

Reprogrammation métabolique dans les leucémies aiguës myéloïdes de novo de l'adulte : impact clinique

Caroline Lo Presti

► To cite this version:

Caroline Lo Presti. Reprogrammation métabolique dans les leucémies aiguës myéloïdes de novo de l'adulte : impact clinique. Sciences pharmaceutiques. 2019. dumas-03039975

HAL Id: dumas-03039975

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03039975>

Submitted on 21 Dec 2020

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.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>



UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES
UFR DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2019

REPROGRAMMATION METABOLIQUE DANS LES LEUCEMIES AIGUES
MYELOÏDES *DE NOVO* DE L'ADULTE : IMPACT CLINIQUE.

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE

Conformément aux dispositions du décret N° 90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de

THÈSE
PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
DIPLOME D'ÉTAT

Caroline LO PRESTI

[Données à caractère personnel]

MÉMOIRE SOUTENU PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE
GRENOBLE

Le : 04/10/2019

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Président du jury :

Pr Pascal MOSSUZ (directeur de thèse)

Membres :

Dr Julie MONDET

Pr Sophie PARK

Dr Julien PERRIN

Dr Claire VETTIER

L'UFR de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les mémoires ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

Liste des enseignants



Doyen de la Faculté : **M. le Pr. Michel SEVE**

Vice-doyen et Directrice des Etudes :
Mme Christine DEMEILLIERS

Année 2018 – 2019

ENSEIGNANTS – ENSEIGNANTS/CHERCHEURS HDR et ou Pharmaciens

Statut	Nom	Prénom	Laboratoire	Pharmacien	HDR
MCF	ALDEBERT	DELPHINE	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525, TheREx	oui	oui
PU-PH	ALLENET	BENOIT	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525, TheMAS	oui	oui
PU	BAKRI	ABDELAZIZ	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525	oui	oui
MAST	BARDET	JEAN-DIDIER	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525, TheMAS	oui	non
MCF	BATANDIER	CECILE	LBFA – INSERM U1055	oui	non
PU-PH	BEDOUC	PIERRICK	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525, TheMAS	oui	oui
MCF	BELAIDI-CORSAT	ELISE	HP2, Inserm U1042	non	oui
MAST	BELLET	BEATRICE	-	oui	non
MCF	BOUCHERLE	BENJAMIN	DPM - UMR CNRS 5063	oui	non
PU	BOUMENDJEL	AHCENE	DPM – UMR CNRS 5063	non	oui
MCF	BOURGOIN	SANDRINE	IAB – CRI INSERM U823	non	non
MCF	BRETON	JEAN	LCIB – UMR CEA E3	oui	oui
MCF	BRIANCON-MARJOLLET	ANNE	HP2 – INSERM U1042	non	non
PU	BURMEISTER	WILHEM	UVHCI- UMI 3265 EMBL CNRS	non	oui
MCU-PH	BUSSER	BENOIT	Institute for Advanced Biosciences, UGA / Inserm U 1209 / CNRS 5309	oui	oui
Professeur Emerite	CALOP	JEAN	-	oui	oui
MCF	CAVAILLES	PIERRE	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525	non	non
MCU-PH	CHANOINE	SEBASTIEN	CR UGA - INSERM U1209 - CNRS 5309	oui	non
MCF	CHOISNARD	LUC	DPM – UMR CNRS 5063	non	non
AHU	CHOVELON	BENOIT	DPM – UMR CNRS 5063	oui	non
PU-PH	CORNET	MURIEL	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525 TheREx	non	oui
Professeur Emérite	DANEL	VINCENT		non	oui
PU	DECOUT	JEAN-LUC	DPM – UMR CNRS 5063	non	oui
MCF Emérite	DELETRAZ-DELPORTE	MARTINE	LPSS – EAM 4129 LYON	oui	oui
MCF	DEMEILLIERS	CHRISTINE	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525	non	oui
PU-PH	DROUET	CHRISTIAN	GREPI EA7408	oui	oui
PU	DROUET	EMMANUEL	IBS – UMR 5075 CEA CNRS HIV & virus persistants Institut de Biologie Structurale	oui	oui
MCF	DURMORT	CLAIRE	IBS – UMR CEA CNRS 5075	non	oui
PU-PH	FAURE	PATRICE	HP2 – INSERM U1042	non	oui

MCF	FAURE-JOYEUX	MARIE	HP2 – INSERM U1042	oui	oui
PRCE	FITE	ANDREE	-	non	non
MCU-PH	GARNAUD	CECILE	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525 TheReX	oui	non
PRAG	GAUCHARD	PIERRE- ALEXIS	-	non	non
MCU-PH	GERMI	RAPHAELE	IBS – UMR CEA CNRS 5075 HIV & virus persistants Institut de Biologie Structurale	oui	oui
MCF	GEZE	ANNABELLE	DPM – UMR CNRS 5063	non	oui
MCF	GILLY	CATHERINE	DPM – UMR CNRS 5063	oui	oui
PU	GODIN-RIBUOT	DIANE	HP2 – INSERM U1042	non	oui
MCF	GONINDARD	CHRISTELLE	LECA – UMR CNRS 5553	non	non
Professeure Emérite	GRILLOT	RENEE	-	oui	oui
MCF Emérite	GROSSET	CATHERINE	DPM – UMR CNRS 5063	oui	oui
MCF	GUIEU	VALERIE	DPM – UMR CNRS 5063	non	non
AHU	HENNEBIQUE	AURELIE	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525 TheReX	oui	non
MCF	HININGER- FAVIER	ISABELLE	LBFA – INSERM U1055	oui	oui
MCF	KHALEF	NAWEL	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525	non	non
MCF	KOTZKI	SYLVAIN	HP2 – UMR S1042	oui	non
MCF	KRIVOBOK	SERGE	DPM – UMR CNRS 5063	oui	oui
PU	LENORMAND	JEAN-LUC	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525 TheReX	non	oui
PU	MARTIN	DONALD	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525	non	oui
PRCE	MATTHYS	LAURENCE	-	non	non
AHU	MAZET	ROSELINE	DPM – UMR CNRS 5063	oui	non
AHU	MINOVES	MELANIE	HP2 – INSERM U1042	oui	non
PU	MOINARD	CHRISTOPHE	LBFA - INSERM U1055	non	oui
PU-PH	MOSSUZ	PASCAL	IAB – INSERM U1209	non	oui
MCF	MOUHAMADOU	BELLO	LECA – UMR CNRS 5553	non	oui
MCF	NICOLLE	EDWIGE	DPM – UMR CNRS 5063	oui	oui
MCF	OUKACINE	FARID	DPM – UMR CNRS 5063	non	non
MCF	PERES	BASILE	DPM – UMR CNRS 5063	non	oui
MCF	PEUCHMAUR	MARINE	DPM – UMR CNRS 5063	non	oui
PU	PEYRIN	ERIC	DPM – UMR CNRS 5063	oui	oui
AHU	PLUCHART	HELENE	TIMC-IMAG – UMR CNRS 5525 THEMAS	oui	non
MCF	RACHIDI	WALID	LCIB – UMR E3 CEA	non	oui
MCF	RAVELET	CORINNE	DPM – UMR CNRS 5063	non	oui
PU	RIBUOT	CHRISTOPHE	HP2 – INSERM U1042	oui	oui
PU-PH	SEVE	MICHEL	LBFA – INSERM U1055	oui	oui
MCF	SOUARD	FLORENCE	DPM – UMR CNRS 5063	oui	non
MCF	SPANO	MONIQUE	IBS – UMR CEA CNRS 5075	non	oui
MCF	TARBOURIECH	NICOLAS	IBS – UMR CEA CNRS 5075	non	oui
MCF	VANHAVERBEKE	CECILE	DPM – UMR CNRS 5063	non	non
PU	WOUESSIDJEWE	DENIS	DPM – UMR CNRS 5063	oui	oui

Remerciements

Au Professeur Pascal Mossuz,

Merci de m'avoir encadrée tout au long de mon internat, d'avoir toujours été disponible dès que j'en ai eu besoin, et de m'avoir permis de réaliser ce travail au sein de votre équipe. J'espère que cela se poursuivra dans les années à venir.

Au Docteur Julie Mondet,

Merci de m'avoir tout appris depuis mon arrivée au labo, et de m'avoir aidée tout au long de ce travail. Il nous reste encore plein de moments et de manips à partager ensemble.

Au Docteur Claire Vettier,

Merci d'avoir accepté de juger mon travail, et surtout merci de votre aide précieuse durant ces années d'internat.

Au Professeur Sophie Park,

Merci d'avoir accepté de juger mon travail, et un grand merci à l'association ARAMIS que vous représentez, pour m'avoir remis la bourse de l'Espoir Sandrine en mars dernier.

Au Docteur Julien Perrin,

Merci d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse, et de faire le déplacement jusqu'à Grenoble pour y assister. Toute cette histoire a commencé grâce au stage d'initiation à la recherche que j'ai effectué au laboratoire d'hématologie du CHU de Nancy, où tu m'as encadrée. Ce stage m'a permis de vraiment apprécier la

recherche et m'a convaincue de me lancer dans l'internat en IPR, et en encore mieux, de me spécialiser en hémato !

Au service d'hématologie biologique du CHU Grenoble Alpes,

Merci à toute l'équipe du labo d'hémato, biologistes et techniciens, et particulièrement aux techniciennes du secteur d'hématopoïèse : Anne et Rachel.

A mes parents et à ma sœur,

Merci de m'avoir toujours soutenue dans ce long parcours, et de m'avoir fait confiance jusqu'ici.

A Luigi,

Merci d'être présent à mes côtés chaque jour, tu es l'homme le plus attentionné et généreux que je connaisse. Merci pour tout le bonheur que tu m'apportes au quotidien.

A mes amies,

A Juliette, ma meilleure amie. Notre complicité de toujours est restée la même malgré la distance qui nous sépare.

A Ingrid, mon ancienne co-interne devenue une amie précieuse. Merci pour tous ces fous rires partagés ensemble.

A toutes mes amies de la fac de Nancy : Mélanie, Delphine, Sarah, Cécile, Lise, Mathilde, Claire, Pauline et Axelle. Merci pour tous ces moments qu'on a partagés ensemble depuis 9 ans et qu'on partage encore maintenant !

Table des matières

Liste des figures et tableaux.....	7
Liste des abréviations	10
Revue générale de la littérature.....	13
1. Les leucémies aigues myéloïdes.....	13
1.1. Généralités.....	13
1.2. Épidémiologie.....	13
1.3. Présentation clinique	13
1.4. Diagnostic biologique	14
1.4.1. Myélogramme	14
1.4.2. Morphologie des blastes.....	15
1.4.3. Cytochimie	15
1.4.4. Immunophénotypage.....	17
1.4.5. Anomalies cytogénétiques.....	17
1.4.6. Anomalies moléculaires.....	20
1.5. Facteurs pronostiques	21
1.6. Traitement.....	24
1.6.1. Traitement standard	24
1.6.2. Nouveaux agents	25
1.7. Physiopathologie et leucémogénèse.....	27
1.7.1. Facteurs prédisposants	27
1.7.2. Anomalies moléculaires.....	27
1.7.3. Caractéristiques des cellules souches leucémiques.....	30
1.7.4. Dérégulations fonctionnelles associées	31
2. Les dérégulations métaboliques	33
2.1. Dans les cancers.....	33
2.1.1. L'effet Warburg	33
2.1.2. Le métabolisme du glucose.....	36
2.1.3. Le cycle de Krebs.....	38
2.1.4. Le métabolisme de la glutamine	39
2.1.5. Le métabolisme des lipides	41
2.1.6. Le métabolisme des phospholipides	43
2.2. Dans les LAM.....	44
2.2.1. Les dérégulations des espèces réactives de l'oxygène (ROS)	44
2.2.2. Les dérégulations de l'isocitrate déshydrogénase	46
2.2.3. Les dérégulations du métabolisme du glucose.....	48
2.2.4. Les dérégulations du métabolisme de la glutamine.....	49
2.2.5. Les dérégulations du métabolisme lipidique.....	50
2.2.6. Les dérégulations du métabolisme des phospholipides.....	52
3. L'étude du métabolisme par une approche métabolomique	53
3.1. Contexte	53
3.2. La métabolomique	53
3.3. Techniques d'analyse.....	54
3.4. La métabolomique basée sur la RMN HRMAS.....	55
3.5. Principe général d'un protocole de métabolomique	57
3.6. Traitement des données collectées.....	58
Objectifs.....	60
Matériels et Méthodes.....	61
1. Inclusion des patients et collection des échantillons.....	61
2. Préparation de l'échantillon.....	61

3. Paramètres d'acquisition de la RMN HRMAS	62
4. Prétraitement des spectres	62
5. Statistiques multivariées et univariées	63
Résultats.....	65
1. Caractéristiques générales des patients au diagnostic.....	65
2. Classification FAB.....	66
3. Classification pronostique	66
4. Métabolites identifiés en RMN	68
5. Analyse des données	71
5.1. Sous-types de LAM	71
5.2. Résultats en fonction du statut génétique	72
5.2.1. Mutation NPM1	72
5.2.2. Mutation FLT3-ITD	74
5.2.3. Mutation IDH.....	76
5.3. Corrélation avec le pronostic	80
5.3.1. Groupes pronostiques selon l'ELN.....	80
5.3.2. Survie globale	83
5.3.3. Réponse au traitement	85
6. Découverte de biomarqueurs potentiels.....	88
Discussion.....	92
1. Les patients présentent des différences significatives de leur métabolisme selon leur sous-type cytologique et leur statut moléculaire	92
2. Le lien entre métabolisme et statut moléculaire.....	93
3. Impact du métabolisme sur le pronostic	94
4. L'association des mutations <i>IDH</i> et <i>NPM1</i> confère un meilleur pronostic aux patients atteints de LAM <i>de novo</i>	95
5. Les dérégulations du métabolisme phospholipidique ont un réel impact négatif sur le pronostic, la survie et la réponse au traitement	96
5.1. Les phospholipides en lien avec la mutation <i>IDH</i>	96
5.2. Les phospholipides sont responsables de la progression tumorale et de l'agressivité de la leucémie	97
6. La surexpression du GSH au diagnostic de LAM est un désavantage considérable dans l'évolution de la pathologie	98
7. L'alanine : un marqueur de mauvais pronostic dans les LAM	99
Conclusion	101
Références.....	103

Liste des figures et tableaux

Figure 1. Blastés négatifs (gauche) et positifs (droite) pour la myélopéroxydase.....	16
Figure 2. Monocytes et blastés négatifs (gauche) et positifs (droite) pour la butyrate estérase.....	16
Figure 3. Hétérogénéité moléculaire des LAM à caryotype normal. D'après Döhner <i>et al</i> , Blood, 2010.....	21
Figure 4. Caractérisation des mutations découvertes dans les LAM. D'après l'équipe de recherche du projet « The Cancer Genome Atlas », NEJM, 2013.	28
Figure 5. Distribution de sous-types de LAM définis au niveau cytogénétique et moléculaire. D'après Grimwade <i>et al</i> , Blood, 2016.	29
Figure 6. A. Voies fréquemment dérégulées dans les LAM ainsi que les gènes associés. D'après Grove <i>et al</i> , Disease models and mechanisms, 2014. B. Graphique de Circos montrant les co-occurrences entre les voies dérégulées. D'après Graubert <i>et al</i> , American Society of Clinical Oncology Educational Book, 2014.....	32
Figure 7. Principe de l'effet Warburg. D'après Vander Heiden <i>et al</i> , Science, 2009.	34
Figure 8. Effets des mutations <i>IDH</i> . D'après Rampal <i>et al</i> , Haematologica, 2016.....	39
Figure 9. A. Principe d'une expérience RMN. Alignement des spins nucléaires dans le champ magnétique B0. B. Application du champ magnétique B1 perpendiculaire à B0 : perturbation de l'équilibre. C. Retour à l'équilibre, signal de temps et spectre.	56
Figure 10. Méthode de RMN HRMAS.....	57
Figure 11. Cartographie des voies métaboliques fonctionnelles caractérisées chez les patients atteints de LAM.....	70
Figure 12. OPLS-DA du modèle de la répartition des patients en fonction de la classification FAB.....	71
Figure 13. OPLS-DA du modèle du statut mutationnel de <i>NPM1</i>	72
Figure 14. S-line du modèle du statut mutationnel de <i>NPM1</i> . 2-HG : 2-hydroxyglutarate ; PC : Phosphocholine.....	73
Figure 15. Variation quantitative des métabolites en fonction du statut mutationnel de <i>NPM1</i> . (**, $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).	73
Figure 16. OPLS-DA du modèle du statut mutationnel de <i>FLT3</i> -ITD.	74
Figure 17. S-line du modèle du statut mutationnel de <i>FLT3</i> -ITD. Ala: Alanine; PE : Phosphoéthanolamine; Scyllo-I : Scylloinositol.....	75
Figure 18. Variation quantitative des métabolites en fonction du statut mutationnel de <i>FLT3</i> -ITD. (**, $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).	75
Figure 19. OPLS-DA du modèle du statut mutationnel d' <i>IDH</i>	76

Figure 20. S-line du modèle du statut mutationnel d' <i>IDH</i> . 2-HG : 2-hydroxyglutarate ; Ala : Alanine ; PC : Phosphocholine ; PE : Phosphoéthanolamine.	77
Figure 21. Variation quantitative des métabolites en fonction du statut mutationnel d' <i>IDH</i> . (**, $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).	77
Figure 22. OPLS-DA du modèle de la répartition des patients en fonction de la classification FAB en excluant les patients mutés <i>IDH</i>	78
Figure 23. OPLS-DA du modèle de prédiction du statut mutationnel d' <i>IDH</i>	79
Figure 24. OPLS-DA du modèle des groupes pronostiques favorable vs défavorable.	80
Figure 25. S-line du modèle des groupes pronostiques favorable vs défavorable. 2-HG : 2-hydroxyglutarate ; GSH : Glutathion ; PC : Phosphocholine ; PE : Phosphoéthanolamine. ...	80
Figure 26. Variation quantitative des métabolites en fonction du groupe pronostique. (*, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$).	81
Figure 27. Courbes ROC et AUC pour les 4 métabolites discriminants retrouvés entre les patients de pronostic favorable (n = 16) vs défavorable (n = 14). Axe des ordonnées : taux de vrais positifs (sensibilité) ; Axe des abscisses : taux de faux-positifs (1-spécificité).	82
Figure 28. OPLS-DA du modèle de survie globale.	83
Figure 29. S-line du modèle de survie globale. 2-HG : 2-hydroxyglutarate ; PE : Phosphoéthanolamine.	83
Figure 30. Variation quantitative des métabolites en fonction de la survie globale. (*, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$).	84
Figure 31. Courbes ROC et AUC pour les 2 métabolites discriminants retrouvés entre les patients vivants (n = 30) vs décédés (n = 14). Axe des ordonnées : taux de vrais positifs (sensibilité) ; Axe des abscisses : taux de faux-positifs (1-spécificité).	85
Figure 32. OPLS-DA du modèle de réponse au traitement par chimiothérapie.	86
Figure 33. S-line du modèle de réponse au traitement par chimiothérapie. 2-HG : 2-hydroxyglutarate ; Ala : Alanine ; GSH : Glutathion ; PE : Phosphoéthanolamine ; Scyllo-I : Scylloinositol.	86
Figure 34. Variation quantitative des métabolites en fonction de la réponse au traitement par chimiothérapie. (*, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).	87
Figure 35. Courbes ROC et AUC pour les 5 métabolites discriminants retrouvés entre les patients chimiosensibles (n = 25) vs chimiorésistants (n = 6). Axe des ordonnées : taux de vrais positifs (sensibilité) ; Axe des abscisses : taux de faux-positifs (1-spécificité).	88
Figure 36. Courbe de Kaplan-Meier indiquant la survie des patients <i>IDH</i> muté (n = 11) vs <i>IDH</i> non muté (n = 28) avec un seuil de 2-HG fixé à 1158 u.a. en fonction du temps (jours).	90

Figure 37. Courbe de Kaplan-Meier indiquant la survie des patients chimiosensibles (n = 25) vs chimiorésistants (n = 6) avec un seuil de scylloinositol fixé à 523 u.a. en fonction du temps (jours).....91

Tableau I. Classification FAB.....15

Tableau II. Expression des marqueurs cellulaires de surface et cytoplasmiques pour le diagnostic de LAM.....17

Tableau III. Extrait de la classification de l'OMS 2016 listant les entités de LAM et leurs anomalies cytogénétiques associées. D'après Arber *et al*, Blood, 2016.19

Tableau IV. Stratification du risque basé sur la génétique. Recommandations de l'European LeukemiaNet (ELN) 2017. D'après Döhner *et al*, Blood, 2016.....23

Tableau V. Caractéristiques des patients au diagnostic.....65

Tableau VI. Répartition des différents sous-types de LAM.....66

Tableau VII. Caractéristiques pronostiques cytogénétiques et survie globale.68

Tableau VIII. Métabolites identifiés en RMN.69

Tableau IX. Biomarqueurs pronostiques potentiels dans les LAM. Le pronostic est évalué selon la classification de l'ELN, et la réponse au traitement correspond à la rémission complète (pour les patients chimiosensibles) ou non (pour les patients chimiorésistants) après induction de la chimiothérapie. 2-HG : 2-hydroxyglutarate ; CS : Chimiosensible ; CR : Chimiorésistant ; GSH : Glutathion ; PC : Phosphocholine ; PE : Phosphoéthanolamine.89

