, L. James, J. J. Catino, W. R. Bishop, and J. K. Pai. 1997. "K- and N-Ras Are Geranylgeranylated in Cells Treated with Farnesyl Protein Transferase Inhibitors." *The Journal of Biological Chemistry* 272 (22): 14459–64. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.22.14459>.
- Williams, N. G., T. M. Roberts, and P. Li. 1992. "Both P21ras and Pp60v-Src Are Required, but Neither Alone Is Sufficient, to Activate the Raf-1 Kinase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (7): 2922–26.
- Williams, Virginia C., John Lucas, Michael A. Babcock, David H. Gutmann, Bruce Korf, and Bernard L. Maria. 2009. "Neurofibromatosis Type 1 Revisited." *Pediatrics* 123 (1): 124–33. <https://doi.org/10.1542/peds.2007-3204>.
- Willingham, M. C., I. Pastan, T. Y. Shih, and E. M. Scolnick. 1980. "Localization of the Src Gene Product of the Harvey Strain of MSV to Plasma Membrane of Transformed Cells by Electron Microscopic Immunocytochemistry." *Cell* 19 (4): 1005–14.
- Willumsen, B. M., A. Christensen, N. L. Hubbert, A. G. Papageorge, and D. R. Lowy. 1984. "The P21 Ras C-Terminus Is Required for Transformation and Membrane Association." *Nature* 310 (5978): 583–86.
- Winter-Vann, Ann M., and Patrick J. Casey. 2005. "Post-Prenylation-Processing Enzymes as New Targets in Oncogenesis." *Nature Reviews. Cancer* 5 (5): 405–12. <https://doi.org/10.1038/nrc1612>.
- Wistuba, Ignacio I., and Adi F. Gazdar. 2006. "Lung Cancer Preneoplasia." *Annual Review of Pathology* 1: 331–48. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.1.110304.100103>.
- Wolthuis, R. M., and J. L. Bos. 1999. "Ras Caught in Another Affair: The Exchange Factors for Ral." *Current Opinion in Genetics & Development* 9 (1): 112–17.
- Wong, Gabrielle S., Jin Zhou, Jie Bin Liu, Zhong Wu, Xinsen Xu, Tianxia Li, David Xu, et al. 2018. "Targeting Wild-Type KRAS-Amplified Gastroesophageal Cancer through Combined MEK and SHP2 Inhibition." *Nature Medicine* 24 (7): 968–77. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0022-x>.
- Wong, Terrence N., Giridharan Ramsingh, Andrew L. Young, Christopher A. Miller, Waseem Touma, John S. Welch, Tamara L. Lamprecht, et al. 2015. "Role of TP53 Mutations in the Origin and Evolution of Therapy-Related Acute Myeloid Leukaemia." *Nature* 518 (7540): 552–55. <https://doi.org/10.1038/nature13968>.
- Woods, D., H. Cherwinski, E. Venetsanakos, A. Bhat, S. Gysin, M. Humbert, P. F. Bray, V. L. Saylor, and M. McMahon. 2001. "Induction of Beta3-Integrin Gene Expression by Sustained Activation of the Ras-Regulated Raf-MEK-Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling Pathway." *Molecular and Cellular Biology* 21 (9): 3192–3205. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.9.3192-3205.2001>.
- Xiang, Wei, Jit Kong Cheong, Shi Hui Ang, Bryan Teo, Peng Xu, Kartini Asari, Wen Tian Sun, et al. 2015. "Pyruvium Selectively Targets Blast Phase-Chronic Myeloid Leukemia through Inhibition of Mitochondrial Respiration." *Oncotarget* 6 (32): 33769–80. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5615>.

- Xiao, Meifang, Liming Zhang, Yizheng Zhou, Pasupati Rajoria, and Changfu Wang. 2016. "Pyruvium Selectively Induces Apoptosis of Lymphoma Cells through Impairing Mitochondrial Functions and JAK2/STAT5." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 469 (3): 716–22. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.12.059>.