Liste des abréviations

α -KG : α -cétoglutarate

2-HG : 2-hydroxyglutarate

ACL : ATP Citrate Lyase

ACP : Analyse en Composantes Principales

AG : Acides Gras

Ala : Alanine

ASXL1 : Additional Sex combs Like 1

ATP : Adénosine Triphosphate

ATRA : Acide Tout-Trans Rétinoïque

ATU : Autorisation Temporaire d'Utilisation

CBF α : Core Binding Factor alpha

CEBPA : CCAAT Enhancer-Binding Protein Alpha

CIVD : Coagulation Intravasculaire Disséminée

CK : Choline Kinase

CPT : Carnitine Palmitoyltransférase

CR : Chimiorésistant

CS : Chimiosensible

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

CSL : Cellules Souches Leucémiques

DNMT3A : DNA Methyl-Transferase 3A

EFS : Event-free Survival

EK : Ethanolamine Kinase

ELN : European Leukemia Net

ETO : Eight-Twenty-One

FAB : French American Bristish

FAO : Fatty Acid Oxidation

FASN : Fatty Acid Synthase

FH : Fumarate Hydratase

FLT3 : Fms-Like Tyrosine kinase 3

G6PD : Glucose-6-Phosphate-Dehydrogenase

GAPDH : Glycéraldéhyde 3-Phosphate Déshydrogénase

GLS : Glutaminase

GLUT : Glucose Transporter
GSH : Glutathion
GSK : Glycogen Synthase Kinase
HIF : Hypoxia Inducible Factor
HK : Hexokinase
HRMAS : High Resolution Magic Angle Spinning
IDH : Isocitrate Dehydrogenase
ITD : Internal Tandem Duplication
LAL : Leucémie Aigue Lymphoïde
LAM : Leucémie Aigue Myéloïde
LDH : Lactate Déshydrogénase
LKB1 : Liver Kinase B1
MAPK : Mitogen-activated Protein Kinases
MLL : Mixed-Lineage Leukemia
MPO : Myélopéroxydase
mTOR : mammalian Target Of Rapamycin
NF- κ B : Nuclear Factor κ B
NGS : Next Generation Sequencing
NOX : NADPH Oxydase
NPM1 : Nucleophosmin 1
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OPLS-DA : Orthogonal Projection to Latent Structure with Discriminant Analysis
OS : Overall Survival
PC : Phosphocholine
PDC : Pyruvate Dehydrogenase Complex
PDK : Pyruvate Dehydrogenase Kinase
PE : Phosphoéthanolamine
PHD3 : Prolyl Hydroxylase Domain 3
PI3K/AKT : Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt
PK : Pyruvate Kinase
PML-RARA : Promyelocytic leukemia gene-Retinoic Acide Receptor Alpha
PPP : Pentose Phosphate Pathway
RC : Rémission Complète
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

ROS : Reactive Oxygen Species

RUNX1 : Runt-related transcription factor 1

SDH : Succinate Dehydrogenase

SLC : Solute Carrier

SM : Spectrométrie de Masse

SMD : Syndrome Myélodysplasique

TET2 : Ten Eleven Translocation 2

WT1 : Wilms Tumor 1

1. Les leucémies aigues myéloïdes

1.1. Généralités

Les leucémies aigues myéloïdes (LAM) sont un ensemble de proliférations malignes conduisant à une accumulation dans la moelle osseuse, le sang périphérique et potentiellement d'autres organes, de progéniteurs myéloïdes immatures – également appelés « blastes » – qui ont partiellement ou complètement perdu leur capacité de différenciation.

1.2. Épidémiologie

Au niveau épidémiologique, l'incidence des LAM est d'environ 3 à 8 cas pour 100 000 habitants par an dans le monde¹, ce qui représente environ 3 500 nouveaux cas par an en France, avec un sex ratio homme/femme de 1,3². L'âge médian de survenue de la pathologie se situe autour de 70 ans¹.

1.3. Présentation clinique

La prolifération des blastes dans la moelle osseuse ainsi que leur accumulation dans d'autres organes entraînent l'apparition de signes cliniques. Ces signes sont généralement non spécifiques de la pathologie. Dans la majorité des cas, les patients présentent un syndrome anémique, caractérisé par une diminution significative du taux d'hémoglobine (en général entre 5 et 12 g/dL), entraînant

plusieurs symptômes tels que l'asthénie, la pâleur cutanéomuqueuse, une dyspnée, une tachycardie, des vertiges, etc. De plus, une thrombopénie – parfois majeure ($< 10 \text{ G/L}$) – est fréquemment associée à l'anémie, entraînant des signes hémorragiques (épistaxis, gingivorragies, ménorragies, etc.), pouvant aller jusqu'à une coagulopathie de consommation (CIVD). Le nombre de leucocytes est très variable en fonction des cas, pouvant aller de la leucopénie franche ($< 1 \text{ G/L}$) sans blastes circulants, entraînant des signes d'infection, jusqu'à l'hyperleucocytose majeure (100 à 500 G/L), pouvant entraîner une détresse respiratoire du fait de la leucostase.

1.4. Diagnostic biologique

1.4.1. *Myélogramme*

Le diagnostic des LAM repose sur plusieurs examens biologiques. L'examen indispensable au diagnostic de leucémie aigue (LA) est le myélogramme. En effet, il faut retrouver plus de 20% de blastes parmi toutes les cellules de la moelle osseuse observées au microscope pour affirmer le diagnostic de LA (à l'exception des LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes telles que les translocations $t(15:17)(q22;q21)$, $t(8:21)(q22;q22)$ ou l'inversion du chromosome 16 $inv16(p13.1;q22)$, qui définissent d'emblée la pathologie).

1.4.2. Morphologie des blastes

Pour pouvoir caractériser les blastes au niveau morphologique et cytochimique, la classification du groupe FAB, pour French-American-British, est utilisée. Dans cette classification, les LAM sont réparties en différents sous-types (LAM0 à LAM7), en fonction des cellules de la moelle osseuse auxquelles les blastes ressemblent le plus au niveau morphologique³.

Sous-type de LAM	Dénomination	Incidence
LAM0	LAM avec différenciation minime	2%
LAM1	LAM sans maturation	20%
LAM2	LAM avec maturation	30%
LAM3	LA promyélocytaire	10%
LAM4	Leucémie aiguë myélomonocytaire	15%
LAM4eo	Leucémie aiguë myélomonocytaire Avec éosinophiles dysplasiques	
LAM5	LA monoblastique	15%
LAM6	Erythroleucémie	5%
LAM7	LA mégacaryocytaire	2%

Tableau I. Classification FAB.

1.4.3. Cytochimie

L'étude cytochimique des cellules permet de rechercher un composant ou une enzyme particulière à une lignée ou à un stade de différenciation. Cette technique implique des colorations cytochimiques, incluant les marqueurs de la

myélopéroxydase (MPO) (**Figure 1**) et des estérases (butyrate estérase) (**Figure 2**). La positivité des MPO permet de différencier les LAM des LAL (Leucémies Aigues Lymphoblastiques). Ces réactions chimiques reposent sur l'activité enzymatique que les cellules possèdent⁴.

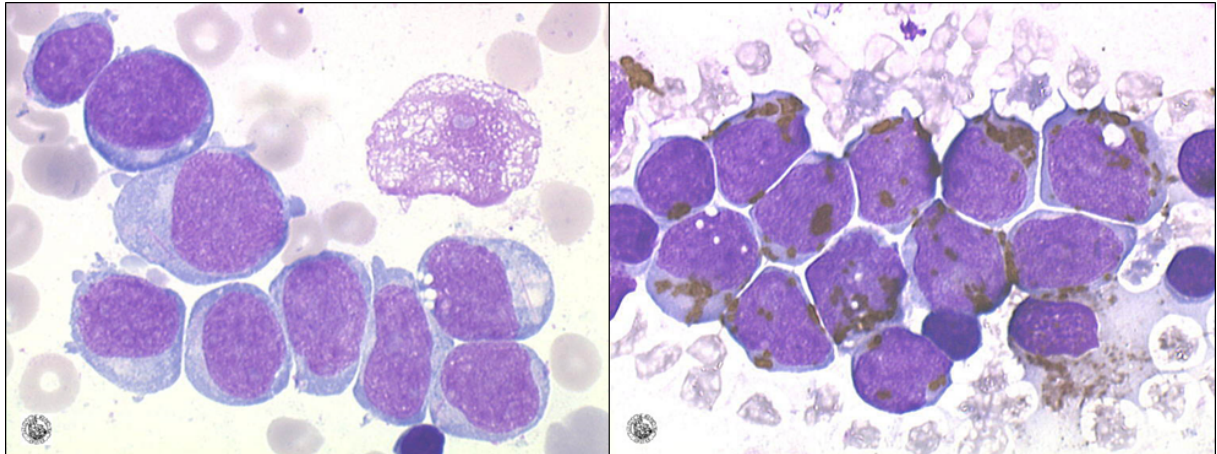


Figure 1. Blastes négatifs (gauche) et positifs (droite) pour la myélopéroxydase.

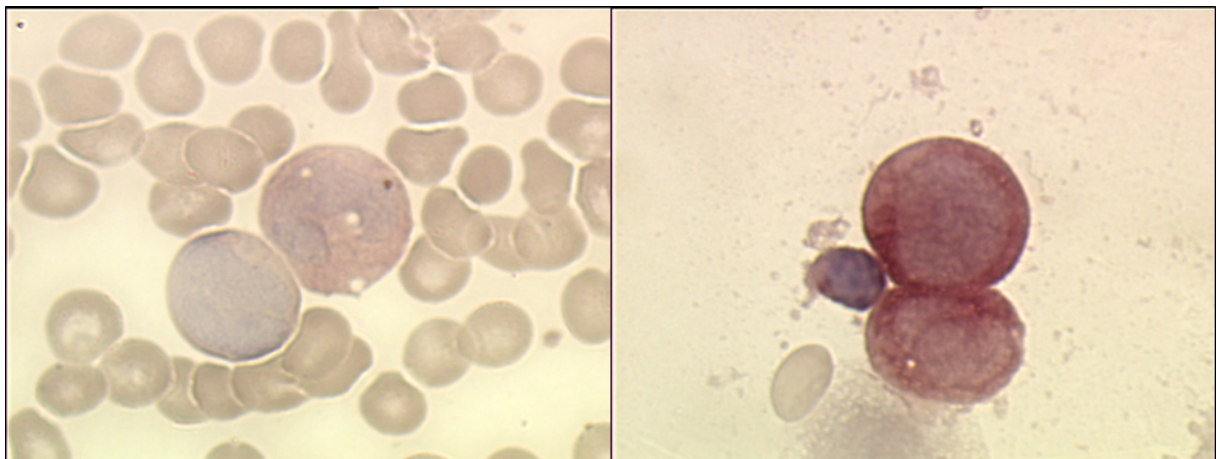


Figure 2. Monocytes et blastes négatifs (gauche) et positifs (droite) pour la butyrate estérase.

1.4.4. Immunophénotypage

L'immunophénotypage est nécessaire pour établir le diagnostic de LAM. Cet examen repose sur l'identification de marqueurs cellulaires de surface et cytoplasmiques des blastes, détectés par une technique de cytométrie en flux, qui vont confirmer le caractère myéloïde de la leucémie aigue. Les principaux antigènes recherchés et qui sont habituellement surexprimés dans les LAM sont le CD13, le CD33, le CD117 et la MPO⁵. Le tableau ci-dessous établit une liste des marqueurs cytoplasmiques et de surface utiles pour poser le diagnostic de LAM (**Tableau II**).

Expression of markers for diagnoses	
Diagnosis of acute myeloid leukemia (AML)*	
Precursor stage	CD34, CD38, CD117, CD133, HLA-DR
Granulocytic markers	CD13, CD15, CD16, CD33, CD65, cytoplasmic myeloperoxidase (cMPO)
Monocytic markers	Nonspecific esterase (NSE), CD11c, CD14, CD64, lysozyme, CD4, CD11b, CD36, NG2 homologue‡
Megakaryocytic markers	CD41 (glycoprotein IIb/IIIa), CD61 (glycoprotein IIIa), CD42 (glycoprotein 1b)
Erythroid marker	CD235a (glycophorin A)
Diagnosis of mixed phenotype acute leukemia (MPAL)†	
Myeloid lineage	MPO or evidence of monocytic differentiation (at least 2 of the following: NSE, CD11c, CD14, CD64, lysozyme)
B-lineage	CD19 (strong) with at least one of the following: CD79a, cCD22, CD10, or CD19 (weak) with at least 2 of the following: CD79a, cCD22, CD10
T-lineage	cCD3, or surface CD3

*For the diagnosis of AML, the table provides a list of selected markers rather than a mandatory marker panel.

†Requirements for assigning more than one lineage to a single blast population adopted from the WHO classification.³ Note that the requirement for assigning myeloid lineage in MPAL is more stringent than for establishing a diagnosis of AML. Note also that MPAL can be diagnosed if there are separate populations of lymphoid and myeloid blasts.

‡Most cases with 11q23 abnormalities express the NG2 homologue (encoded by *CSPG4*) reacting with the monoclonal antibody 7.1.

Tableau II. Expression des marqueurs cellulaires de surface et cytoplasmiques pour le diagnostic de LAM.

D'après Döhner *et al*, Blood, 2010.

1.4.5. Anomalies cytogénétiques

La recherche d'anomalies cytogénétiques et moléculaires est également indispensable au diagnostic. Approximativement, la moitié des LAM présente une ou plusieurs anomalies chromosomiques et l'autre moitié, dite à caryotype normale, est

cytogénétiquement normale, mais souvent caractérisée par une ou plusieurs mutations. Plusieurs entités sont définies par la classification des leucémies aiguës et néoplasmes myéloïdes, établie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), et révisée en 2016⁶ (**Tableau III**).

Parmi ces entités, on retrouve les LAM avec des anomalies cytogénétiques récurrentes, représentées par quatre anomalies majeures qui sont les translocations t(8;21), t(9;11), t(16;16) et t(15;17). La translocation t(8 ;21) implique le gène *RUNX1* (Runt-related transcription factor 1), qui code CBF α (Core Binding Factor alpha) et le gène *ETO* (Eight-Twenty-One). Les anomalies 11q23 (gène *MLL* (Mixed-Lineage Leukemia, renommé *KMT2A* pour lysine N-méthyltransférase 2A) sont le plus souvent associées à des leucémies à composantes monocytaires (du type LAM4 ou LAM5 de la classification FAB). Les LAM avec l'anomalie inv(16) ou t(16;16) sont couramment associées aux LAM4 avec éosinophiles anormaux (LAM4eo)⁷. La translocation t(15 ;17) est particulière, et aboutit à une protéine de fusion PML-RARA (Promyelocytic leukemia gene-Retinoic Acide Receptor Alpha). Ce type d'anomalie est retrouvé dans les LAM3, qui sont souvent associées à un phénomène de CIVD⁸. Les différentes anomalies regroupées dans cette entité confèrent le plus souvent un pronostic favorable aux patients.

Il existe également d'autres entités, dont celle des LAM avec modifications génétiques liées à la myélodysplasie. Cette entité regroupe notamment les LAM à caryotype complexe (c'est-à-dire, présentant trois anomalies ou plus), les LAM avec anomalies équilibrées, telles que les délétions 5q ou 7q, et les LAM avec anomalies non équilibrées⁹. Ces anomalies sont responsables d'un pronostic plus défavorable

pour les patients qui en sont porteurs. Il existe aussi les LAM avec modifications génétiques liées à la prise d'un traitement antérieur au diagnostic, ainsi que l'entité des LAM NOS (pour Not Otherwise Specified), qui comprend les LAM non définies par les anomalies citées précédemment. Ce sous-groupe reprend les entités identifiées dans la classification FAB.

Acute myeloid leukemia (AML) and related neoplasms

AML with recurrent genetic abnormalities
AML with t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
AML with inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
APL with <i>PML-RARA</i>
AML with t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i>
AML with t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>
AML with inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM</i>
AML (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15-MKL1</i>
<i>Provisional entity: AML with BCR-ABL1</i>
AML with mutated <i>NPM1</i>
AML with biallelic mutations of <i>CEBPA</i>
<i>Provisional entity: AML with mutated RUNX1</i>
AML with myelodysplasia-related changes
Therapy-related myeloid neoplasms
AML, NOS
AML with minimal differentiation
AML without maturation
AML with maturation
Acute myelomonocytic leukemia
Acute monoblastic/monocytic leukemia
Pure erythroid leukemia
Acute megakaryoblastic leukemia
Acute basophilic leukemia
Acute panmyelosis with myelofibrosis

Tableau III. Extrait de la classification de l'OMS 2016 listant les entités de LAM et leurs anomalies cytogénétiques associées. D'après Arber *et al*, Blood, 2016.

1.4.6. Anomalies moléculaires

L'apport de l'analyse cytogénétique dans la compréhension de la pathogénèse moléculaire a été considérable depuis de nombreuses années. Cependant, la moitié des LAM présente un caryotype normal au diagnostic. Grâce aux nouvelles techniques de séquençage telles que le NGS (Next-Generation Sequencing), des mutations récurrentes sur certains gènes ont pu être identifiées¹⁰. Les gènes les plus fréquemment mutés dans les LAM sont *FLT3* (Fms-Like Tyrosine kinase 3), *NPM1* (Nucleophosmin 1), *DNMT3A* (DNA Methyl-Transferase), *IDH* (Isocitrate Dehydrogenase), *TET2* (Ten Eleven Translocation 2), *CEBPA* (CCAAT Enhancer-Binding Protein Alpha) et *WT1* (Wilms Tumor 1). Lorsqu'ils sont mutés, ces gènes impactent plusieurs processus affectant la cellule, notamment les voies de signalisation, la méthylation de l'ADN, ou la différenciation cellulaire¹¹.

L'analyse du génome leucémique permet de déterminer des profils d'expression génique et des profils mutationnels qui permettent d'incrémenter les classifications des patients en fonction de leur statut moléculaire. Très souvent, ces gènes que nous avons cités précédemment ne sont pas touchés de façon isolée. En effet, il est très fréquent d'observer des mutations combinées, et notamment les associations *IDH/NPM1*, *IDH/FLT3*-ITD (Internal Tandem Duplications) ou encore *IDH/DNMT3A*¹². A l'inverse, il est aussi possible d'observer des mutations qui s'excluent, comme par exemple *IDH* et *TET2*^{13,14}. Cette hétérogénéité des mutations survenant dans les LAM à caryotype normal est très bien illustrée sur le schéma de Döhner ci-dessous (**Figure 3**).

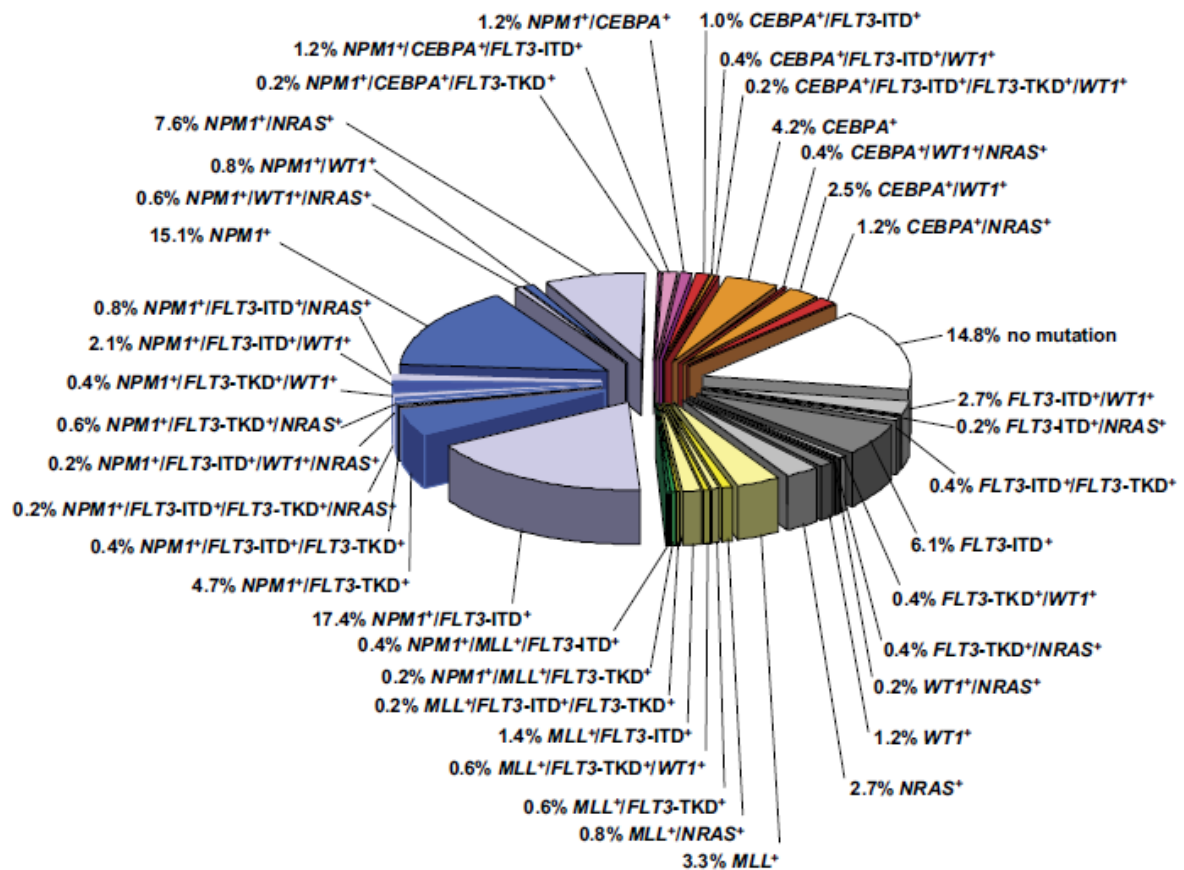


Figure 3. Hétérogénéité moléculaire des LAM à caryotype normal. D'après Döhner *et al*, Blood, 2010.