- Xie, Mingchao, Charles Lu, Jiayin Wang, Michael D. McLellan, Kimberly J. Johnson, Michael C. Wendl, Joshua F. McMichael, et al. 2014. "Age-Related Mutations Associated with Clonal Hematopoietic Expansion and Malignancies." *Nature Medicine* 20 (12): 1472–78. <https://doi.org/10.1038/nm.3733>.
- Xu, Dan, Xia Liu, Wen-Mei Yu, Howard J. Meyerson, Caiying Guo, Stanton L. Gerson, and Cheng-Kui Qu. 2011. "Non-Lineage/Stage-Restricted Effects of a Gain-of-Function Mutation in Tyrosine Phosphatase Ptpn11 (Shp2) on Malignant Transformation of Hematopoietic Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 208 (10): 1977–88. <https://doi.org/10.1084/jem.20110450>.
- Xu, Dan, and Cheng-Kui Qu. 2008. "Protein Tyrosine Phosphatases in the JAK/STAT Pathway." *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 13 (May): 4925–32.
- Xu, Jin, Kevin M. Haigis, Ari J. Firestone, Megan E. McNerney, Qing Li, Elizabeth Davis, Shann-Ching Chen, Joy Nakitandwe, James Downing, Tyler Jacks, Michelle M. Le Beau, et al. 2013. "Dominant Role of Oncogene Dosage and Absence of Tumor Suppressor Activity in Nras-Driven Hematopoietic Transformation." *Cancer Discovery* 3 (9): 993–1001. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0096>.
- Xu, Jin, Kevin M. Haigis, Ari J. Firestone, Megan E. McNerney, Qing Li, Elizabeth Davis, Shann-Ching Chen, Joy Nakitandwe, James Downing, Tyler Jacks, Michelle M. Le Beau, et al. 2013. "Dominant Role of Oncogene Dosage and Absence of Tumor Suppressor Activity in Nras-Driven Hematopoietic Transformation." *Cancer Discovery* 3 (9): 993–1001. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0096>.
- Xu, Jin, Christian Hedberg, Frank J. Dekker, Qing Li, Kevin M. Haigis, Eugene Hwang, Herbert Waldmann, and Kevin Shannon. 2012. "Inhibiting the Palmitoylation/Depalmitoylation Cycle Selectively Reduces the Growth of Hematopoietic Cells Expressing Oncogenic Nras." *Blood* 119 (4): 1032–35. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-06-358960>.
- Xu, Qing, Serge-Emile Simpson, Timothy J. Scialla, Adam Bagg, and Martin Carroll. 2003. "Survival of Acute Myeloid Leukemia Cells Requires PI3 Kinase Activation." *Blood* 102 (3): 972–80. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-11-3429>.
- Xu, Rongzhen, Yingzi Yu, Shu Zheng, Xiaoying Zhao, Qinghua Dong, Zhiwen He, Yun Liang, et al. 2005. "Overexpression of Shp2 Tyrosine Phosphatase Is Implicated in Leukemogenesis in Adult Human Leukemia." *Blood* 106 (9): 3142–49. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-10-4057>.
- Xu, Wei, Lara Lacerda, Bisrat G. Debeb, Rachel L. Atkinson, Travis N. Solley, Li Li, Darren Orton, et al. 2013. "The Antihelminthic Drug Pyruvium Pamoate Targets Aggressive Breast Cancer." *PloS One* 8 (8): e71508. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071508>.
- Yaeger, Rona, and Ryan B. Corcoran. 2019. "Targeting Alterations in the RAF-MEK Pathway." *Cancer Discovery* 9 (3): 329–41. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-1321>.
- Yan, J., S. Roy, A. Apolloni, A. Lane, and J. F. Hancock. 1998. "Ras Isoforms Vary in Their Ability to Activate Raf-1 and Phosphoinositide 3-Kinase." *The Journal of Biological Chemistry* 273 (37): 24052–56.