1.5. Facteurs pronostiques

Le pronostic des LAM est très péjoratif. La survie à 5 ans (en excluant les LAM de type 3) est d'environ 35 à 40% pour les patients de 60 ans et moins, et de 5 à 15% pour les patients de plus de 60 ans¹¹.

L'ajout des données issues des analyses cytogénétiques et moléculaires permettent de classer les LAM au sein de la classification OMS, qui permet de classer les patients dans des sous-groupes pronostiques : favorable, intermédiaire et défavorable. Ils vont déterminer les choix thérapeutiques, notamment la place de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) ou la mise en œuvre de

thérapies ciblées¹⁵. Des études récentes ont évalué l'implication de certains facteurs cliniques et génétiques dans la prédiction de la survie globale chez les patients. Ces facteurs pronostiques peuvent être subdivisés en deux groupes : ceux liés aux patients et ceux liés à la maladie. Les facteurs associés aux patients – tels que l'âge avancé, le statut immunitaire peu performant ou encore l'existence de comorbidités – prédisent couramment un décès précoce lié au traitement. Les facteurs associés à la maladie, comme par exemple le taux de leucocytes, les antécédents de syndrome myélodysplasique, les thérapies cytotoxiques utilisées pour traiter d'autres pathologies ou encore les anomalies génétiques des cellules leucémiques, prédisent la résistance à la chimiothérapie standard¹¹.

Les données issues de l'analyse génétique ont permis d'identifier plusieurs nouveaux facteurs pronostiques puissants. Par exemple, les anomalies touchant les gènes *FLT3*, *CEBPA* et *NPM1* améliorent la stratification pronostique des patients au diagnostic, et notamment des patients à caryotype normal. Les mutations touchant *FLT3*, et en particulier les mutations *FLT3*-ITD, sont associées à une moins bonne survie globale, contrairement à *NPM1* et *CEBPA* qui sont associées à une nette amélioration de la survie chez les patients¹⁶. Cependant, l'impact pronostique de ces marqueurs génétiques dépend du contexte, l'effet d'une anomalie donnée dépendant de la présence ou non d'une autre anomalie (**Tableau IV**). Par exemple la mutation *NPM1* est associée à un pronostic favorable seulement en l'absence de la mutation *FLT3*-ITD, ou en présence d'une mutation *FLT3*-ITD avec un faible ratio allélique¹⁵. Également, une LAM à caryotype normal avec *CEBPA* muté en l'absence de *FLT3*-ITD est identifiée comme présentant un risque pronostique similaire à celui des LAM avec des modifications cytogénétiques favorables¹⁷. A noter que la charge allélique

du gène muté peut également impacter la survie. Ainsi, ce sont les mutations bi-alléliques de *CEBPA* qui sont de bon pronostic.

Risk Category ^b	Genetic Abnormality
Favorable	t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> Mutated <i>NPM1</i> without <i>FLT3</i> -ITD or with <i>FLT3</i> -ITD ^{low(c)} Biallelic mutated <i>CEBPA</i>
Intermediate	Mutated <i>NPM1</i> and <i>FLT3</i> -ITD ^{high(c)} Wild type <i>NPM1</i> without <i>FLT3</i> -ITD or with <i>FLT3</i> -ITD ^{low(c)} (w/o adverse-risk genetic lesions) t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLL3-KMT2A</i> ^d Cytogenetic abnormalities not classified as favorable or adverse
Adverse	t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> rearranged t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM(EVI1)</i> -5 or del(5q); -7; -17/abn(17p) Complex karyotype, ^e monosomal karyotype ^f Wild type <i>NPM1</i> and <i>FLT3</i> -ITD ^{high(c)} Mutated <i>RUNX1</i> ^g Mutated <i>ASXL1</i> ^g Mutated <i>TP53</i> ^h

^a Frequencies, response rates and outcome measures should be reported by risk category, and, if sufficient numbers are available, by specific genetic lesions indicated.

^b Prognostic impact of a marker is treatment-dependent and may change with new therapies.

^c Low, low allelic ratio (<0.5); high, high allelic ratio (≥0.5); semi-quantitative assessment of *FLT3*-ITD allelic ratio (using DNA fragment analysis) is determined as ratio of the area under the curve (AUC) "*FLT3*-ITD" divided by AUC "*FLT3*-wild type"; recent studies indicate that acute myeloid leukemia with *NPM1* mutation and *FLT3*-ITD low allelic ratio may also have a more favorable prognosis and patients should not routinely be assigned to allogeneic hematopoietic-cell transplantation.^{57-59,77}

^d The presence of t(9;11)(p21.3;q23.3) takes precedence over rare, concurrent adverse-risk gene mutations.

^e Three or more unrelated chromosome abnormalities in the absence of one of the World Health Organization-designated recurring translocations or inversions, i.e., t(8;21), inv(16) or t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23.3), t(6;9), inv(3) or t(3;3); AML with *BCR-ABL1*.

^f Defined by the presence of one single monosomy (excluding loss of X or Y) in association with at least one additional monosomy or structural chromosome abnormality (excluding core-binding factor AML).¹¹⁶

^g These markers should not be used as an adverse prognostic marker if they co-occur with favorable-risk AML subtypes.

^h *TP53* mutations are significantly associated with AML with complex and monosomal karyotype.^{37,66-69}

Tableau IV. Stratification du risque basé sur la génétique. Recommandations de l'European LeukemiaNet (ELN) 2017. D'après Döhner *et al*, Blood, 2016.

1.6. Traitement

1.6.1. *Traitement standard*

L'approche générale concernant le traitement des LAM n'a pas fortement évolué depuis des dizaines d'années. Le traitement standard consiste à administrer une lourde chimiothérapie au patient, dans le but d'induire une rémission complète (RC) de la pathologie dans un premier temps, et aussi d'éviter les rechutes à plus long terme. La première phase du traitement est appelée phase d'induction. Avec trois jours d'anthracycline et sept jours de cytarabine (schéma communément appelé « 7+3 »), la RC est atteinte chez 60 à 80% des adultes de moins de 60 ans, et chez 40 à 60% des adultes plus âgés (60 ans et plus)¹³. Les critères de RC sont : un taux de polynucléaires neutrophiles > 1 G/L, un taux de plaquettes > 100 G/L et un pourcentage de blastes médullaires $< 5\%$. Cette approche est souvent proposée aux patients de pronostic intermédiaire à favorable, et présentant un faible risque de mortalité liée au traitement¹⁸. Une réponse favorable au traitement d'induction doit être suivie d'un traitement de consolidation afin d'éradiquer toute maladie résiduelle et d'obtenir une rémission durable en prévenant les rechutes⁹. Ce traitement de consolidation peut consister en une autre cure de chimiothérapie, ou alors en une greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques (CSH). La LAM est l'indication la plus fréquente de greffe de CSH, avec une augmentation de 10% de greffes réalisées par an dans le monde¹⁹. La décision de réaliser la greffe est prise en fonction du rapport bénéfice/risque pour le patient. De plus, ces greffes ne sont pas réalisées chez tous les patients. En effet, les patients classés comme ayant un pronostic défavorable selon l'ELN 2017 sont prioritaires, ainsi que les personnes

âgées de plus de 60 ans, et ceux présentant un plus fort risque de rechute, afin d'améliorer leurs chances de survie²⁰. Il est également important de souligner le fait que l'allogreffe de CSH est le seul traitement potentiellement curatif chez les patients n'ayant pas été en RC après la phase d'induction, c'est-à-dire, les patients réfractaires au traitement par chimiothérapie standard.

Il existe un cas particulier, celui de la LAM3, appelée aussi LA promyélocytaire, qui est éligible au traitement par thérapie ciblée^{21,22}. Comme mentionné précédemment, cette entité de LAM a la particularité d'être caractérisée par une translocation t(15 ;17), aboutissant à une protéine de fusion PML-RARA, conférant la sensibilité de cette LAM à un traitement par acide tout-trans-rétinoïque (ATRA), donnant d'excellents résultats en terme de rémission²³. Pour la plupart des autres types de leucémie, une telle thérapie à cible unique est vouée à l'échec principalement du fait de l'hétérogénéité génétique des cellules cancéreuses.

1.6.2. Nouveaux agents

Grâce à l'utilisation des nouvelles techniques de génomique, telle que le NGS, nous avons beaucoup de données qui mettent en lumière l'identification de nouvelles altérations géniques permettant le développement de nouveaux agents depuis quelques années dans le traitement des LAM.

Parmi ces nouvelles molécules, nous retrouvons tout d'abord les inhibiteurs de *FLT3*, représenté par la Midostaurine. Cette molécule est donc indiquée dans le traitement des LAM *de novo* avec mutation du gène *FLT3*, en association avec une

chimiothérapie standard²⁴. Dans cette catégorie d'inhibiteurs, d'autres molécules sont en cours de développement comme le Sorafénib²⁵ et le Crenolanib²⁶, et une molécule est disponible sur demande d'ATU nominative (Autorisation Temporaire d'Utilisation) ; il s'agit du Quizartinib²⁷.

Ensuite, des inhibiteurs d'*IDH1/2* sont également en cours de développement, à savoir l'Enasidenib²⁸, indiqué pour les patients présentant une mutation *IDH2* (disponible sur demande d'ATU) ; et l'Ivosidenib (AG120), dont la phase III randomisée de l'essai clinique est en cours, et dont les patients potentiels seront ceux mutés pour *IDH1* non éligibles à la chimiothérapie intensive²⁹.

De plus, un anticorps monoclonal a été développé, le Gemtuzumab Ozogamicine, et est indiqué, en association avec une chimiothérapie standard, dans le traitement des LAM d'expression positive du CD33 *de novo*³⁰. Il existe une autre molécule testée dans un essai clinique, le Flotetuzumab, dirigé contre le CD123, et visant les patients en rechute ou réfractaire au traitement standard³¹.

Enfin, de nouvelles thérapies cellulaires, les CAR-T cells (Chimeric Antigen Receptor), sont à l'étude depuis quelques années, utilisant des cellules T modifiées avec des récepteurs d'antigènes chimériques³². Plusieurs études sont en cours dans divers pays, mais il n'y a pas assez de recul sur ces nouvelles thérapies dans le traitement des LAM pour le moment.

1.7. Physiopathologie et leucémogénèse

1.7.1. *Facteurs prédisposants*

Il existe plusieurs types de facteurs prédisposant à cette pathologie. En premier lieu, les personnes exposées aux radiations ionisantes et cosmiques, ainsi que les personnes travaillant dans les industries nucléaires sont très concernées par un risque accru de développer une LAM. Également, l'exposition au benzène et au tabagisme chronique entraîne une forte incidence de cette pathologie dans la population. De plus, les LAM peuvent être secondaires à une chimiothérapie administrée des années auparavant, comme par exemple les traitements à base d'agents alkylants ou d'inhibiteurs des topoisomérases II tels que l'étoposide ou la doxorubicine. Enfin, la prédisposition génétique, de type trisomie 21 ou neurofibromatose, explique quelques cas de LAM chez l'enfant et l'adulte³³.

Cependant, dans la majorité des cas, la pathologie apparaît comme une pathologie maligne *de novo*, chez des individus auparavant sains. Quelle que soit son étiologie, la pathogenèse de la LAM implique la prolifération et la différenciation incontrôlées d'un clone de cellules souches myéloïdes⁹.

1.7.2. *Anomalies moléculaires*

Les approches par séquençage de nouvelle génération (NGS) ont permis de caractériser le « paysage » des anomalies génétiques présentes dans les LAM. Les chercheurs du projet « The Cancer Genome Atlas » ont identifié 23 gènes ayant une

prévalence de mutation bien plus élevée que prévue, incluant notamment les gènes importants et nécessaires à la pathogenèse des LAM (*DNMT3A*, *FLT3*, *NPM1*, *IDH* et *CEBPA*). Grâce au séquençage approfondi, la composition clonale de chaque échantillon tumoral a pu être définie. L'étude montre que plus de la moitié des tumeurs contenait à la fois un clone fondateur et au moins un sous-clone, allant même parfois jusqu'à trois sous-clones indépendants dans un échantillon¹⁰ (**Figure 4**). L'architecture clonale et l'ordre d'apparition des mutations peuvent être déduites par les fractions de l'allèle variant (VAF).

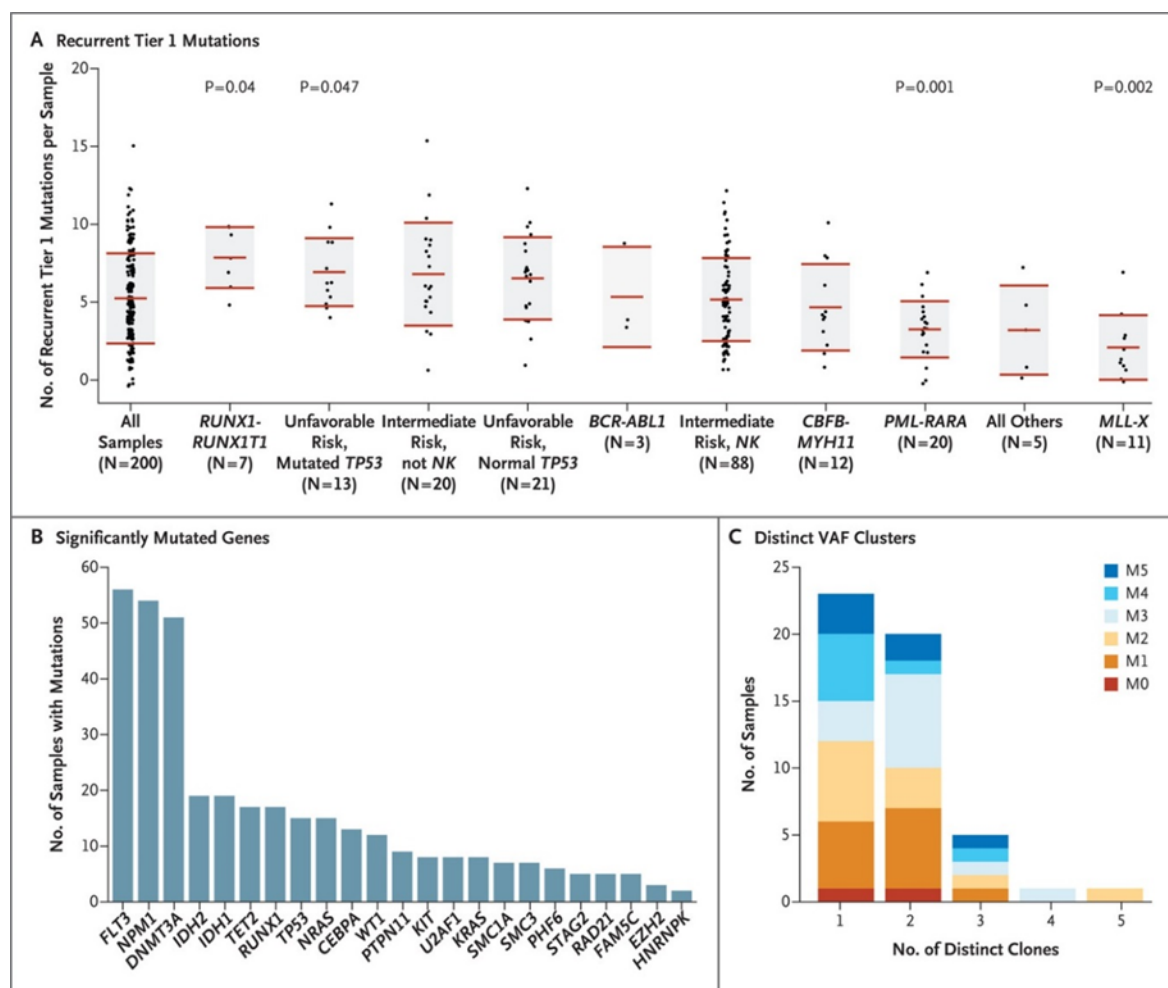


Figure 4. Caractérisation des mutations découvertes dans les LAM. D'après l'équipe de recherche du projet « *The Cancer Genome Atlas* », NEJM, 2013.

Une seule mutation sur un gène n'est pas suffisante pour induire un phénotype leucémique. Il existe plusieurs anomalies moléculaires qui participent au développement de la leucémogénèse, comme par exemple les mutations « loss-of-function » de *RUNX1*, ou bien les mutations du gène *CEBPA*³⁴. Il s'agit toujours d'une coopération entre plusieurs mutations qui peuvent entraîner et favoriser le développement de cellules leucémiques à partir de CSH normales. Parmi ces mutations, on en retrouve certaines qui surviennent à un stade très précoce de la leucémie, appelé état pré-leucémique. Il s'agit des mutations des gènes *DNMT3A*, *ASXL1* (Additional Sex combs Like 1) ou *TET2* par exemple¹¹. Des mutations secondaires affectant les facteurs de transcription apparaissent ensuite, tels que les gènes de fusion résultant des t(8 ;21), t(15 ;17) ou encore les mutations de *NPM1*, entraînant une perturbation du processus de différenciation cellulaire et une acquisition aberrante de propriétés d'auto-renouvellement cellulaire par les progéniteurs hématopoïétiques³⁴. Cette évolution clonale aboutit à la formation de cellules souches leucémiques (CSL) (**Figure 5**).

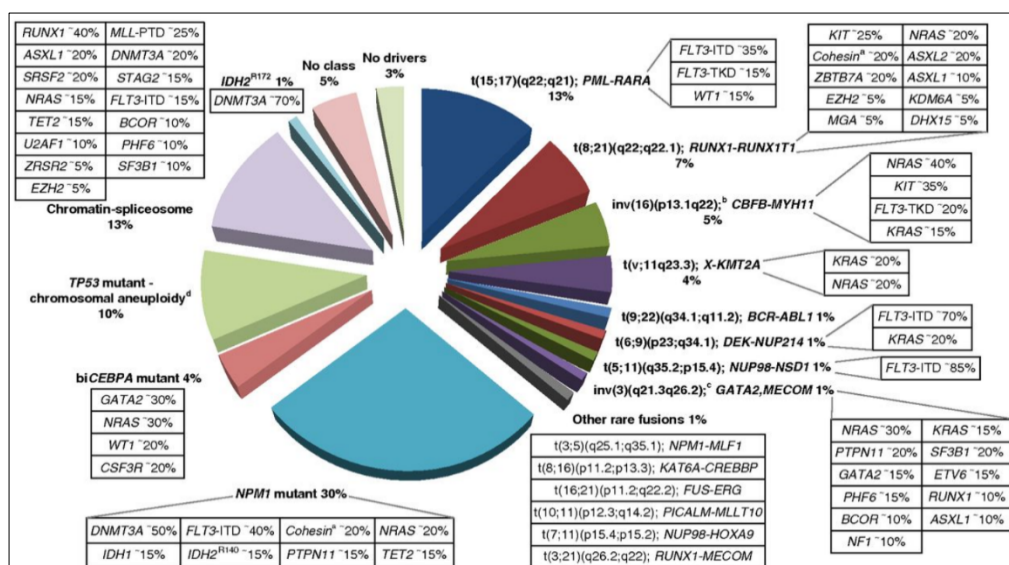


Figure 5. Distribution de sous-types de LAM définis au niveau cytogénétique et moléculaire. D'après Grimwade *et al*, Blood, 2016.

De plus, le NGS a permis de mettre en évidence l'existence de cellules souches dans un état pré-leucémique (CHIP : Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential). Ces cellules souches sont caractérisées par des mutations somatiques dans les gènes *driver* associés à la leucémie, conférant un avantage en termes de croissance ou de prolifération, et entraînant l'expansion d'un clone génétiquement identique des cellules de moelle osseuse et sanguines. Le terme « Indeterminate Potential » reflète comment l'hématopoïèse va progresser chez un individu³⁵. Les cellules souches portant des mutations de *DNMT3A* ont montré un avantage de repopulation sur plusieurs lignées par rapport aux cellules non mutées, établissant leur identité en tant que cellules souches pré-leucémiques. *DNMT3A* arrive précocement dans l'évolution de la LAM, conduisant à une expansion clonale du pool de cellules pré-leucémiques à partir duquel la LAM évolue³⁶. Ainsi, un modèle de leucémogénèse peut être défini, par acquisition séquentielle de mutations. Il existe une mutation initiatrice dans une CSH, qui va entraîner le développement de l'hématopoïèse pré-leucémique ; puis, une accumulation secondaire de mutations dans le clone pré-leucémique va transformer la LAM en maladie très proliférative³⁷.

1.7.3. Caractéristiques des cellules souches leucémiques

Les CSL sont au sommet de la hiérarchie cellulaire qui initie et maintient la maladie. Elles ont des propriétés d'auto-renouvellement et de quiescence du cycle cellulaire qui leur permettent de se maintenir dans l'environnement hématopoïétique³⁸. Les CSL présentent un phénotype de surface aberrant, caractérisé par les marqueurs CD34⁺/CD38⁻, qu'elles ont en commun avec les CSH, et par les marqueurs CD123⁺/CD117⁻/CD13⁺ qui les diffèrent de ces dernières. Toutes les CSL existent

dans une niche, qui les nourrit et influence le destin des cellules en aval. Les CSH interagissent avec un microenvironnement complexe multicellulaire de la moelle osseuse, qui les module et qui comprend à la fois la descendance des CSH et plusieurs types de cellules non hématopoïétiques. Il est devenu évident que les interactions bidirectionnelles entre les cellules leucémiques et leur niche jouent un rôle dans l'initiation et le développement des hémopathies malignes. Parmi les dérégulations de la niche observées dans les LAM, on peut citer par exemple les lésions vasculaires, une augmentation de l'angiogenèse ou encore la prolifération de cellules mésenchymateuses anormales³⁹. De plus, il existe des dérégulations des voies d'auto-renouvellement dans les CSL, dues notamment aux gènes *HOX* très souvent dérégulés dans les LAM. Enfin, elles peuvent stopper le processus d'apoptose, car elles sont fortement dépendantes de la voie de signalisation NF-κB (Nuclear Factor-κB), constitutivement active dans les LAM⁴⁰. Cette voie induit des signaux de croissance, de survie cellulaire et enfin d'invasion cellulaire au détriment du processus apoptotique.

1.7.4. Dérégulations fonctionnelles associées

Plusieurs fonctions cellulaires peuvent être dérégulées du fait de la présence de ces altérations moléculaires et ainsi influencer l'évolution clonale des CSL. Tout d'abord, les mutations survenant sur les gènes *FLT3*, *RAS* ou *KIT* par exemple, vont entraîner une activation des voies de transduction du signal cellulaire³⁴, conférant aux cellules porteuses de ces mutations un avantage prolifératif *via* l'activation anormale de ces voies de signalisation¹¹. Ensuite, les régulateurs de la différenciation cellulaire peuvent être réprimés par les gènes de fusion oncogéniques, tels que *PML-RARA* ou

encore *AML1-ETO*⁴⁰. Les mutations des gènes impliqués dans le contrôle épigénétique de l'expression des gènes, tels que *ASXL1*, *DNMT3A*, *IDH* ou encore *TET2*, vont entraîner des dérégulations de la structure de la chromatine (via des modifications chimiques des histones) ou des anomalies de la méthylation de l'ADN¹¹. Enfin, ces anomalies peuvent toucher le métabolisme cellulaire. L'exemple le plus décrit dans les LAM est les mutations *IDH1* et *IDH2*, qui conduisent à la production de 2-hydroxyglutarate (2-HG), au détriment de l' α -cétoglutarate (α -KG). Considéré comme un oncométabolite, le 2-HG va impacter les fonctions métaboliques de la cellule leucémique, favorisant sa prolifération au détriment de la différenciation hématopoïétique normale. De plus, l'expression des mutants *IDH* altère la fonction catalytique de *TET2* dans les cellules, entraînant une hyperméthylation de l'ADN qui perturbe la différenciation des cellules myéloïdes⁴¹. Neuf catégories fonctionnelles distinctes (**Figure 6**) associées à des fonctions biologiques ayant un rôle probable dans la physiopathologie des LAM ont pu ainsi être identifiées.

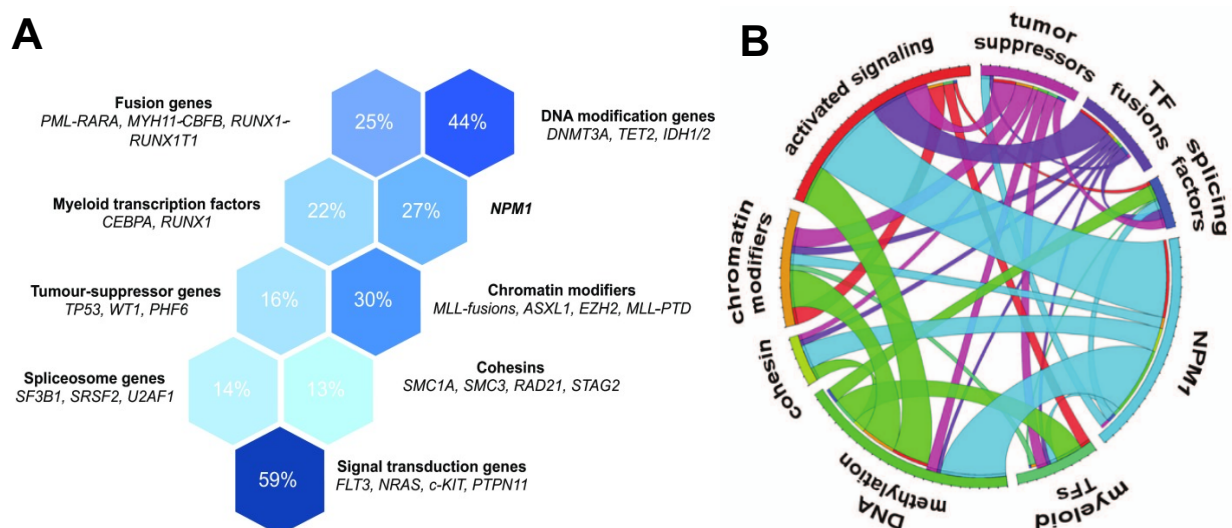


Figure 6. A. Voies fréquemment dérégulées dans les LAM ainsi que les gènes associés. D'après Grove *et al*, Disease models and mechanisms, 2014. **B.** Graphique de Circos montrant les co-occurrences entre les voies dérégulées. D'après Graubert *et al*, American Society of Clinical Oncology Educational Book, 2014.

2. Les dérégulations métaboliques

2.1. Dans les cancers

De façon générale, les cellules cancéreuses sont caractérisées par un phénomène de prolifération incontrôlée et rapide, indépendant des *stimuli* extérieurs. Dans le but d'approvisionner ces cellules en nutriments et en énergie nécessaire à leur croissance et à leur multiplication, plusieurs mécanismes sont mis en jeu. Nous allons décrire dans cette partie quels sont plus précisément ces mécanismes.

2.1.1. *L'effet Warburg*

Les cellules cancéreuses ont acquis des mécanismes qui leur permettent de reprogrammer leur métabolisme⁴². Parmi eux, le plus connu est l'effet Warburg, décrit dans les années 1920 par Otto Heinrich Warburg. En présence d'oxygène dans leur environnement, les cellules normales utilisent la phosphorylation oxydative *via* les mitochondries afin de produire de l'énergie nécessaire à leur développement. En l'absence d'oxygène, elles utilisent la glycolyse anaérobie pour maintenir leur prolifération. Quelles que soient les conditions d'oxygénation de l'environnement, les cellules cancéreuses utilisent préférentiellement la glycolyse aérobie, en consommant énormément de glucose qui sera converti en lactate, pour produire de l'énergie et entretenir la prolifération cancéreuse. Cette adaptation métabolique irréversible est appelée « Effet Warburg ». (**Figure 7**). La production de lactate survient partout dans l'environnement cellulaire, et est 10 à 100 fois plus rapide que l'oxydation du glucose.

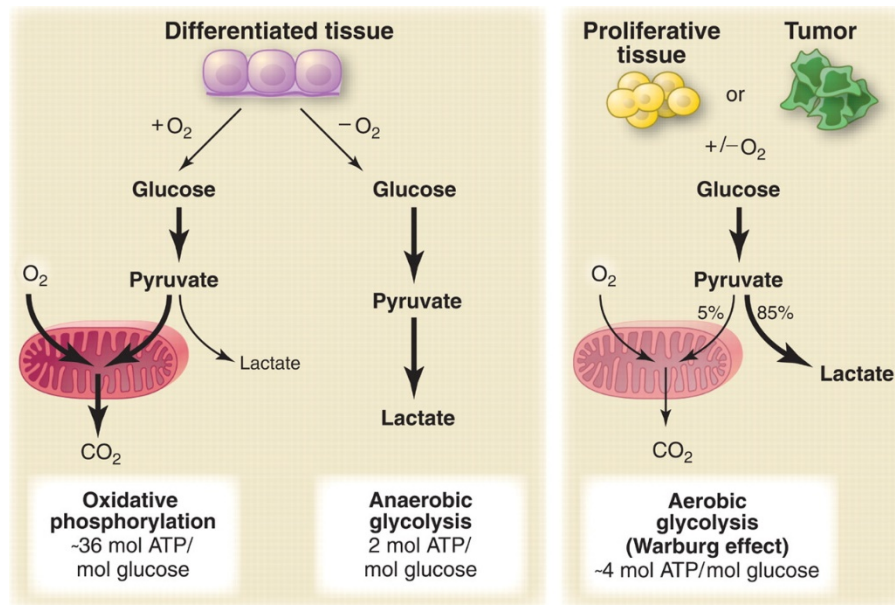


Figure 7. Principe de l'effet Warburg. D'après Vander Heiden *et al*, Science, 2009.

L'augmentation de la glycolyse et de la fermentation lactique, tout en diminuant simultanément l'oxydation mitochondriale, permet aux cellules d'équilibrer leurs besoins énergétiques et leur capacité à se diviser. Néanmoins, cette voie est moins efficace que la phosphorylation oxydative pour générer de l'ATP (Adénosine Triphosphate). Les cellules qui fonctionnent sous l'effet Warburg produisent environ 20 fois moins d'ATP par molécule de glucose consommée, que celles utilisant la respiration oxydative. Les cellules cancéreuses choisissent tout de même la glycolyse aérobie pour permettre le détournement des produits intermédiaires de la glycolyse vers les voies de biosynthèse permettant de générer des nucléotides, des lipides ou encore des acides aminés nécessaires à la croissance et à la division cellulaire⁴³. Ceci permet un apport rapide des constituants essentiels à la formation de futures cellules filles, et aussi une prolifération cellulaire plus efficace⁴⁴.

L'effet Warburg est considéré comme un évènement primaire dans l'oncogenèse. La reprogrammation métabolique sous cet effet est conduite par plusieurs oncogènes et suppresseurs de tumeurs. La voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR (Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt/mammalian Target Of Rapamycin) est particulièrement corrélée aux dérégulations métaboliques observées. La PI3K peut directement augmenter l'apport en glucose et le métabolisme *via* des mécanismes variés tels que l'augmentation de transporteurs de glucose dans la membrane plasmique et l'augmentation des activités enzymatiques de l'héxokinase (HK) et des phosphofructokinases (PFK). AKT régule la croissance cellulaire et la prolifération *via* la phosphorylation de nombreux effecteurs de transduction du signal ; et mTOR, *via* ses deux sous unités mTORC1 et mTORC2, régule positivement les synthèses protéique et lipidique ainsi que le métabolisme du glucose⁴³. La haute activité oncogénique d'AKT et mTOR dans les cellules tumorales va ensuite promouvoir l'expression de HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor), conduisant à une transcription persistante des enzymes qui contrôlent la glycolyse et la production de lactate. Enfin, il est décrit que différents oncogènes tels que *RAS* ou *MYC* peuvent réguler positivement l'effet Warburg, et donc promouvoir la glycolyse aérobie chez les cellules cancéreuses⁴⁵. Au niveau métabolique, l'augmentation de la consommation de glucose due à l'effet Warburg peut favoriser les réactions anaboliques dans la lipogenèse *de novo*. De plus, cet effet peut induire une modulation du signal cellulaire en faveur de la tumorigenèse *via* les espèces réactives de l'oxygène (ROS)⁴⁶.

2.1.2. Le métabolisme du glucose

L'entrée du glucose dans la cellule ainsi que son utilisation est régulée par des transporteurs tels que GLUT1 (Glucose Transporter)⁴³. Ce transporteur du glucose est largement décrit comme étant surexprimé dans les cancers⁴⁷ et ceci est fortement corrélé à un mauvais pronostic. Il est régulé par des voies métaboliques telles que HIF ou PI3K/AKT. Parmi les enzymes catalysant les diverses réactions de la glycolyse, plusieurs sont fortement régulées, et notamment l'HK, présente sous différentes isoformes. HK2 est régulée positivement dans les cancers, ce qui conduit au couplage de la glycolyse et de la phosphorylation oxydative en augmentant le flux de glucose dans d'autres voies métaboliques⁴³. D'autre part, la pyruvate kinase (PK) catalyse l'étape finale de la glycolyse. Parmi ses 4 isoformes, PKM2 est la forme dominante, prépondérante dans les cellules cancéreuses. Elle présente une activité catalytique plus faible que l'isoforme PKM1 mais l'élévation du flux glycolytique est bien associée à cette forme moins active⁴⁸. Cela crée une accumulation d'intermédiaires de la glycolyse pouvant être acheminés dans les voies de biosynthèse nécessaires à la prolifération cellulaire cancéreuse. Cette enzyme peut être considérée comme un biomarqueur potentiel de détection précoce des tumeurs⁴³.

De façon similaire à la voie glycolytique médiée par PKM2, certaines cellules tumorales peuvent réguler positivement l'absorption du glucose et renforcer la voie des pentoses phosphate (PPP) non oxydative *via* l'oncogène *KRAS*. En tant que voie alternative pour fournir aux cellules cancéreuses des précurseurs de biosynthèse de nucléotides, la PPP non oxydative augmente pour produire plus de ribose-5-

phosphate. Dans ce contexte, l'enzyme glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) joue un rôle essentiel dans l'équilibre de la biosynthèse des nucléotides *via* la PPP et de la production d'énergie *via* le cycle de Krebs⁴⁸.

Le glucose peut être stocké sous forme de glycogène dans les tumeurs, *via* l'activité de la glycogène synthase qui est inhibée à travers la phosphorylation de GSK3 (Glycogen Synthase Kinase-3). GSK3 a un rôle suppresseur et est inhibée par la voie de signalisation PI3K/AKT. La conséquence est que les cellules cancéreuses vont stocker le glycogène en quantité anormale, glycogène qui pourra être réutilisé par les cellules lorsque leur environnement sera appauvri en glucose⁴⁹.

La glycolyse continue lorsque l'oxygène est absent. L'absorption du glucose, ainsi que la production de lactate associée, sont augmentées dans les tumeurs indépendamment de l'hypoxie. La fermentation lactique permet la réduction du pyruvate en lactate *via* la Lactate déshydrogénase (LDH), ce qui représente un pourcentage plus élevé de glucose métabolisé dans les tumeurs. De plus, dans les cellules cancéreuses, l'expression de LDHA – une sous-unité de LDH – est augmentée et conduit à l'augmentation de la quantité de NAD⁺ produit, permettant à la glycolyse de continuer. D'autre part, le pyruvate produit par la glycolyse et non utilisé pour la production du lactate peut être décarboxylé par le complexe PDC (Pyruvate Dehydrogenase Complex), et converti en acétyl-coA, qui va alors entrer dans la mitochondrie et intégrer le cycle de Krebs⁴³. Ce PDC est régulé par l'enzyme PDK-1 (Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1), dont la surexpression dans les cancers est liée aux dérégulations des voies métaboliques AKT et HIF⁵⁰. De par l'action des

cellules cancéreuses, PDK-1 peut être continuellement surexprimée pour activer le PDC, qui contribue aux altérations glycolytiques décrites dans les cancers⁴³.

2.1.3. Le cycle de Krebs

Les réactions biochimiques dans le cycle de Krebs sont catalysées par un certain nombre d'enzymes. Des études récentes montrent que certaines de ces enzymes sont mutées ou dérégulées dans plusieurs types de cancers, entraînant des modifications métaboliques et épigénétiques caractéristiques, corrélées à la transformation et à la progression de la maladie⁵¹.

La famille des enzymes IDH comprend plusieurs isoformes qui transforment l'isocitrate en α -KG. Les mutations de l'*IDH* dans les cancers entraînent la conversion de l' α -KG en 2-HG, considéré alors comme un oncométabolite. Ce que l'on appelle « oncométabolite » est un métabolite dont l'abondance est augmentée dans les cellules cancéreuses, et dont l'implication est prouvée dans le développement de cellules malignes⁴². Ces mutations somatiques induisent un phénotype associant une hyperméthylation de l'ADN *via* la diminution de l'activité enzymatique de *TET2* (Ten-Eleven-Translocation 2)⁵² (**Figure 8**), ainsi qu'une dérégulation de la production de ROS et de l'équilibre redox, dus à une altération du ratio NADPH/NADP⁺⁵³. De plus, la présence de cet oncométabolite entraîne des modifications dans l'expression des gènes, ainsi que des dérégulations de HIF-1 α ⁵⁴.

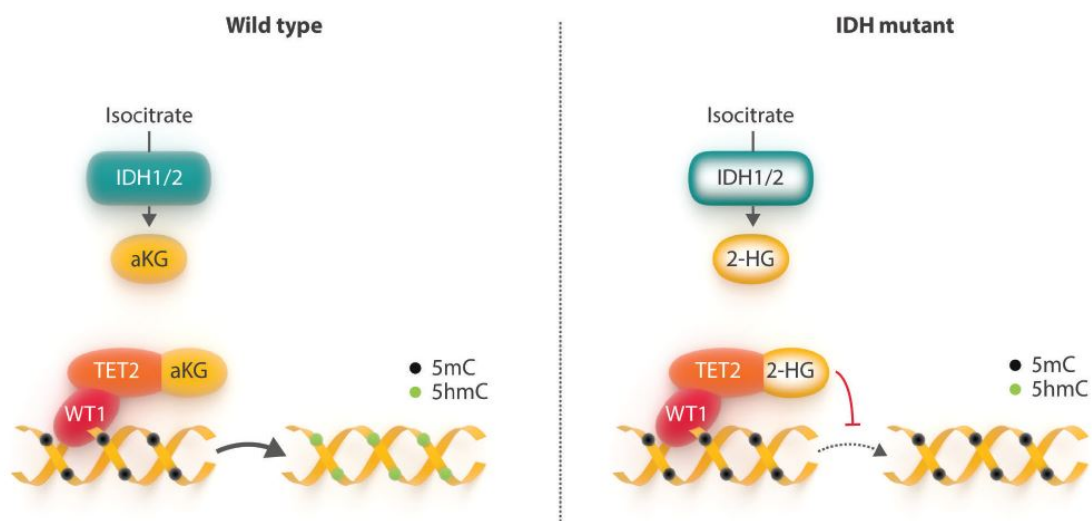


Figure 8. Effets des mutations *IDH*. D'après Rampal *et al*, Haematologica, 2016.

D'autre part, il y a deux autres enzymes du cycle de Krebs qui peuvent être mutées dans les cancers ; il s'agit de la SDH (Succinate Déshydrogénase) et de la FH (Fumarate Hydratase). Ces deux enzymes sont considérées comme des suppresseurs de tumeurs, l'une convertit le succinate en fumarate (SDH) et l'autre le fumarate en malate (FH). Lorsqu'elles sont mutées, elles deviennent inactives, et ne peuvent plus effectuer leur mission de conversion des métabolites. Il en résulte donc une accumulation de succinate et de fumarate dans la mitochondrie, qui vont agir comme des inhibiteurs compétitifs des HIF-1 α prolyl hydroxylases, et entraîner ainsi une stabilisation de HIF-1 α . Ceci aura pour conséquence d'activer la transcription de gènes tumoraux, conduisant à une hyperméthylation des histones et de l'ADN⁴³.

2.1.4. Le métabolisme de la glutamine

La glutamine est essentielle à la prolifération des cellules cancéreuses. Dans certains cancers, les cellules sont même caractérisées par une addiction à la

glutamine⁵⁵. Le flux de glutamine est régulé par SLC1A5 (Solute Carrier) – qui est le transporteur majeur de glutamine dans les cancers – et qui régule également l'activation de mTOR. Une concentration élevée de glutamine dans le milieu extracellulaire fournit l'énergie nécessaire à la croissance et à la survie des cellules cancéreuses⁴³.

L'oncogène *MYC* a été décrit comme capable d'augmenter le métabolisme de la glutamine, en régulant positivement l'expression de la glutaminase (GLS) qui conduit à une augmentation de la production de glutamate, entraînant *a fortiori* une augmentation de l' α -KG entrant dans le cycle de Krebs⁵⁶. Cela suggère donc que l'induction de *MYC* favorise la glutaminolyse dans les cancers⁵⁷.

Le métabolisme de la glutamine dans les cellules cancéreuses entraîne d'autres modifications. On retrouve une augmentation du stress oxydatif et des dysfonctions métaboliques, une potentialisation de l'effet Warburg, une réduction de l'activité du PDC – qui convertit le pyruvate en acétyl-coA –, une augmentation de l'activité de l'ATP citrate lyase (ACL) – qui conduit à une augmentation de la production d'acétyl-coA et par conséquent, de la synthèse d'acides gras – et enfin, une augmentation de l'activité de HIF-1 α , quelles que soient les conditions d'oxygénation⁵⁸.

De plus, la glutamine est impliquée dans la synthèse du glutathion (GSH), *via* l'association de trois acides aminés qui sont le glutamate, la cystéine et la glycine. Le GSH est fortement impliqué dans les dérégulations métaboliques survenant dans les cancers ; il joue notamment un rôle très important dans la progression du cancer, en induisant la prolifération et la survie des cellules cancéreuses. Son implication est

cruciale dans l'induction de la résistance des cellules cancéreuses aux différentes molécules utilisées pour traiter les cancers, en se liant à ces drogues, ainsi qu'en interagissant avec les ROS, et en participant aux processus de réparation de l'ADN⁵⁹. La glutaminolyse joue un rôle dans le maintien de l'équilibre redox, et fait donc partie intégrante de la survie des cellules cancéreuses.