- Yang, Dazhi, Noemi Kedei, Luowei Li, Juan Tao, Julia F. Velasquez, Aleksandra M. Michalowski, Balázs I. Tóth, et al. 2010. "RasGRP3 Contributes to Formation and Maintenance of the Prostate Cancer Phenotype." *Cancer Research* 70 (20): 7905–17. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4729>.
- Yang, Dianer, Man-Tzu Wang, Yong Tang, Yakun Chen, Hongmei Jiang, Torrie T. Jones, Krishna Rao, Gregory J. Brewer, Keshav K. Singh, and Daotai Nie. 2010. "Impairment of Mitochondrial Respiration in Mouse Fibroblasts by Oncogenic H-RAS(Q61L)." *Cancer Biology & Therapy* 9 (2): 122–33.
- Yang, Genyan, Waleed Khalaf, Louis van de Locht, Joop H. Jansen, Meihua Gao, Mary Ann Thompson, Bert A. van der Reijden, et al. 2005. "Transcriptional Repression of the Neurofibromatosis-1 Tumor Suppressor by the t(8;21) Fusion Protein." *Molecular and Cellular Biology* 25 (14): 5869–79. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.14.5869-5879.2005>.
- Yang, Shenghong, Xiaoxu Wang, Gianmarco Contino, Marc Liesa, Ergun Sahin, Haoqiang Ying, Alexandra Bause, et al. 2011. "Pancreatic Cancers Require Autophagy for Tumor Growth." *Genes & Development* 25 (7): 717–29. <https://doi.org/10.1101/gad.2016111>.

- Yao, Yao, Wei Li, Junwei Wu, Ursula A. Germann, Michael S. S. Su, Keisuke Kuida, and Diane M. Boucher. 2003. "Extracellular Signal-Regulated Kinase 2 Is Necessary for Mesoderm Differentiation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (22): 12759–64. <https://doi.org/10.1073/pnas.2134254100>.
- Yin, B., K. Morgan, D. E. Hasz, Z. Mao, and D. A. Largaespada. 2006. "Nfl Gene Inactivation in Acute Myeloid Leukemia Cells Confers Cytarabine Resistance through MAPK and MTOR Pathways." *Leukemia* 20 (1): 151–54. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404033>.
- Ying, Haoqiang, Alec C. Kimmelman, Costas A. Lyssiotis, Sujun Hua, Gerald C. Chu, Eliot Fletcher-Sananikone, Jason W. Locasale, et al. 2012. "Oncogenic Kras Maintains Pancreatic Tumors through Regulation of Anabolic Glucose Metabolism." *Cell* 149 (3): 656–70. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.058>.
- Yoon, Seunghee, and Rony Seger. 2006. "The Extracellular Signal-Regulated Kinase: Multiple Substrates Regulate Diverse Cellular Functions." *Growth Factors (Chur, Switzerland)* 24 (1): 21–44. <https://doi.org/10.1080/02699050500284218>.
- You, Xiaona, Guangyao Kong, Erik A. Ranheim, David Yang, Yun Zhou, and Jing Zhang. 2018. "Unique Dependence on Sos1 in Kras G12D -Induced Leukemogenesis." *Blood* 132 (24): 2575–79. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-09-874107>.
- Young, Andrew L., Grant A. Challen, Brenda M. Birman, and Todd E. Druley. 2016. "Clonal Haematopoiesis Harbours AML-Associated Mutations Is Ubiquitous in Healthy Adults." *Nature Communications* 7: 12484. <https://doi.org/10.1038/ncomms12484>.
- Yu, De-Hua, James Macdonald, Guohong Liu, Amy S. Lee, Mimi Ly, Timothy Davis, Ning Ke, Demin Zhou, Flossie Wong-Staal, and Qi-Xiang Li. 2008. "Pyruvate Targets the Unfolded Protein Response to Hypoglycemia and Its Anti-Tumor Activity Is Enhanced by Combination Therapy." *PloS One* 3 (12): e3951. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003951>.