2.1.5. Le métabolisme des lipides

Les acides gras (AG) sont essentiels à la prolifération des cellules cancéreuses. Ils jouent plusieurs rôles, et sont notamment impliqués dans la synthèse des membranes des cellules, dans la production et le stockage d'énergie, ainsi que dans la signalisation cellulaire⁴³. C'est pourquoi leur synthèse est régulée positivement dans les cancers⁶⁰. La FASN (Fatty Acid Synthase) facilite la synthèse des AG. C'est une enzyme métabolique clé qui catalyse l'étape finale de la synthèse des AG. Sa surexpression et son hyperactivité dans les cancers procurent un avantage de croissance et de survie pour les cellules cancéreuses. Cette enzyme peut donc fonctionner comme un intermédiaire métabolique de l'oncogenèse. Sa régulation est précoce dans les tumeurs, en réponse aux lésions pré-invasives du microenvironnement tumoral, tels que l'hypoxie, l'acidité élevée du milieu extracellulaire et le manque de nutriments. L'expression de la FASN est affectée par certains composants, notamment des facteurs de croissance *via* les voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR et MAPK (Mitogen-activated Protein Kinases).

Les cellules cancéreuses comptent sur la lipogenèse *de novo* pour produire les AG nécessaires à leur prolifération. Cette biogenèse est exacerbée dans les tumeurs,

quel que soit le taux de lipides circulants⁶¹. Cette voie débute avec l'acétyl-coA, produit par l'ACL pour donner du malonyl-coA *via* l'acétyl-coA carboxylase, qui est elle-même régulée par la voie des MAPK⁶². L'ACL est fortement surexprimée dans les cancers, et son niveau d'expression est corrélé avec le stade de différenciation tumoral, ainsi qu'à un pronostic plutôt défavorable⁶⁰. Il a été montré qu'une faible expression de l'ACL est associée à un pronostic favorable chez des patients atteints de LAM, et entraîne un arrêt de la croissance cellulaire lorsqu'elle est inhibée dans des modèles cellulaires leucémiques⁶³.

Lorsque les cellules n'utilisent pas la lipogenèse *de novo*, elles peuvent obtenir assez d'AG par leur environnement pour continuer leur croissance⁶⁴. En conditions d'hypoxie, la production d'acétyl-coA provenant de la glycolyse est supprimée, *via* la stimulation de l'expression de PDK1 qui se phosphoryle et inhibe le PDC. Cela nuit aux cellules qui ne peuvent donc plus produire d'acétyl-coA *via* la glycolyse, et rend alors la glutamine principale source d'acétyl-coA pour la synthèse des AG⁴³.

L'oxydation des AG (FAO pour Fatty Acid Oxydation) est requise pour la survie des cellules dans certains cancers. Cette oxydation augmente lorsque les besoins en énergie de la cellule augmentent (production d'ATP). Cette FAO repose sur une enzyme mitochondriale, la CPT1 (Carnitine Palmitoyltransférase 1), qui entraîne la production d'acétyl-coA qui va à nouveau entrer dans le cycle de Krebs et relancer un cycle de production de nouveaux lipides⁶⁵. Les taux élevés de CPT sont associés à l'agressivité du cancer⁶⁰. Son expression dans les cellules cancéreuses favorise la production d'ATP *via* la FAO, la croissance tumorale et l'échappement au stress métabolique. Enfin, la production de NADPH dérivée de la FAO par les cellules

cancéreuses est essentielle pour leur permettre de lutter contre le stress oxydatif. La disponibilité de NADPH est contrôlée par l'axe *LKB1/AMPK* (Liver Kinase B1), qui permet à la cellule tumorale de détecter un *stimulus* stressogène et de réagir en augmentant les réserves d'ATP et de NADPH⁶².

2.1.6. Le métabolisme des phospholipides

Le métabolisme de la choline a été décrit comme fortement altéré dans plusieurs types de cancers. Plus précisément, les Choline Kinases (CK), enzymes de dégradation de la choline en phosphocholine (PC) sont surexprimées, ce qui entraîne une augmentation des niveaux de PC, qui joue un rôle important dans la transformation des cellules ainsi que dans la prolifération cellulaire cancéreuse⁶⁶. Cependant, seule la CK alpha (CK α) joue un rôle central dans le maintien de la biosynthèse de PC requise pour la croissance incontrôlée de cellules cancéreuses. En plus de sa fonction métabolique, il a été prouvé que cette enzyme joue un rôle essentiel dans l'oncogenèse, la progression tumorale et la métastase dans plusieurs cancers, nécessaires à l'activation des voies de signalisation telle que PI3K/AKT, impliquant l'oncogène *RAS*⁶⁷. De plus, l'augmentation de l'activité des transporteurs de la choline conduit à une absorption facilitée de celle-ci, qui est aussi renforcée par sa phosphorylation rapide par les CK, dont l'activité est augmentée dans les cancers. Cela contribue à l'accumulation de la PC dans les cellules cancéreuses. On retrouve également une augmentation de PC dans les cellules hypoxiques, liée à l'induction des CK par HIF-1. Le microenvironnement tumoral joue aussi un rôle important, en affectant l'absorption et la phosphorylation de la choline, conférant un avantage de

survie aux cellules hypoxiques. La PC est considérée comme un métabolite oncogène soluble, doté de propriétés stimulant la croissance cellulaire⁶⁸.

D'autre part, le métabolisme de l'éthanolamine est décrit comme étant dérégulé dans les cancers, de façon similaire à celui de la choline. Des niveaux élevés de phosphoéthanolamine (PE) indiquent une prolifération cellulaire intense, souvent observée dans les cancers, accompagnée d'une augmentation de PC. Ceci est dû à la régulation négative d'une enzyme, la phosphoethanolamine citidylyltransferase, qui conduit à une signalisation et des fonctions membranaires perturbées, fréquemment décrites dans les cancers⁶⁹. Enfin, l'activation de mTORC1 induit une augmentation de l'activité de la lipine 1 et de la production de diacylglycérol, favorisant la synthèse de PC et de PE⁶⁸.

2.2. Dans les LAM

2.2.1. *Les dérégulations des espèces réactives de l'oxygène (ROS)*

Les ROS sont produits par le métabolisme cellulaire. Ils incluent l'anion superoxyde O_2^- , le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , les radicaux hydroxyls et le monoxyde d'azote NO. Ils peuvent être générés par le système de transport des électrons dans la mitochondrie et par les complexes NADPH Oxydase (NOX)⁷⁰. Ce sont des médiateurs chimiques dans l'hématopoïèse normale. Une augmentation des ROS peut conduire à des changements dans le phénotype des CSH⁷¹. L'hypoxie permet de réguler les NOX, ce qui préserve un taux de ROS bas et contribue à protéger les CSH contre le stress des ROS⁷². Le taux de ROS dans les CSH quiescentes est

également médié par FoxO (forkhead O)⁷³. Les cellules leucémiques, tout comme les CSH, produisent des ROS *via* les mitochondries ou les NO, et les ROS produits peuvent favoriser la prolifération des blastes⁷⁴. Les taux de radicaux oxygénés sont plus élevés dans les cellules malignes, tels que les blastes dans les LAM, par rapport aux leucocytes normaux. L'augmentation des niveaux basaux de ROS participent également à la transformation des cellules saines en cellules malignes, et aux dommages à l'ADN induits par différentes mutations, comme celles de l'ADN mitochondrial qui apparaissent souvent dans les tumeurs. Les ROS modulent aussi l'expression de protéines kinases, de facteurs de transcription et de leurs gènes associés, suggérant leur implication dans la leucémogénèse⁷⁵ *via* la dérégulation de ces voies.

AKT et *FLT3* sont activés de manière constitutive dans la majorité des LAM, ce qui suggère une inhibition de la fonction de FoxO et une augmentation des niveaux de ROS par rapport aux CSH normales⁷⁶, ainsi qu'une régulation de la survie des cellules leucémiques, associée à une résistance à la chimiothérapie⁷⁷. En effet, il semble que l'agressivité et le mauvais pronostic associés aux LAM mutées *FLT3*-ITD soient dus à l'augmentation des ROS endogènes – qui sont produits par la signalisation du facteur de transcription STAT5 (Signal transducer and activator of transcription 5) – et l'activation de RAC1, qui est un composant essentiel des NOX productrices de ROS⁷⁸.

Les blastes peuvent avoir une activité de phosphorylation oxydative très élevée, qui est associée à une chimiorésistance. Les cellules leucémiques chimiorésistantes ont des taux élevés de ROS et une masse mitochondriale haute⁷⁹, ce qui semble être lié

à un transfert d'organelle de la moelle osseuse vers les blastes, qui nécessite l'activité de NOX2 qui va stimuler la libération des mitochondries par les cellules stromales⁸⁰. Enfin, notre équipe a montré récemment que les patients atteints de LAM avaient un équilibre redox dérégulé lié à leur statut moléculaire, impliquant les cellules leucémiques, les cellules non tumorales et le système antioxydant, qui jouent un rôle majeur dans le pronostic des patients⁸¹.

2.2.2. Les dérégulations de l'isocitrate déshydrogénase

Un exemple très significatif du rôle oncogénique des régulations métaboliques est celui des mutations somatiques affectant l'*IDH* dans environ 15 à 20% des LAM⁸².

L'enzyme IDH est impliquée dans plusieurs processus. Elle joue un rôle crucial dans la modification du métabolisme énergétique de la cellule leucémique, en générant du 2-HG à partir de l' α -KG lorsque le gène est muté. En plus de cela, elle conduit à la consommation de NADPH, ce qui est critique pour plusieurs processus métaboliques dans les cellules, et notamment la synthèse de GSH⁸³. Puis, les cellules tumorales ont la capacité d'adapter leur métabolisme à l'hypoxie, *via* l'activation continue de HIF-1 sous des conditions normales d'oxygénation, à travers une variété de mécanismes tels que l'hyperactivation de mTORC1 ou l'accumulation de ROS, liés à la mutation *IDH*⁴³. De plus, les mutations *IDH* entraînent des modifications de l'ADN, et notamment des mutations faux-sens, entraînant un gain de fonction pour l'enzyme mutée⁸⁴.

L'enzyme IDH existe sous plusieurs isoformes. IDH1 est la forme cytoplasmique. Elle favorise l'activité de plusieurs doxygénases qui ont besoin d' α -KG en tant que co-substrat, la génération de NADPH, et la carboxylation de l' α -KG en isocitrate – qui lui-même favorise la génération de lipides après conversion en acétyl-coA. IDH2 est la forme mitochondriale ; elle régule la concentration d' α -KG et d'isocitrate dans la mitochondrie en utilisant le NAD^+ pour oxyder l'isocitrate en α -KG dans le cycle de Krebs⁸⁵. Enfin, il existe une troisième forme, IDH3, qui est NAD^+ dépendante et qui favorise la production d' α -KG requis pour la génération de succinate puis d'ATP¹².

Dans les LAM, les deux isoformes mutées sont IDH1 et IDH2. Elles entraînent toutes les deux des niveaux élevés de 2-HG dans les cellules tumorales, et les deux sont critiques pour la prolifération cancéreuse⁸⁶. Il faut préciser que la mutation n'entraîne pas de modification de la concentration d' α -KG dans le sérum, ni des autres intermédiaires du cycle de Krebs tels que le succinate, le malate ou le fumarate. Il n'a pas été observé de différences de concentrations de ces métabolites entre des échantillons de patients mutés et non mutés pour *IDH*. De plus, le 2-HG est le seul produit de la réaction de transformation de l' α -KG par IDH⁸⁷. Ces informations sont cohérentes avec celles décrites dans les gliomes, très bien connus également pour leur mutation de l'isocitrate déshydrogénase⁸³. De façon intéressante, l'importance de la dérégulation métabolique objectivée par la mesure de la quantité d'oncométabolite produit par les cellules tumorales est corrélée au pronostic de la maladie.

2.2.3. Les dérégulations du métabolisme du glucose

Dans les LAM, une consommation très intense de glucose et une très forte absorption de ce métabolite dans la moelle osseuse ont été largement décrites. Les cellules leucémiques peuvent compenser des niveaux trop faibles en glucose en régulant positivement le gène *SLC2A5*, qui code pour GLUT5 (qui est un transporteur du fructose). Les cas de LAM présentant des niveaux élevés de GLUT5 sont associés à un mauvais pronostic. De plus, ces cellules manipulent plusieurs tissus hôtes afin de garantir des concentrations en glucose élevées dans la moelle osseuse, et ceci implique notamment de provoquer une augmentation de l'insulinorésistance et une inhibition de la sécrétion d'insuline par les tissus⁸⁵.

La signalisation de mTOR est fréquemment activée dans les LAM. Cette voie de signalisation est impliquée dans le contrôle du métabolisme des cellules cancéreuses, en altérant l'expression de plusieurs enzymes métaboliques⁸⁸. La sérine/thréonine kinase mTORC1 est suractivée dans les LAM, ce qui favorise la glycolyse, et l'addiction des cellules au glucose. L'inhibition de cette voie de signalisation dans les LAM engendre une reprogrammation métabolique, impliquant notamment la G6PD (Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase), qui constitue une source importante de NADPH¹². Par ailleurs, la surexpression de G6PD est fortement corrélée à un pronostic défavorable chez les patients atteints de LAM⁸⁹. De même, la PPP est une voie importante de survie des cellules cancéreuses dans les LAM, et elle dépend fortement de l'activité de mTORC1. D'ailleurs, les gènes de cette voie sont fortement uprégulés dans plus de 60% des cas de LAM⁸⁵.

D'autre part, la MAP kinase, qui est également une sérine/thréonine kinase, favorise l'utilisation du glucose et la glycolyse par les cellules leucémiques. Sa délétion engendre une inhibition de la leucémogénèse et des cellules souches leucémiques, en réduisant l'expression de GLUT1. Ceci conduit à diminuer le flux de glucose et à induire un stress oxydatif dans le microenvironnement médullaire hypoglycémique⁹⁰.

Depuis quelques années, une signature du métabolisme du glucose a été décrite dans les LAM. En effet, un panel de six métabolites impliqués dans la glycolyse (glycérol-3-phosphate, pyruvate, lactate) et dans le cycle de Krebs (citrate, α -KG, 2-HG) ont été identifiés comme ayant une valeur pronostique dans les LAM à caryotype normal, entraînant préférentiellement un pronostic plus défavorable, qui se traduit notamment par une diminution de la sensibilité au traitement par aracytine⁹¹. Enfin, des taux élevés de LDH sériques au diagnostic sont des marqueurs pronostiques fortement négatifs dans les LAM⁸⁵.

2.2.4. Les dérégulations du métabolisme de la glutamine

Les cellules souches leucémiques ont une capacité d'absorption accrue des acides aminés, et en particulier de la glutamine. Elles en dépendent pour leur survie et leur prolifération⁹². Ceci est reflété par le fait que les concentrations plasmatiques de glutamine chez les patients atteints de LAM sont beaucoup plus faibles que celles retrouvées chez des individus sains.

La glutamine est particulièrement impliquée dans la reprogrammation métabolique. Les cellules leucémiques utilisent la glutamine comme source de carbone pour la

production d'énergie *via* le cycle de Krebs et l'homéostasie redox. En effet, la glutamine est un métabolite important pour la synthèse du GSH, faisant de son utilisation un élément essentiel du contrôle de l'équilibre redox dans les LAM. De plus, la GLS est retrouvée comme étant fortement exprimée dans les LAM, ce qui en fait un facteur limitant de l'activité du cycle de Krebs. Le lien entre la glutaminolyse et l'activité du cycle de Krebs apparaît comme essentiel dans la survie des cellules leucémiques⁸⁵.

Les cellules développent alors une addiction à la glutamine⁹³. La glutamine est une source d' α -KG converti en 2-HG par les mutants IDH⁸³. Le niveau de glutamine dans la cellule leucémique contrôle la phosphorylation oxydative dans la mitochondrie⁹³. Beaucoup d'études ont montré que le fait de cibler la glutaminolyse dans les LAM représente une bonne stratégie pour développer de nouveaux agents thérapeutiques agissant sur cette voie. C'est le cas en particulier dans les LAM mutées *FLT3*-ITD, qui sont très dépendantes de la glutamine pour faire fonctionner le métabolisme énergétique^{92,94}. Le ciblage de l'absorption de la glutamine entraîne des réponses anti-leucémiques efficaces dans les LAM, qui pourraient être liées à l'implication de la voie mTORC1 en aval de cette dépendance des cellules à la glutamine⁹⁵.

2.2.5. Les dérégulations du métabolisme lipidique

L'absorption et la consommation d'AG impacte des aspects importants dans la biologie des LAM, en influençant les destins cellulaires des CSL, leur adaptation au microenvironnement et leur résistance aux drogues⁸⁵. Les acides gras libres sont régulés de façon négative dans les LAM, ce qui indique une augmentation de la

consommation d'AG pour la synthèse des lipides par les cellules leucémiques⁹¹. De plus, mTOR favorise la synthèse des acides gras et des lipides⁸⁸. L'implication des MAP kinases est également liée à ce phénomène, puisqu'elles favorisent l'oxydation des acides gras (FAO), et leur activation inhibe la biosynthèse des AG induite par mTORC1¹².

D'autre part, CPT1A, une sous-unité de l'enzyme mitochondriale sur laquelle repose la FAO, a été retrouvé surexprimée dans des échantillons de moelle osseuse de patients atteints de LAM par rapport à des moelles osseuses normales. Ceci est fortement associé à un pronostic défavorable⁹⁶. La FAO peut contribuer à un mécanisme favorisant la résistance aux thérapies. En effet, les cellules de LAM résistantes montrent une surexpression de CD36 – un transporteur d'AG – à leur membrane, et une FAO très intense. Le NADPH dérivé de la FAO peut être un donneur d'électrons décisif pour les cellules leucémiques sous thérapie, qui leur permet ensuite de combattre le stress oxydatif, et qui peut servir aux processus anaboliques nécessaires à la division cellulaire⁸⁵.

Enfin, un nouvel élément, PHD3 (Prolyl Hydroxylase Domain 3), a été découvert comme pouvant être intéressant dans le métabolisme des LAM. Il fait partie d'une classe d'enzymes capables de coordonner le métabolisme en réponse à des conditions cellulaires changeantes. La fonction normale de PHD3 est de réprimer l'activité de FAO dans des conditions d'abondance nutritive dans le milieu cellulaire. Cependant, il a été montré que dans les LAM, cette enzyme est présente à un seuil beaucoup plus faible, ce qui entraîne une persistance de la FAO indépendamment

des conditions nutritives extérieures. Ceci pourrait faire de PHD3 un très bon biomarqueur des LAM⁹⁷.

2.2.6. Les dérégulations du métabolisme des phospholipides

Très peu d'informations sont disponibles concernant les liens potentiels entre les dérégulations de certains métabolites impliqués dans le métabolisme des phospholipides et la leucémogénèse. Une équipe a récemment fait un état des lieux du lipidome dans des plasmas de patients atteints de LAM, et montre une diminution des acides gras totaux libres, dont la phosphocholine, qui serait probablement due à une oxydation accrue des AG dans les cellules de LAM. Ceci aurait un impact sur le pronostic, qui s'orienterait plutôt de manière défavorable⁹⁸.

Également, Wang *et al* ont montré des niveaux plus faibles de PC dans les sérums de patients atteints de LAM, probablement en lien avec les besoins excessifs de ce métabolite pour la prolifération des cellules leucémiques. De façon intéressante, ils ont également observé que ce métabolite était exprimé à un plus haut niveau dans les sérums de patients de pronostic intermédiaire par rapport aux patients de pronostic favorable. Ceci plaide en faveur d'un impact défavorable de la PC sur le pronostic⁹⁹.

3. L'étude du métabolisme par une approche métabolomique

3.1. Contexte

Malgré les progrès considérables dans la compréhension des bases moléculaires des LAM, nous avons besoin d'aller plus loin dans la caractérisation des cellules leucémiques pour mieux définir le pronostic des patients au diagnostic et pour développer des nouvelles stratégies thérapeutiques adaptées à chaque patient. Dans un contexte de métabolisme dérégulé chez les cellules leucémiques, nous avons utilisé une approche métabolomique non ciblée dans le but de rechercher des métabolites discriminants dans les LAM *de novo* de l'adulte, au moment du diagnostic. Pour étudier les changements métaboliques associés aux patients atteints de LAM, nous avons effectué une étude prospective des profils métaboliques chez les patients.

3.2. La métabolomique

La métabolomique est l'exploration globale de tous les métabolites détectables dans un échantillon biologique, c'est à dire, les petites molécules avec un poids moléculaire inférieur à 1000 Daltons¹⁰⁰. Ceci inclut spécifiquement les peptides, oligonucléotides, acides organiques, acides aminés, lipides et xénobiotiques. Le métabolome représente tous les métabolites dans un organisme biologique, qui sont les produits finaux de son expression génique. Ainsi, la métabolomique donne un aperçu instantané de toutes les cascades des événements moléculaires survenant dans les cellules, appelé « empreinte métabolique » ou « profil métabolique »¹⁰¹.

Cette approche innovante est très puissante pour la classification et le diagnostic, et pour la découverte de biomarqueurs¹⁰². Elle a été employée dans la caractérisation de phénotypes métaboliques (métabotypes) d'une variété de cancers comme les cancers du cerveau, de la prostate ou du foie¹⁰³.

3.3. Techniques d'analyse

Deux méthodes sont décrites dans l'analyse haute résolution du métabolome : la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et la Spectrométrie de Masse (SM). Nous avons décidé d'utiliser la RMN du proton (^1H) qui est la technique la plus sensible, la plus rapide (quelques minutes d'acquisition) et la plus facile à mettre en œuvre. De plus, cette méthode est non destructive, très reproductible et permet de faire une analyse semi-quantitative des métabolites retrouvés dans les échantillons. Il existe néanmoins quelques limites à cette technique, notamment le fait qu'elle est beaucoup moins sensible que la SM, et qu'il est nécessaire d'ajouter des solvants deutérés dans les échantillons afin d'éliminer le pic de l'eau présent dans l'échantillon. Nous avons couplé cette technique à une méthode HRMAS (High Resolution Magic Angle Spinning), qui permet d'analyser directement les échantillons sans étape préalable d'extraction chimique des métabolites¹⁰⁴, tout en conservant une bonne qualité de spectre. Cette méthode est particulièrement adaptée à l'analyse d'échantillons semi-solides tels que les cellules de patients, et elle nous permet d'être très proche des conditions *in vivo*.

3.4. La métabolomique basée sur la RMN HRMAS

La RMN est une méthode biophysique non destructive qui sonde la matière au niveau atomique, permettant l'extraction d'informations structurales : elle décrit comment les atomes sont liés entre eux, avec ou sans liaisons covalentes. La RMN est basée sur la mécanique quantique, dont nous allons présenter ici les principes basiques pour comprendre la métabolomique. La RMN est basée sur l'interaction de deux champs magnétiques avec la matière. Certains noyaux atomiques ont une propriété spécifique : le spin nucléaire. C'est le cas du proton ^1H , du phosphore ^{31}P et du carbone ^{13}C , tandis que le carbone ^{12}C n'a pas de spin nucléaire. A ce spin nucléaire est associé un moment magnétique, qui peut être comparé à un petit aimant. Sans champ magnétique, les spins nucléaires sont dispersés de façon isotrope dans l'espace. Lors de l'application d'un champ magnétique externe intense (appelé usuellement B_0), les spins s'alignent de façon parallèle ou antiparallèle à ce champ. Il en résulte une nette magnétisation macroscopique M_0 , alignée parallèlement à B_0 : c'est la position d'équilibre (**Figure 9A**). Avec l'application d'un second champ magnétique, de plus faible intensité (appelé B_1), appliqué perpendiculairement au premier champ, les spins sont excités ; c'est à dire que la magnétisation est déplacée de sa position d'équilibre (**Figure 9B**). Quand l'excitation est stoppée – elle dure quelques microsecondes –, les spins retournent à leur état d'équilibre : c'est la relaxation. Grâce à une bobine, nous pouvons détecter le signal électromagnétique émis par les spins pendant la relaxation. Le signal est amplifié et transmis au système informatique, et la transformée de Fourier est appliquée pour convertir le signal de temps – appelé FID pour Free Induction Decay – en domaine de fréquence, c'est à dire pour obtenir un spectre (**Figure 9C**)¹⁰⁵.

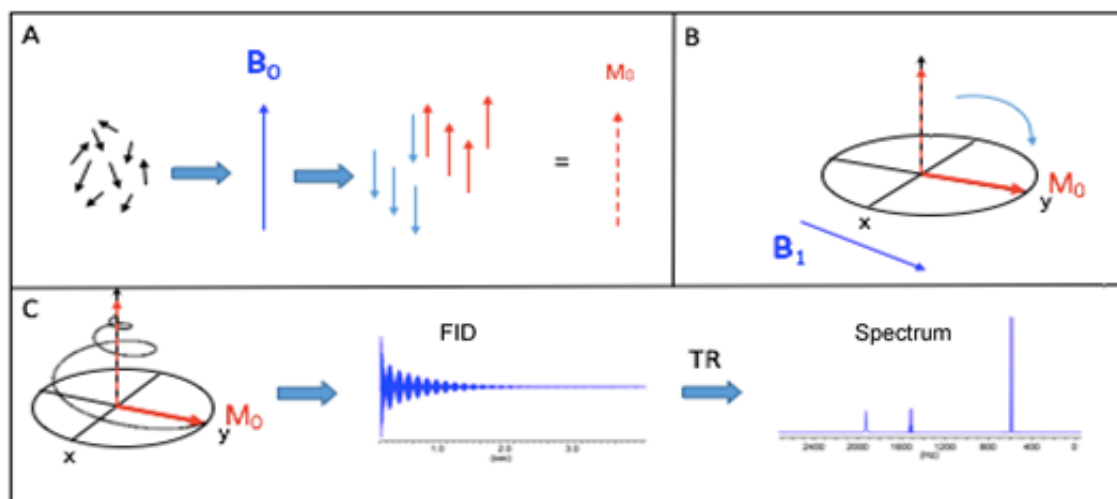


Figure 9. **A.** Principe d'une expérience RMN. Alignement des spins nucléaires dans le champ magnétique B_0 . **B.** Application du champ magnétique B_1 perpendiculaire à B_0 : perturbation de l'équilibre. **C.** Retour à l'équilibre, signal de temps et spectre.

La RMN haute résolution est la RMN des échantillons liquides. Les échantillons non liquides ou hétérogènes, comme les cellules et les biopsies (**Figure 10A**), donnent des spectres de mauvaise résolution en RMN du proton, puisque certaines interactions magnétiques entre les spins ne sont pas moyennées par le mouvement des molécules, comme dans les liquides homogènes. Ceci crée de larges pics qui ne sont pas adaptés pour la métabolomique (**Figure 10B**). Une solution est d'extraire les métabolites des échantillons en utilisant des solvants organiques. Une autre alternative est l'utilisation d'une méthode récente : la RMN HRMAS, dédiée aux échantillons non liquides, et qui permet d'obtenir des spectres de haute résolution sans extraire les métabolites, et donc d'éviter cette longue étape. Dans cette méthode, l'échantillon est incliné d'un angle de $54,7^\circ$ – que l'on appelle « l'angle magique » –, relatif à B_0 (**Figure 10C**) et il tourne à haute vitesse (autour de 4 KHz). Il en résulte l'annulation des interactions responsables de l'élargissement, restituant la résolution (**Figure 10D**). Ainsi, les petits échantillons tels que les biopsies (≤ 15

mg), les cellules, les organelles ou les petits organismes peuvent être analysés directement dans des petits inserts (**Figure 10E**), sans aucune préparation¹⁰⁴. Pour assigner proprement les métabolites aux pics, nous pouvons utiliser HMDB (Human Metabolome Database ; <http://www.hmdb.ca/>), qui est une base de données qui référence les métabolites.

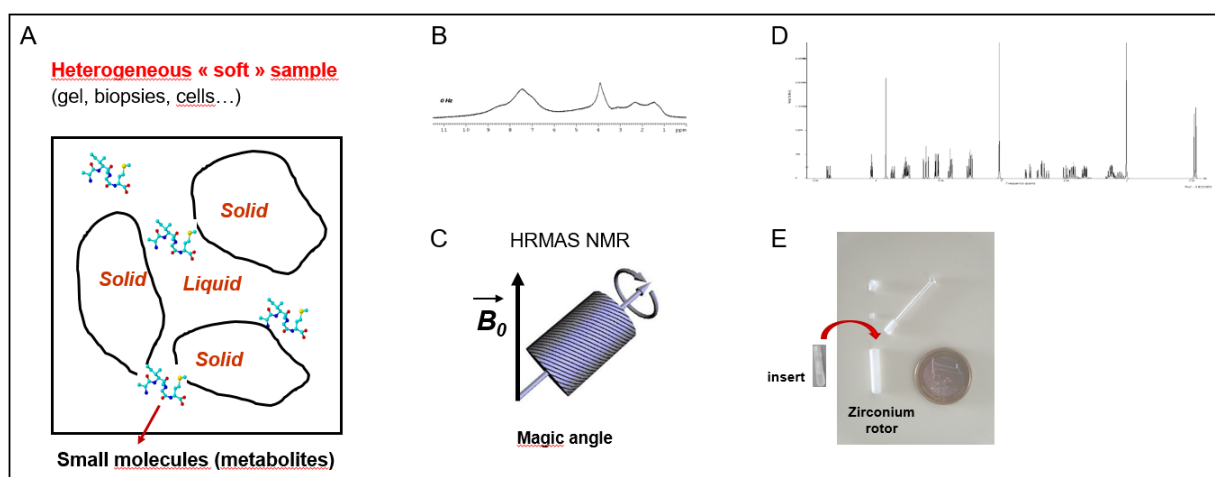


Figure 10. Méthode de RMN HRMAS.

3.5. Principe général d'un protocole de métabolomique

Un protocole pour une étude métabolomique inclut plusieurs étapes : l'expérimentation, le passage de l'échantillon, la collection des données (étape analytique) et le traitement des données. Toutes ces étapes doivent être très reproductibles. Pour collecter les données, des méthodes analytiques de haute résolution sont nécessaires. La spectroscopie RMN et la spectrométrie de masse sont principalement utilisées¹⁰⁶. Par rapport à la SM, la RMN a de grands avantages d'être intrinsèquement quantitative et très reproductible. Très peu d'étapes de préparation sont nécessaires, et la méthode est non destructive, permettant de se

rapprocher au plus près des conditions physiologiques initiales, et de réutiliser l'échantillon¹⁰⁰.

Pour passer du métabolisme à la métabolomique, c'est à dire pour passer d'une approche séquentielle classique à une nouvelle approche globale, où tous les métabolites sont intégrés simultanément, des outils statistiques spécifiques sont nécessaires. Pour cela, des analyses statistiques multivariées comme l'Analyse en Composantes Principales (ACP) et l'Orthogonal Projection to Latent Structure with Discriminant Analysis (OPLS-DA) sont principalement utilisées pour trouver des clusters dans les échantillons et pour souligner les métabolites les plus importants, qui sont les plus discriminants entre deux populations.

3.6. Traitement des données collectées

Le but d'une étude métabolomique est de trouver des profils métaboliques, ou une empreinte métabolique, qui est caractéristique d'un état donné par rapport à un autre état (pathologique *versus* contrôle sain par exemple). Certains métabolites apparaissent comme les plus discriminants dans le profil métabolique : ce sont les biomarqueurs recherchés. Cette approche nécessite un traitement global des données. La stratégie est de chercher des clusters dans les échantillons, *via* des méthodes graphiques de projection : nous voulons représenter les individus dans l'espace avec les métabolites comme coordonnées. Chaque point représente un individu. Toutefois, ceci ce n'est pas faisable car il y a plus de 3 métabolites à intégrer ; nous devons donc compresser les données.

Pour cela, nous utilisons une méthode de statistiques multivariées : l'ACP. Cette méthode construit les composantes principales, à l'aide de combinaisons linéaires des variables initiales, et permet de perdre le moins d'information possible. Nous obtenons une réduction du nombre de variables, ce qui explique la variance du système. Le nombre de composantes principales est largement plus petit que le nombre de métabolites. Les échantillons sont représentés dans un plan relatif aux deux premières composantes – ce plan est appelé « Score plot » –, pour vérifier la qualité des données, trouver des clusters ou détecter des « outliers ». C'est une méthode non supervisée, c'est à dire qu'aucune connaissance préliminaire n'est requise. Dans un second temps, nous faisons une analyse supervisée, c'est à dire que chaque échantillon est étiqueté avec sa classe lui appartenant. Pour cela, nous utilisons l'OPLS-DA. Comme pour l'ACP, les composantes principales sont construites, mais sont également ajoutées une maximisation de la variance intergroupe et une minimisation de la variance intragroupe. Cette méthode est bien adaptée pour la classification et la prédiction. Le score plot est tracé, comme dans l'ACP. Simultanément, le graphique des variables expliquant les clusters d'individus – appelé le « Loading plot » –, est représenté dans un plan dans le but de trouver les métabolites les plus discriminants. Une représentation spécifique est construite pour les données provenant de la RMN, appelée « S-line » dans le logiciel SIMCA®. La S-line est un loading plot à une dimension.

Objectifs

L'objectif de ce travail de thèse a été d'étudier les caractéristiques métaboliques des cellules leucémiques au diagnostic de LAM *de novo* chez des patients adultes. Nous avons comparé les profils des patients en fonction du sous-type de LAM diagnostiqué, de leur appartenance à un groupe pronostique défini par les recommandations de l'ELN, de leur statut moléculaire, de leur réponse au traitement standard par chimiothérapie et de la survie globale. Nous avons pu ainsi établir une liste de métabolites discriminants, ayant un impact positif ou négatif sur l'évolution de la pathologie, et ainsi identifier des pistes pour orienter la décision thérapeutique et cibler les voies métaboliques perturbées dans les LAM.

Matériels et Méthodes

1. Inclusion des patients et collection des échantillons

50 patients ont été recrutés depuis juin 2016, hospitalisés au CHU Grenoble Alpes et dans les hôpitaux périphériques de la région alpine. Les critères de sélection ont été les suivants : diagnostic de LAM *de novo* – hors LAM3 –, âge supérieur à 18 ans et pourcentage de blastes dans la moelle osseuse supérieur à 20%. Les patients présentant des leucémies secondaires à d'autres pathologies ou transformées à partir de syndromes myélodysplasiques n'ont pas été inclus dans cette étude. Les échantillons de sang périphérique et de moelle osseuse ont été collectés dans des tubes BD Vacutainer® avant induction de la chimiothérapie.

2. Préparation de l'échantillon

Les échantillons frais de sang total et de moelle osseuse pour chaque patient ont été collectés et centrifugés (le délai entre le prélèvement et l'expérimentation pouvant aller de 3 à 24 heures). Après la centrifugation, une séparation des lymphocytes par gradient de Ficoll a été réalisée pour isoler les cellules mononuclées. Puis, deux lavages au PBS (Gibco™) et deux autres lavages au PBS deutéré froid ont été effectués, le but étant de s'affranchir du pic de l'eau sur les spectres de RMN. Enfin, les cellules ont été suspendues dans quelques microlitres de PBS deutéré et transférées dans un insert pour MAS rotor (volume total 30 µL). Les inserts ont été stockés à -80°C jusqu'à l'analyse en RMN HRMAS. Un à trois inserts par échantillon de patient (sang périphérique et moelle osseuse, en fonction du matériel disponible) ont été préparés.

3. Paramètres d'acquisition de la RMN HRMAS

Les expérimentations de RMN HRMAS ont été réalisées sur la plateforme IRMaGe à Grenoble. Juste avant l'acquisition, l'échantillon a été inséré dans un rotor en zirconium de 4 mm de diamètre. Puis, le rotor a été placé dans l'aimant supraconducteur du spectromètre Bruker 500 Avance III (Bruker Biospin, Germany), localisé au CEA de Grenoble. Pour cette étude, nous avons utilisé la RMN du proton ^1H haute résolution, à la fréquence de 500 MHz.

Les réglages ont été effectués sur la station de travail : la vitesse de rotation a été réglée sur 4000 Hz et la température de l'échantillon à 277K. La séquence d'acquisition utilisée est une CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill), c'est à dire une séquence qui atténue le signal provenant des lipides et macromolécules qui sont présents dans l'échantillon et qui peuvent masquer des métabolites. Ensuite, la sonde a été ajustée : « Matching », qui correspond à l'amplitude du signal, et « Tuning », qui représente la fréquence. Puis, l'homogénéité du champ magnétique a été vérifiée, dans le but d'avoir la meilleure résolution possible. Enfin, nous avons démarré l'acquisition du spectre. Les mêmes étapes ont été effectuées pour chaque insert. Chaque acquisition a duré 17 minutes.

4. Prétraitement des spectres

Tous les spectres de RMN HRMAS ont été corrigés par rapport aux distorsions de la phase et de la ligne de base en utilisant le logiciel TopspinTM (V 3.7, Bruker Biospin), et la région spectrale δ 0.8-8.7 a été divisée en « buckets » d'une largeur égale à

0.001 ppm, via NMRProcFlow 1.2 en ligne (<https://nmrprocflow.org/>). Les régions δ 4.6-5.3, δ 3.95-4.03 et δ 3.65-3.75 ont été écartées pour éliminer les effets de la pré-saturation imparfaite de l'eau et pour supprimer certains signaux de pollution. Chaque bucket a été normalisé sur la somme totale des buckets. L'assignation des pics a été faite en se basant sur des enregistrements de séries de spectres RMN en deux dimensions (HSQC et TOCSY), sur HMDB et sur la littérature.

5. Statistiques multivariées et univariées

L'analyse multivariée des données a été faite avec le logiciel SIMCA® (V 14.1, Umetrics, Sweden). Les modèles d'OPLS-DA ont été construits avec les deux premières composantes. Le nombre de composantes a été déterminé en utilisant une procédure de cross-validation, produisant les facteurs R²_Y et Q², qui sont des indicateurs de la qualité de l'ajustement et de la prédictibilité du modèle. Après la transformation, les S-lines ont été tracées avec des coefficients de corrélation codés avec des couleurs pour chaque variable (*i.e.* pour chaque métabolite). Les variables colorées indiquent la significativité des métabolites qui contribuent à la différenciation entre deux groupes, avec une couleur chaude (par exemple rouge) correspondant à un métabolite qui est plus significatif qu'un autre de couleur froide (par exemple bleu)⁹⁹. Les amplitudes relatives (u.a.) des métabolites les plus discriminants (en choisissant le pic avec le moins de chevauchement possible) ont été soumises à une analyse ANOVA unidirectionnelle, suivie d'un test de Tukey pour chaque comparaison deux à deux, à l'aide du logiciel Graph Pad Prism®. De plus, des courbes ROC (Receiver Operating Characteristic) ont été tracées afin de déterminer les seuils d'amplitude relative des métabolites analysés, seuils qui serviront de « cut-

off » pour discriminer les patients. Les vrais positifs pour le critère étudié sont représentés en ordonnée, et les faux positifs en abscisse. Ces courbes nous permettent également de repérer le marqueur le plus discriminant entre deux groupes de patients, grâce à l'aire sous la courbe (AUC) générée. Pour que la capacité de discrimination entre deux groupes soit suffisante, l'AUC doit être comprise entre 0.5 et 1. Enfin, des courbes de survie de Kaplan-Meier ont également été générées pour évaluer la probabilité de survie en fonction de critères définis.

Résultats

Sur les 50 patients inclus dans cette étude, 4 ont été exclus de toutes les analyses qui seront détaillées dans les résultats. Deux d'entre eux étaient en fait des diagnostics de LA secondaires à une autre pathologie (patients n° 21 et 43), un était porteur d'une MPAL (Mixed-phenotype acute leukemia – patient n°5), qui est une leucémie aigüe avec un phénotype ambigu, et le quatrième prélèvement de patient n'a rendu aucun signal en analyse par RMN (patient n°24). Le nombre total de patients de la cohorte est donc de 46.

1. Caractéristiques générales des patients au diagnostic

Age médian	63 [25 ; 84]
Sex ratio (H/F)	1,6
Leucocytose	n (%)
< 4 G/L	12 (26)
4-30 G/L	19 (41)
30-100 G/L	9 (19)
> 100 G/L	3 (7)
ND	3 (7)

Tableau V. Caractéristiques des patients au diagnostic.

L'âge médian des patients au diagnostic est de 63 ans, avec un rapport homme/femme de 1,6 ; donc une légère prédominance masculine. La leucocytose est très variable, avec une majorité des patients (41%) ayant un taux de leucocytes entre 4 et 30 G/L dans le sang périphérique.

2. Classification FAB

Sous-type de LAM	n (%)
LAM0	3 (6)
LAM1	9 (20)
LAM2	16 (35)
LAM4	7 (15)
LAM5	6 (13)
ND	5 (11)

Tableau VI. Répartition des différents sous-types de LAM.

D'après ce tableau, nous pouvons remarquer que le sous-type cytologique le plus représenté dans notre cohorte est le sous-type M2 (35%). *A contrario*, le sous-type le moins représenté est le M0 (6%). Nous notons également que 5 diagnostics n'ont pas pu être clairement établis à la lecture du myélogramme (mentionnés ND pour Non Disponible).

3. Classification pronostique

Numéro patient	Pronostic cytogénétique	Survie
1	Intermédiaire	Décédé
2	Favorable	Vivant
3	Défavorable	Vivant
4	Intermédiaire	Vivant
6	Défavorable	Vivant

7	Défavorable	Vivant
8	Intermédiaire	Décédé
9	Défavorable	Décédé
10	Défavorable	Décédé
11	Défavorable	Vivant
12	Défavorable	Vivant
13	Favorable	Vivant
14	Défavorable	Décédé
15	Défavorable	Décédé
16	Favorable	Vivant
17	Favorable	Vivant
18	Favorable	Décédé
19	Intermédiaire	Vivant
20	Favorable	Vivant
22	Défavorable	Vivant
23	Défavorable	Vivant
25	Intermédiaire	Vivant
26	Favorable	Vivant
27	Favorable	Vivant
28	Favorable	Vivant
29	Favorable	Vivant
30	Favorable	Vivant
31	Défavorable	Décédé
32	Intermédiaire	Décédé
33	Favorable	Vivant
34	Favorable	Décédé
35	Favorable	Vivant

36	Favorable	Vivant
37	Intermédiaire	Vivant
38	Favorable	Vivant
39	Intermédiaire	Vivant
40	Intermédiaire	Décédé
41	Intermédiaire	Décédé
42	Favorable	Vivant
44	Défavorable	Décédé
45	Intermédiaire	Vivant
46	Défavorable	Vivant
47	Défavorable	Vivant
48	Intermédiaire	Vivant
49	Intermédiaire	Décédé
50	Intermédiaire	Vivant

Tableau VII. Caractéristiques pronostiques cytogénétiques et survie globale.