- Yu, Q., Y. Geng, and P. Sicinski. 2001. "Specific Protection against Breast Cancers by Cyclin D1 Ablation." *Nature* 411 (6841): 1017–21. <https://doi.org/10.1038/35082500>.
- Yu, W., W. J. Fantl, G. Harrowe, and L. T. Williams. 1998. "Regulation of the MAP Kinase Pathway by Mammalian Ksr through Direct Interaction with MEK and ERK." *Current Biology: CB* 8 (1): 56–64.
- Yuan, Tina L., Arnaud Amzallag, Rachel Bagni, Ming Yi, Shervin Afghani, William Burgan, Nicole Fer, et al. 2018. "Differential Effector Engagement by Oncogenic KRAS." *Cell Reports* 22 (7): 1889–1902. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.01.051>.
- Yun, Jihye, Edouard Mullarky, Changyuan Lu, Kaitlyn N. Bosch, Adam Kavalier, Keith Rivera, Jatin Roper, et al. 2015. "Vitamin C Selectively Kills KRAS and BRAF Mutant Colorectal Cancer Cells by Targeting GAPDH." *Science (New York, N.Y.)* 350 (6266): 1391–96. <https://doi.org/10.1126/science.aaa5004>.
- Yun, Jihye, Carlo Rago, Ian Cheong, Ray Pagliarini, Philipp Angenendt, Harith Rajagopalan, Kerstin Schmidt, et al. 2009. "Glucose Deprivation Contributes to the Development of KRAS Pathway Mutations in Tumor Cells." *Science (New York, N.Y.)* 325 (5947): 1555–59. <https://doi.org/10.1126/science.1174229>.
- Zhang, Haijiao, Samantha Savage, Anna Reister Schultz, Daniel Bottomly, Libbey White, Erik Segerdell, Beth Wilmot, et al. 2019. "Clinical Resistance to Crenolanib in Acute Myeloid Leukemia Due to Diverse Molecular Mechanisms." *Nature Communications* 10 (1): 244. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08263-x>.
- Zhang, Jing, Yangang Liu, Caroline Beard, David A. Tuveson, Rudolf Jaenisch, Tyler E. Jacks, and Harvey F. Lodish. 2007. "Expression of Oncogenic K-Ras from Its Endogenous Promoter Leads to a Partial Block of Erythroid Differentiation and Hyperactivation of Cytokine-Dependent Signaling Pathways." *Blood* 109 (12): 5238–41. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-09-047050>.
- Zhang, Jing, and Harvey F. Lodish. 2005. "Identification of K-Ras as the Major Regulator for Cytokine-Dependent Akt Activation in Erythroid Progenitors in Vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (41): 14605–10. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507446102>.
- Zhang, Jing, Jing Wang, Yangang Liu, Harwin Sidik, Ken H. Young, Harvey F. Lodish, and Mark D. Fleming. 2009. "Oncogenic Kras-Induced Leukemogenesis: Hematopoietic Stem Cells as the Initial Target and Lineage-Specific Progenitors as the Potential Targets for Final Leukemic Transformation." *Blood* 113 (6): 1304–14. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-01-134262>.

- Zhang, Jingfang, Guangyao Kong, Adhithi Rajagopalan, Li Lu, Jingming Song, Mohamed Hussaini, Xinmin Zhang, et al. 2017. "P53-/- Synergizes with Enhanced NrasG12D Signaling to Transform Megakaryocyte-Erythroid Progenitors in Acute Myeloid Leukemia." *Blood* 129 (3): 358–70. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-06-719237>.
- Zhang, Peng, Fuhong He, Jie Bai, Shohei Yamamoto, Shi Chen, Lin Zhang, Mengyao Sheng, et al. 2018. "Chromatin Regulator Asxl1 Loss and Nf1 Haploinsufficiency Cooperate to Accelerate Myeloid Malignancy." *The Journal of Clinical Investigation* 128 (12): 5383–98. <https://doi.org/10.1172/JCI121366>.
- Zhang, Si Qing, Wentian Yang, Maria I. Kontaridis, Trever G. Bivona, Gengyun Wen, Toshiyuki Araki, Jincui Luo, et al. 2004. "Shp2 Regulates SRC Family Kinase Activity and Ras/Erk Activation by Controlling Csk Recruitment." *Molecular Cell* 13 (3): 341–55.
- Zhao, Chen, Guangwei Du, Karl Skowronek, Michael A. Frohman, and Dafna Bar-Sagi. 2007. "Phospholipase D2-Generated Phosphatidic Acid Couples EGFR Stimulation to Ras Activation by Sos." *Nature Cell Biology* 9 (6): 706–12. <https://doi.org/10.1038/ncb1594>.
- Zhao, Mingming, Justyna A. Janas, Masaru Niki, Pier Paolo Pandolfi, and Linda Van Aelst. 2006. "Dok-1 Independently Attenuates Ras/Mitogen-Activated Protein Kinase and Src/c-Myc Pathways to Inhibit Platelet-Derived Growth Factor-Induced Mitogenesis." *Molecular and Cellular Biology* 26 (7): 2479–89. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.7.2479-2489.2006>.
- Zhao, Zhen, Chi-Chao Chen, Cory D. Rillahan, Ronglai Shen, Thomas Kitzing, Megan E. McNerney, Ernesto Diaz-Flores, et al. 2015. "Cooperative Loss of RAS Feedback Regulation Drives Myeloid Leukemogenesis." *Nature Genetics* 47 (5): 539–43. <https://doi.org/10.1038/ng.3251>.
- Zheng, C. F., and K. L. Guan. 1994. "Activation of MEK Family Kinases Requires Phosphorylation of Two Conserved Ser/Thr Residues." *The EMBO Journal* 13 (5): 1123–31.
- Zheng, Wei, Fariba Tayyari, G. A. Nagana Gowda, Daniel Raftery, Eric S. McLamore, D. Marshall Porterfield, Shawn S. Donkin, Brian Bequette, and Dorothy Teegarden. 2015. "Altered Glucose Metabolism in Harvey-Ras Transformed MCF10A Cells." *Molecular Carcinogenesis* 54 (2): 111–20. <https://doi.org/10.1002/mc.22079>.
- Zhou, Jing-Dong, Dong-Ming Yao, Xi-Xi Li, Ting-Juan Zhang, Wei Zhang, Ji-Chun Ma, Hong Guo, Zhao-Qun Deng, Jiang Lin, and Jun Qian. 2017. "KRAS Overexpression Independent of RAS Mutations Confers an Adverse Prognosis in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia." *Oncotarget* 8 (39): 66087–97. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19798>.
- Zhu, Helen He, Kaihong Ji, Nazilla Alderson, Zhao He, Shuangwei Li, Wen Liu, Dong-Er Zhang, Linheng Li, and Gen-Sheng Feng. 2011. "Kit-Shp2-Kit Signaling Acts to Maintain a Functional Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Pool." *Blood* 117 (20): 5350–61. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-333476>.
- Ziemke, Elizabeth K., Joseph S. Dosch, Joel D. Maust, Amrith Shettigar, Ananda Sen, Theodore H. Welling, Karin M. Hardiman, and Judith S. Sebolt-Leopold. 2016. "Sensitivity of KRAS-Mutant Colorectal Cancers to Combination Therapy That Cotargets MEK and CDK4/6." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 22 (2): 405–14. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0829>.
- Zimmermann, Gunther, Björn Papke, Shehab Ismail, Nachiket Vartak, Anchal Chandra, Maike Hoffmann, Stephan A. Hahn, et al. 2013. "Small Molecule Inhibition of the KRAS-PDE $\delta$  Interaction Impairs Oncogenic KRAS Signalling." *Nature* 497 (7451): 638–42. <https://doi.org/10.1038/nature12205>.