Sur un total de 46 patients, 37% d'entre eux sont classés dans le groupe pronostique « favorable », 30% dans le groupe « intermédiaire » et 33% dans le groupe « défavorable ». Concernant la survie globale, à ce jour, environ 70% des patients sont toujours vivants.

4. Métabolites identifiés en RMN

Suite à l'analyse des profils métaboliques obtenus par HRMAS, nous avons pu identifier plusieurs métabolites. Le tableau ci-dessous regroupe tous les métabolites

identifiés chez l'ensemble des patients. Ces métabolites sont impliqués dans différentes voies métaboliques qui ont été représentées sur la **Figure 11**.

Métabolites et abréviations	Déplacement chimique (ppm) et multiplicité
2-hydroxyglutarate (2-HG)	1.83 (m), 1.98(m), 2.25(m), 4.03(m)
Alanine (Ala)	1.48 (d)
Choline (Cho)	3.20 (s)
Glutamate (Glu)	2.05(m), 2.13(m), 2.35 (m)
Glutamine (Gln)	2.13(m), 2.45 (m)
Glutathion (GSH)	2.15(m), 2.54 (m), 2.97(dd), 3.78(m)
Myo-inositol (myo-I)	3.27(t), 3.53(dd), 3.62(t), 4.05 (t)
Phosphocholine (PC)	3.21 (s), 4.16(m)
Phosphocréatine/Créatine (PCr, Cr)	3.03 (s), 3.93(s)
Phosphoéthanolamine (PE)	3.24(m), 4.01 (m)
Scyllo-inositol (Scyllo-I)	3.33 (s)
Taurine (Tau)	3.25(t), 3.42 (t)

Tableau VIII. Métabolites identifiés en RMN.

Les résonances attribuées aux métabolites détectés dans les spectres RMN-HRMAS des cellules sont signalées par des lettres (s : singulet, d : doublet, dd : doublet de doublets, t : triplet, q : quadruplet, m : multiplet). Les déplacements chimiques sont donnés par rapport au pic droit du doublet de l'alanine situé à 1,475 ppm sur le spectre. En gras est mentionné le pic utilisé pour réaliser les statistiques univariées.

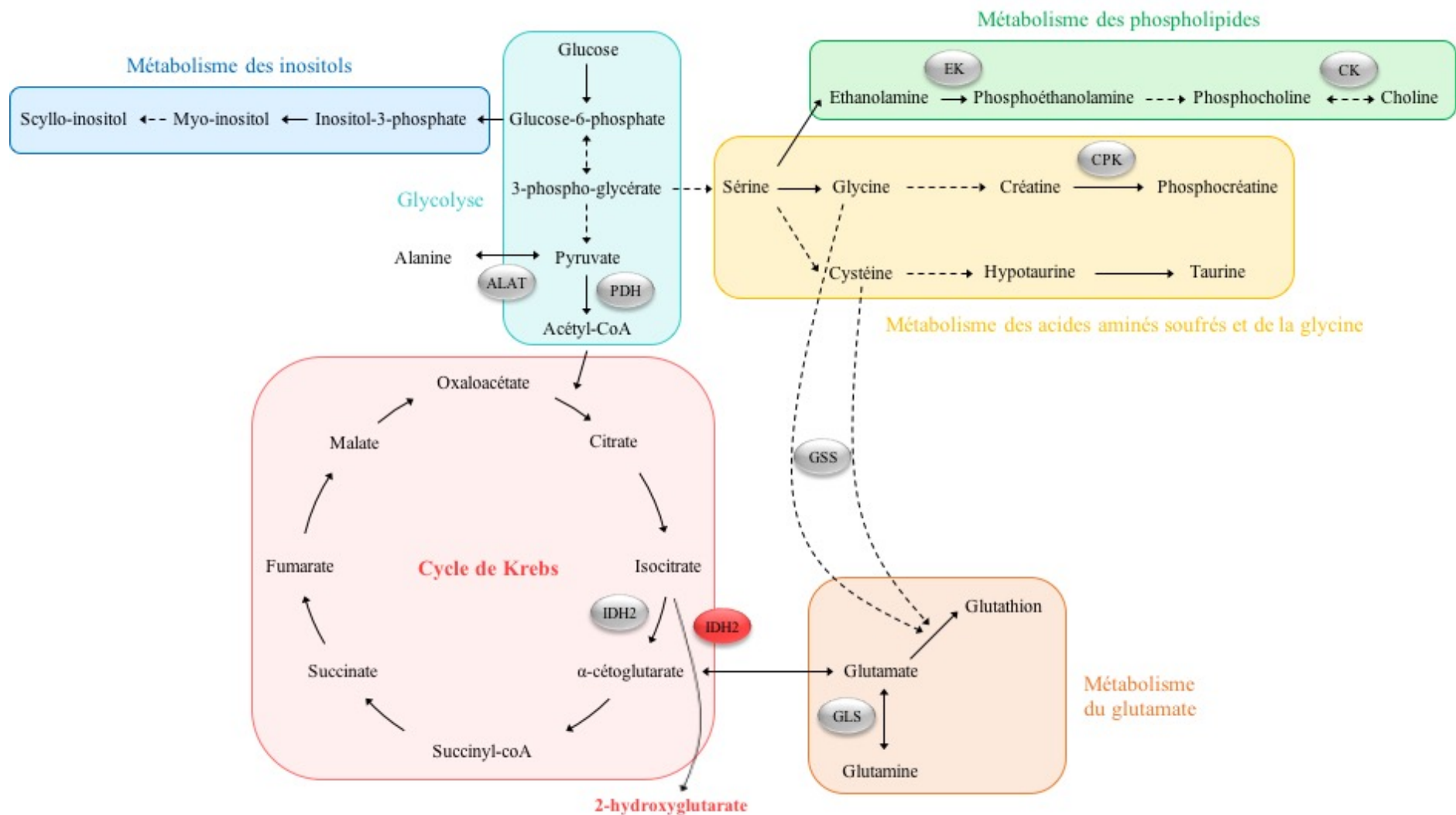


Figure 11. Cartographie des voies métaboliques fonctionnelles caractérisées chez les patients atteints de LAM.

5. Analyse des données

Toutes les analyses des données de patients ont été faites à partir des prélèvements de moelle osseuse. Ainsi, le nombre total de patients analysés est de 44, car pour deux patients, des prélèvements de sang uniquement étaient disponibles. Ces derniers ont donc été exclus des analyses (patients n°7 et 13). De plus, pour chaque analyse que nous allons détailler dans cette partie, un certain nombre de patients a dû être exclu en fonction du type d'analyse réalisé, car nous ne disposions pas de toutes les informations nécessaires pour l'étude. Pour chaque patient analysé, un à trois inserts par échantillon de patient ont pu être préparés.

5.1. Sous-types de LAM

Pour la comparaison des profils métaboliques selon la classification FAB, 41 patients ont été analysés. En effet, comme précisé précédemment, 5 diagnostics n'ont pas pu être posés. La répartition des patients se fait selon le **Tableau IV** ci-dessus.

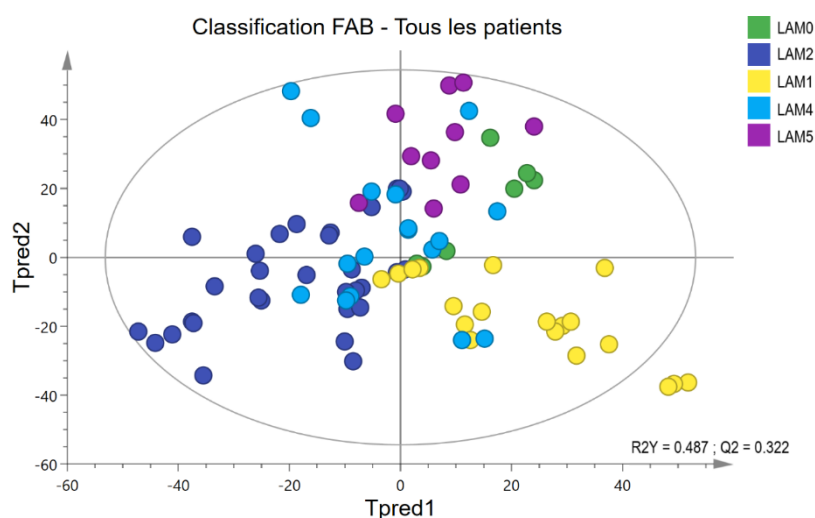


Figure 12. OPLS-DA du modèle de la répartition des patients en fonction de la classification FAB.

Sur ce modèle prenant en compte nos 41 patients, nous observons une forte hétérogénéité dans la répartition des profils métaboliques des patients. Cette première représentation retrouve une certaine séparation entre les sous-types de la classification FAB, avec cependant plusieurs patients qui semblent présenter des caractéristiques communes malgré un sous-type cytologique différent.

5.2. Résultats en fonction du statut génétique

5.2.1. Mutation *NPM1*

Pour la comparaison des patients porteurs ou non de la mutation *NPM1*, 38 patients ont été pris en compte. En effet, pour 6 d'entre eux, le statut mutationnel n'a pas été déterminé. 14 patients ont la mutation *NPM1* (37%), et 24 ne l'ont pas (63%).

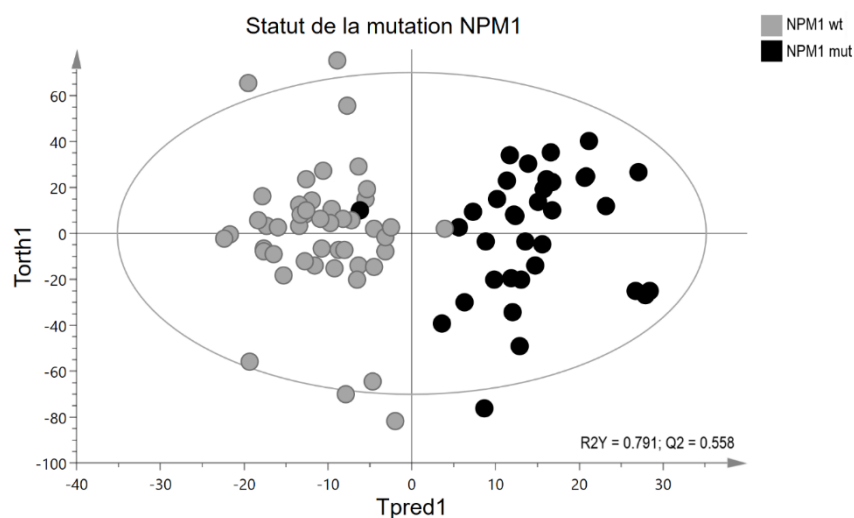


Figure 13. OPLS-DA du modèle du statut mutationnel de *NPM1*.

L'analyse en OPLS-DA montre qu'on obtient une assez bonne séparation des patients mutés vs non mutés, suggérant des différences métaboliques entre ces 2 sous-types moléculaires.

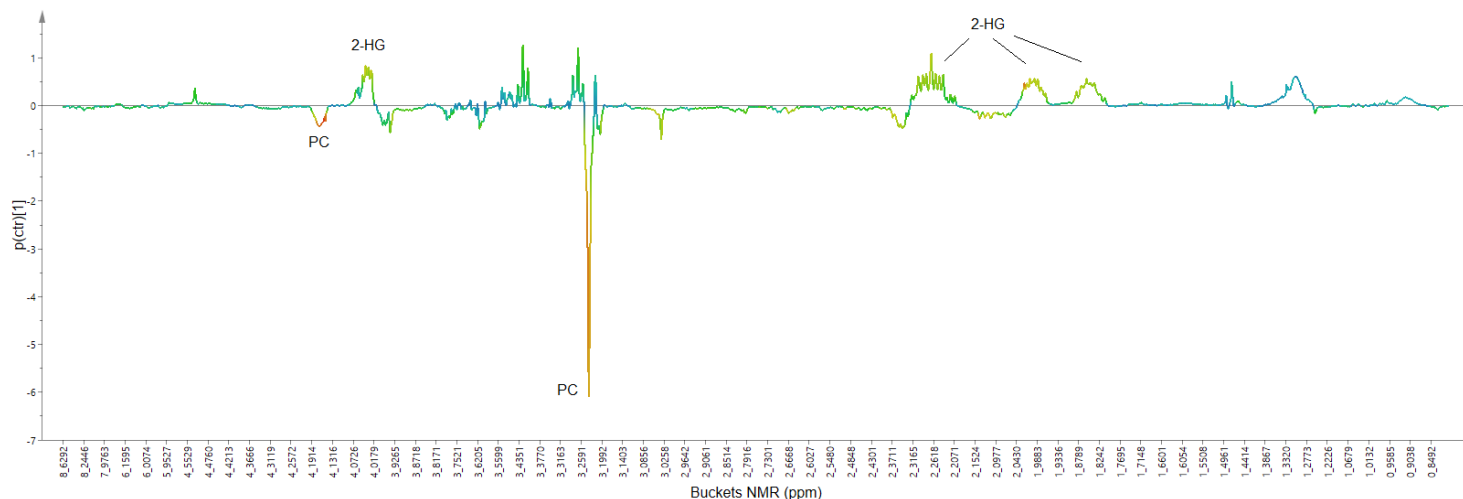


Figure 14. S-line du modèle du statut mutationnel de *NPM1*. 2-HG : 2-hydroxyglutarate ; PC : Phosphocholine.

L'analyse des métabolites les plus différemment exprimés entre ces 2 génotypes montre d'une part que les patients non mutés surexpriment la phosphocholine ($p = 0.0003$) et d'autre part une surexpression du 2-HG ($p = 0.008$) chez les patients mutés (**Figure 15**).

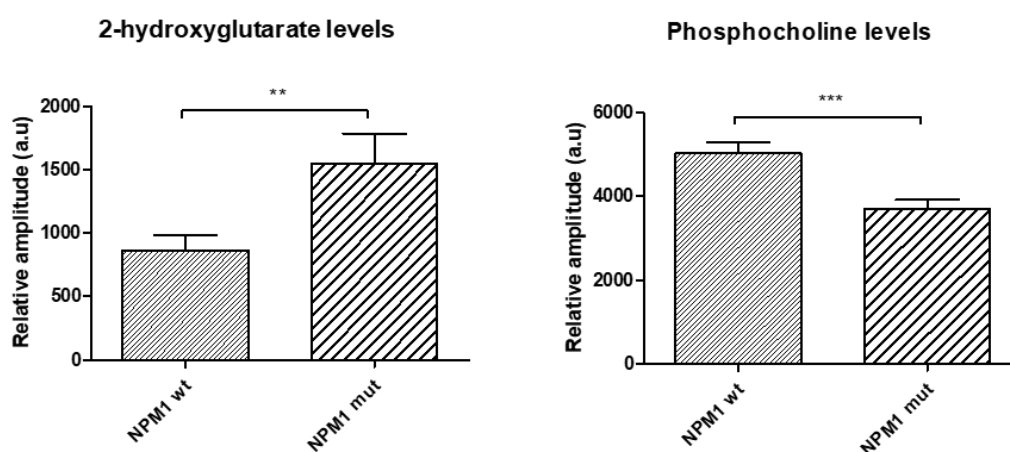


Figure 15. Variation quantitative des métabolites en fonction du statut mutationnel de *NPM1*. (**, $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).

5.2.2. Mutation *FLT3*-ITD

Pour la comparaison des patients porteurs ou non de la mutation *FLT3*-ITD, 38 patients ont été pris en compte. En effet, pour 6 d'entre eux, le statut mutationnel n'a pas été déterminé. 12 patients ont la mutation *FLT3*-ITD (32%), et 26 ne l'ont pas (68%).

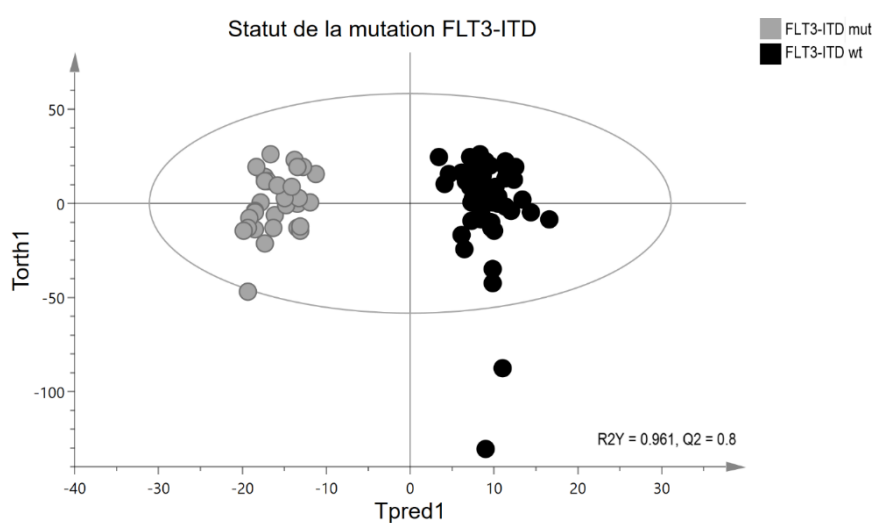


Figure 16. OPLS-DA du modèle du statut mutationnel de *FLT3*-ITD.

L'analyse en OPLS-DA montre qu'on obtient une très bonne séparation des patients mutés vs non mutés ($R^2Y = 0.961$), suggérant comme précédemment pour la mutation *NPM1*, des différences métaboliques entre les patients porteurs ou non de la mutation *FLT3*-ITD.

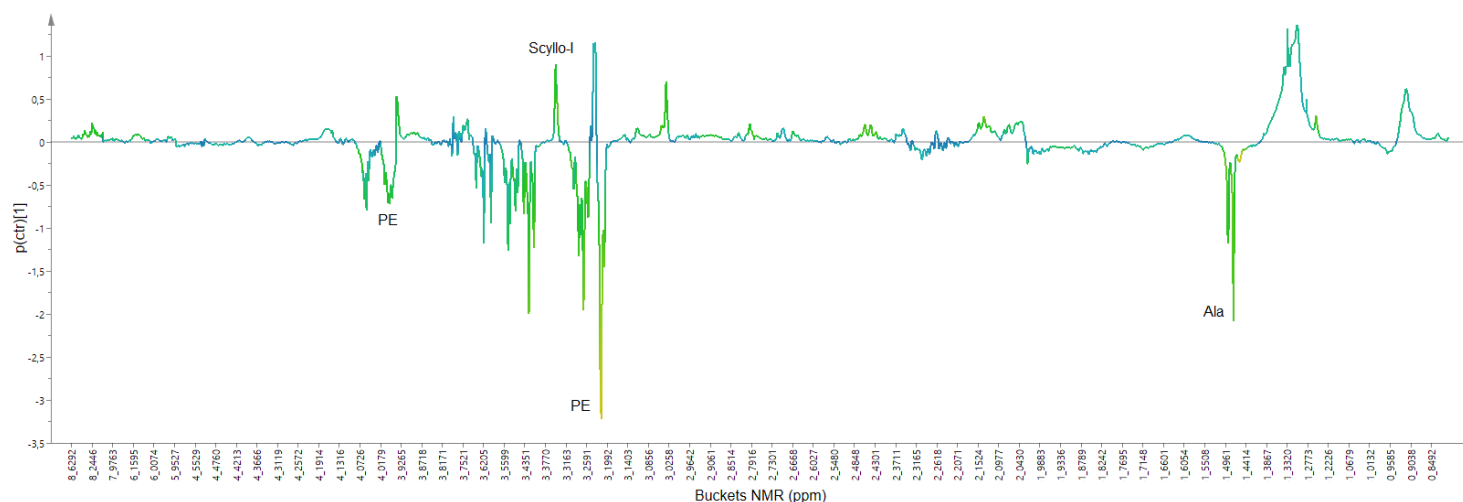


Figure 17. S-line du modèle du statut mutationnel de *FLT3*-ITD. Ala: Alanine; PE : Phosphoéthanolamine; Scyllo-I : Scylloinositol.

Les profils des patients *FLT3*-ITD muté montrent une surexpression de la phosphoéthanolamine ($p = 0.005$) et de l'alanine ($p = 0.0008$), alors que les patients n'ayant pas la mutation surexpriment le scylloinositol ($p = 0.005$). (**Figure 18**).

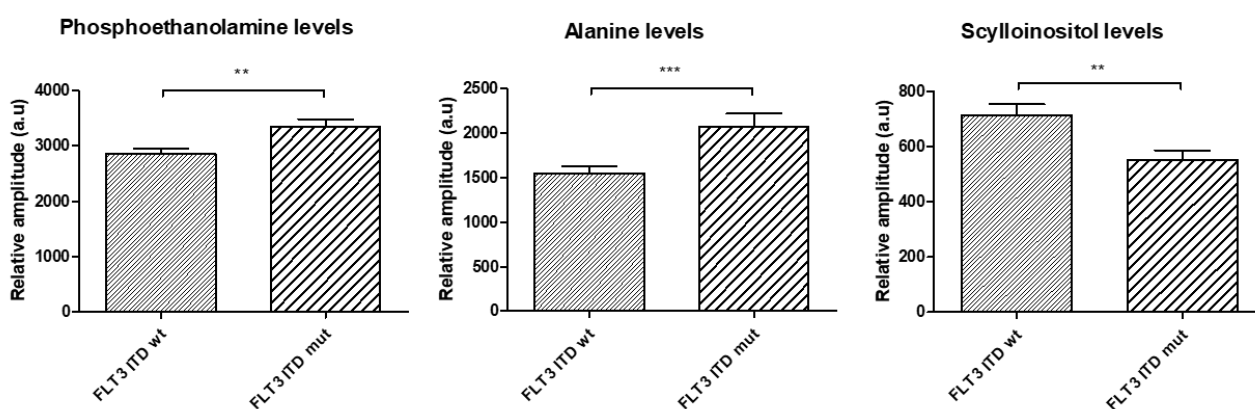


Figure 18. Variation quantitative des métabolites en fonction du statut mutationnel de *FLT3*-ITD. (**, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$).