- Zimmermann, S., and K. Moelling. 1999. "Phosphorylation and Regulation of Raf by Akt (Protein Kinase B)." *Science (New York, N.Y.)* 286 (5445): 1741–44.
- Ziogas, Algirdas, Karin Moelling, and Gerald Radziwill. 2005. "CNK1 Is a Scaffold Protein That Regulates Src-Mediated Raf-1 Activation." *The Journal of Biological Chemistry* 280 (25): 24205–11. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413327200>.

## Résumé

Ces dernières années ont connu de grandes avancées dans le domaine de la caractérisation moléculaire des leucémies aiguës myéloïdes (LAM). Malgré le développement clinique rapide de thérapies ciblées hautement actives dans certains sous-types de LAM comme ceux présentant des mutations des gènes *FLT3* ou *IDH1/2*, une majorité de cas ne disposent actuellement pas de cible moléculaire pertinente. Dans ce contexte, nous avons déterminé la fréquence des mutations activant la voie RAS au sein d'une cohorte de 127 patients atteints de LAM pour lesquels les traitements actuels sont insuffisamment actifs, c'est-à-dire après avoir exclu les cas caractérisés par un score ELN favorable ou une mutation *FLT3-ITD*. En utilisant un panel personnalisé de séquençage de nouvelle génération, nous avons détecté au moins une altération dans 50 échantillons de LAM (40%). Nous avons identifié 17 cas (14,8%) de mutations/délétions de *NF1*, et des mutations des gènes *NRAS*, *KRAS*, *PTPN11*, *CBL* et *BRAF* ont été détectées dans 13 (10,4%), 10 (8%), 9 (7,2%), 5 (4%) et 2 (1,6%) cas, respectivement. Des mutations des gènes *RAF1*, *RASA1*, *SOS1* et *MAP2K2* ont été observées une fois chacune. De plus, des mutations concomitantes d'acteurs de la voie RAS étaient présentes dans neuf échantillons. L'analyse des fréquences d'allèles variants nous permet de suggérer que ces altérations de la voie RAS peuvent, soit faire partie du clone leucémique principal, soit survenir dans des sous-clones. En les analysant de manière globale, les altérations de la voie RAS sont plus volontiers associées à des marqueurs de prolifération cellulaire (leucocytose, pourcentage de blastes et taux de LDH) chez les patients. De plus, ces anomalies sont associées à une diminution de la survie globale, en particulier parmi le sous-groupe de patients ayant un score ELN intermédiaire. Nous avons ensuite établi des modèles robustes d'activation de la voie RAS/MAPK, par délétion de *NF1* et expression de *NRAS*<sup>G12D</sup> dans des lignées cellulaires dépendantes de facteurs de croissance. Nous avons pu montrer une addiction oncogénique à la voie RAS dans ces différents modèles, définie par une prolifération cellulaire indépendante des facteurs de croissance, une augmentation de l'activité de RAS, une propagation plus rapide dans des souris immunodéficientes et une sensibilité accrue aux inhibiteurs de MEK *in vitro* et *in vivo*. Lors d'un criblage pharmacologique à forte densité comportant une majorité de molécules approuvées en thérapeutique humaine, nous avons identifié le pyrvinium pamoate, actuellement utilisé comme anti-helminthique, comme étant particulièrement cytotoxique vis-à-vis des cellules ayant une altération de la voie RAS, y compris dans des échantillons de patients atteints de LAM. De plus, nous avons observé une synergie entre le tramétinib (un inhibiteur de MEK) et le pyrvinium pamoate, ce dernier pouvant agir sur des mécanismes de résistance induits par l'inhibition de MEK. Nos résultats suggèrent que le développement clinique du pyrvinium pamoate pourrait représenter une nouvelle opportunité thérapeutique dans les LAM ayant une altération de la voie RAS.