5.2.3. Mutation IDH

Nous avons ensuite comparé les profils des patients présentant une mutation *IDH1/2* par rapport aux profils des patients n'exprimant pas cette mutation. Pour l'analyse, 40 patients ont été pris en compte, car pour 4 d'entre eux, le statut mutationnel n'était pas déterminé. Sur les 40 patients analysés, 11 sont porteurs de la mutation (27%) et 29 ont un statut wild-type (73%).

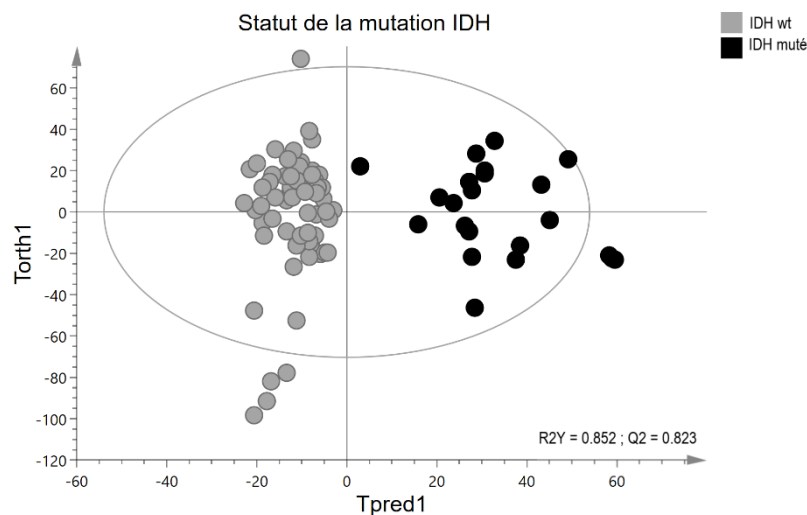


Figure 19. OPLS-DA du modèle du statut mutationnel d'*IDH*.

L'analyse du modèle OPLS-DA montre une bonne séparation des patients mutés *IDH* vs non mutés. La S-line ci-dessous, générée depuis ce modèle statistique, montre effectivement des différences entre ces deux catégories de patients.

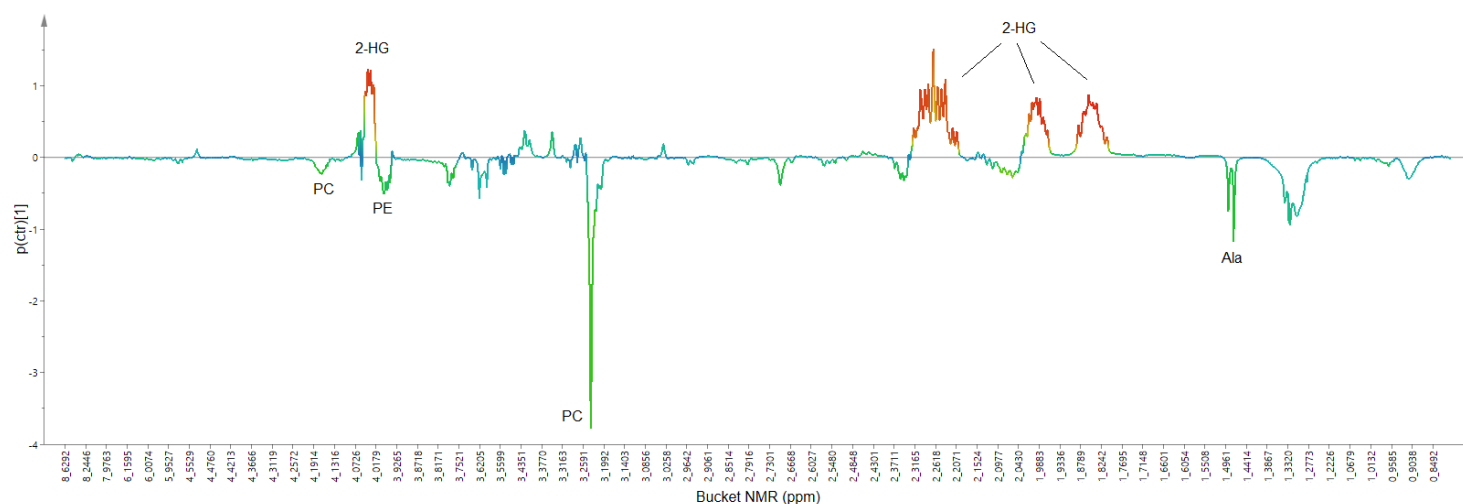


Figure 20. S-line du modèle du statut mutationnel d'*IDH*. 2-HG : 2-hydroxyglutarate ; Ala : Alanine ;
PC : Phosphocholine ; PE : Phosphoéthanolamine.

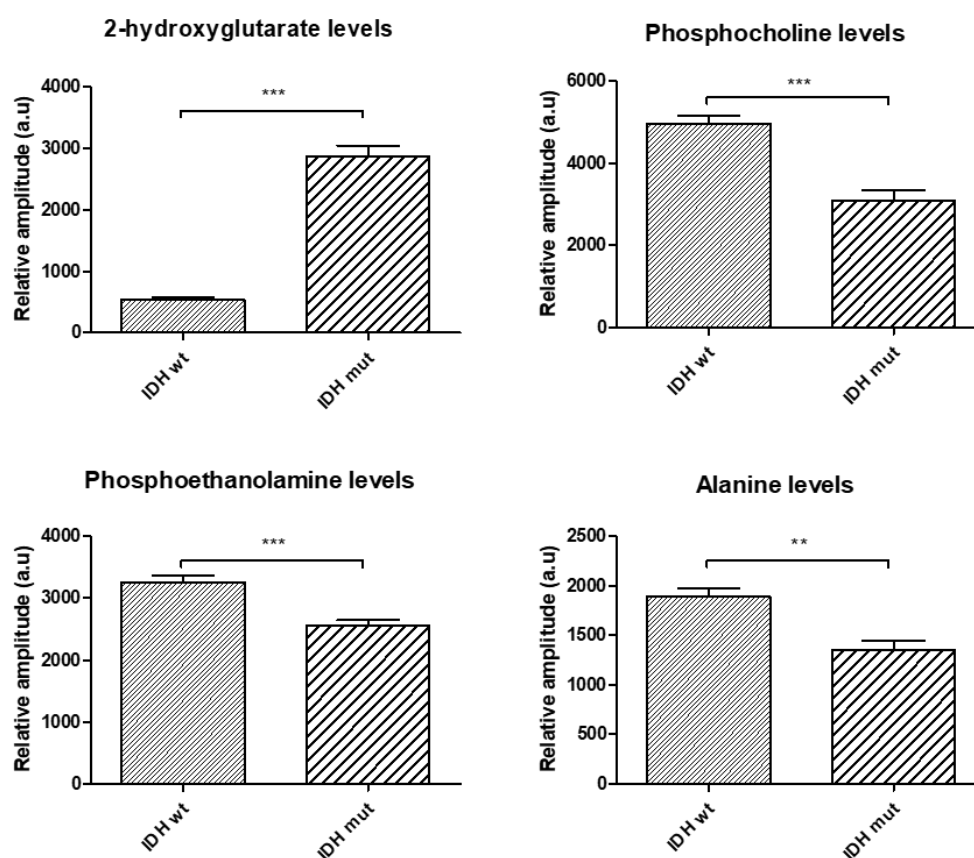


Figure 21. Variation quantitative des métabolites en fonction du statut mutationnel d'*IDH*.
(**, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$).

De façon intéressante, le 2-HG est le métabolite qui ressort comme étant le plus discriminant ($p < 0.0001$) entre les deux groupes avec une très forte expression de celui-ci chez les patients mutés. Ceci confirme que la présence de la mutation *IDH* entraîne bien une augmentation intracellulaire de cet oncométabolite spécifique. On note également une surexpression de la phosphocholine ($p < 0.0001$), de la phosphoéthanolamine ($p = 0.0002$) et de l'alanine ($p = 0.0011$) chez les patients non porteurs de la mutation (**Figure 21**).

La présence d'une quantité importante de 2-HG chez les patients mutés pouvant avoir une forte influence sur la répartition des profils métaboliques, nous avons donc généré un nouveau modèle statistique, basé sur celui de la répartition en fonction des sous-types de LAM (*cf.* **Figure 12**) en excluant les patients porteurs de mutation *IDH1/2*.

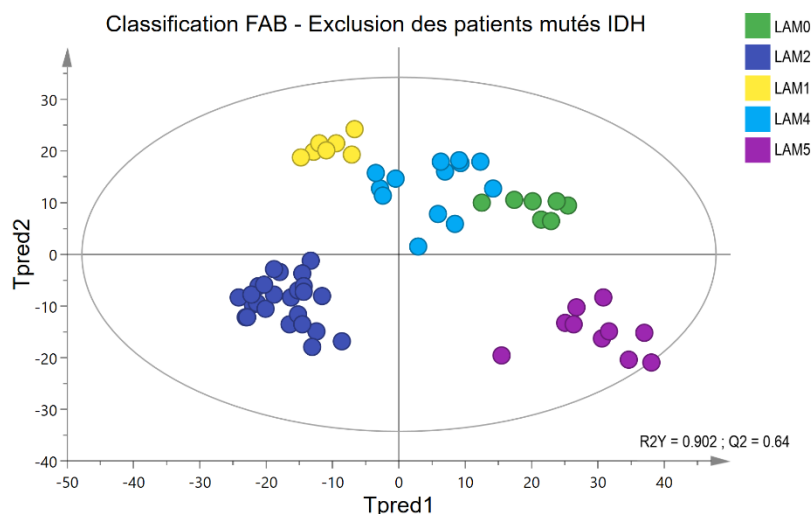


Figure 22. OPLS-DA du modèle de la répartition des patients en fonction de la classification FAB en excluant les patients mutés *IDH*.

Sur ce nouveau modèle prenant en compte 28 patients, nous observons clairement une nette séparation des profils des patients en fonction du sous-type de LAM diagnostiqué. Ceci peut s'expliquer d'une part par le fait que les mutations de l'*IDH* – et par extension la présence de 2-HG –, sont retrouvées dans tous les sous-types de LAM confondus ; et d'autre part, par le fait que ce métabolite masque les autres différences métaboliques que l'on pourrait retrouver entre les différents sous-types cytologiques.

Pour aller plus loin, nous avons projeté les données obtenues des spectres (7 au total) des 4 patients pour lesquels le statut mutationnel d'*IDH* n'était pas déterminé dans notre modèle statistique précédemment établi. De façon intéressante, il s'avère que ces patients sont tous classés dans le groupe des patients *IDH* wild-type, ce qui est corrélé au fait que l'on ne retrouve pas de 2-HG dans les spectres de ces patients.

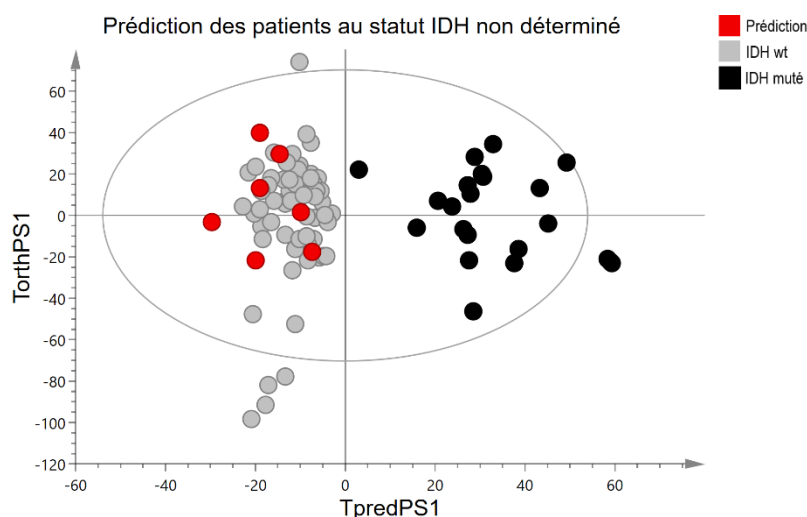


Figure 23. OPLS-DA du modèle de prédiction du statut mutationnel d'*IDH*.

5.3. Corrélation avec le pronostic

5.3.1. Groupes pronostiques selon l'ELN

Pour la comparaison des groupes pronostiques selon l'ELN, 44 patients ont été pris en compte. 16 sont classés dans le groupe favorable (36%), 14 dans le groupe intermédiaire (32%) et 14 dans le groupe défavorable (32%). Nous avons comparé les patients des groupes favorable vs défavorable.

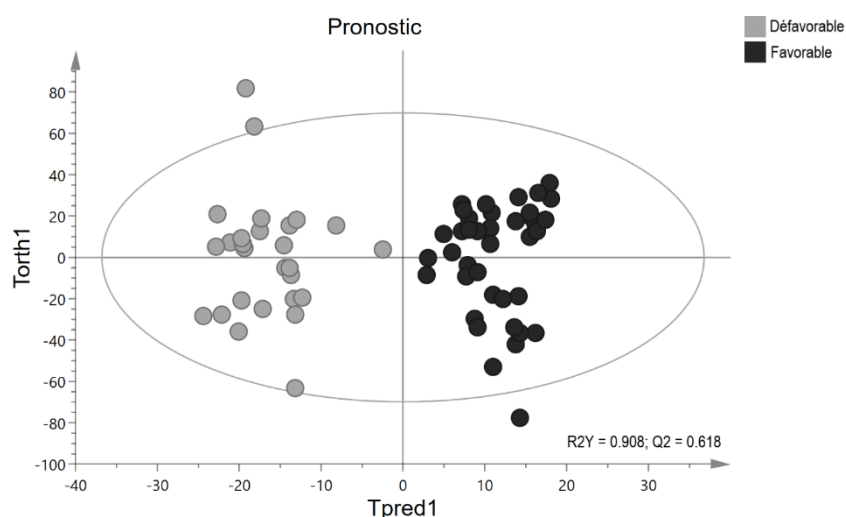


Figure 24. OPLS-DA du modèle des groupes pronostiques favorable vs défavorable.

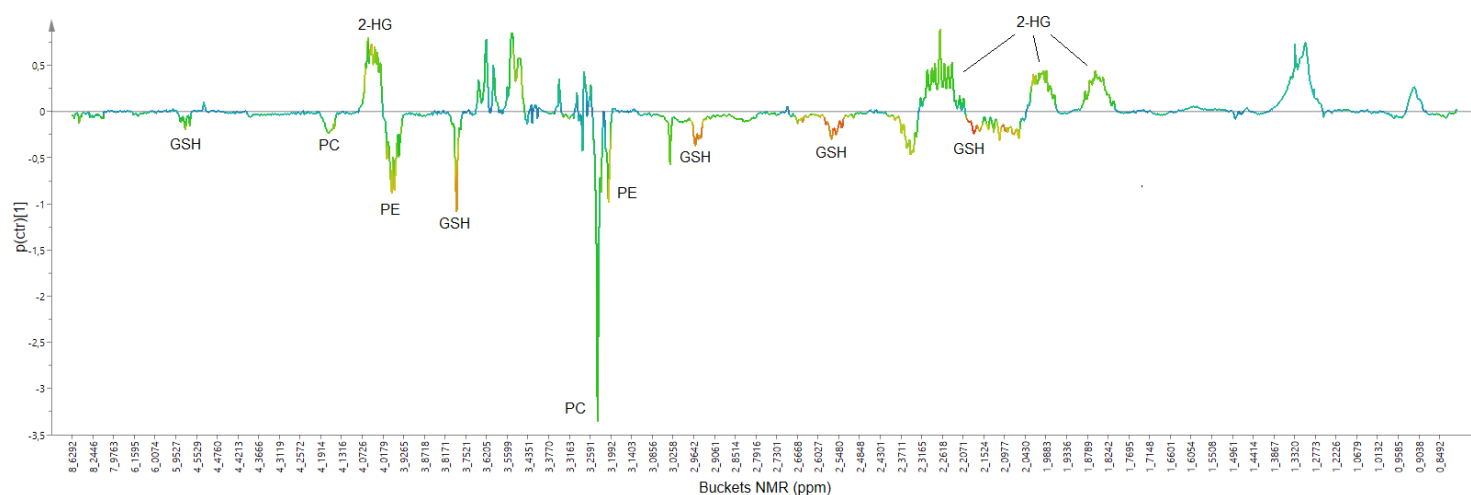


Figure 25. S-line du modèle des groupes pronostiques favorable vs défavorable. 2-HG : 2-hydroxyglutarate ; GSH : Glutathion ; PC : Phosphocholine ; PE : Phosphoéthanolamine.

Le score plot de l'OPLS-DA montre une nette séparation entre les groupes favorable et défavorable (**Figure 24**). Nous observons sur la représentation à une dimension (**Figure 25**) une variation des métabolites en fonction du groupe de patients. Les métabolites variant vers le haut sont surexprimés chez les patients de pronostic favorable (*i.e.* 2-hydroxyglutarate), et ceux variant vers le bas sont surexprimés chez les patients de pronostic défavorable (*i.e.* glutathion, phosphocholine et phosphoéthanolamine). Ces métabolites varient de façon significative entre les deux groupes ($p = 0.012$ pour le 2-HG, $p < 0.0001$ pour le GSH, $p = 0.003$ pour la PE), excepté pour la phosphocholine, dont la p value est légèrement au-dessus de la valeur de significativité ($p = 0.06$) (**Figure 26**).

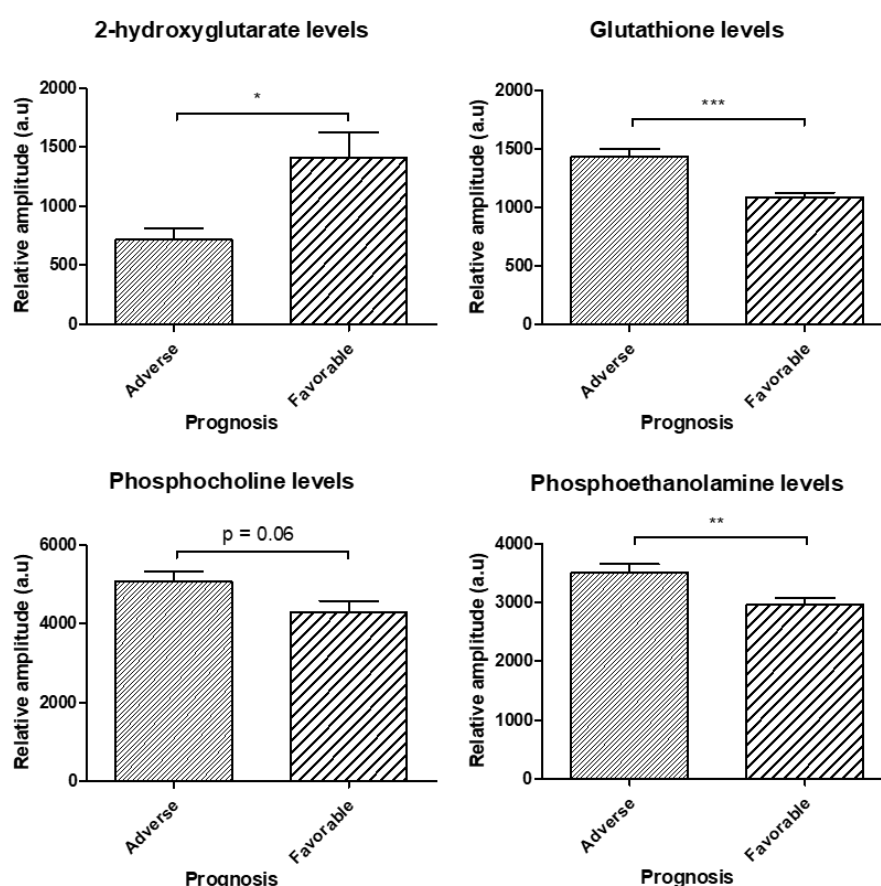


Figure 26. Variation quantitative des métabolites en fonction du groupe pronostique.

(*, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$).

Dans le groupe de pronostic favorable, 6 patients sur 16 sont *IDH* muté, et dans le groupe de pronostic défavorable, 1 patient sur 14 est *IDH* muté. L'augmentation du 2-HG intracellulaire est donc en lien avec le pronostic favorable.

Nous avons ensuite généré des courbes ROC pour ces quatre métabolites, afin de déterminer leur valeur prédictive pour le pronostic des patients (en se référant aux groupes favorable et défavorable de la classification ELN). Les résultats sont regroupés dans la figure ci-dessous (**Figure 27**). Nous pouvons constater que le GSH est le meilleur marqueur discriminant les patients de pronostic favorable vs défavorable, car c'est ce métabolite qui a l'aire sous la courbe (AUC) la plus proche de 1.

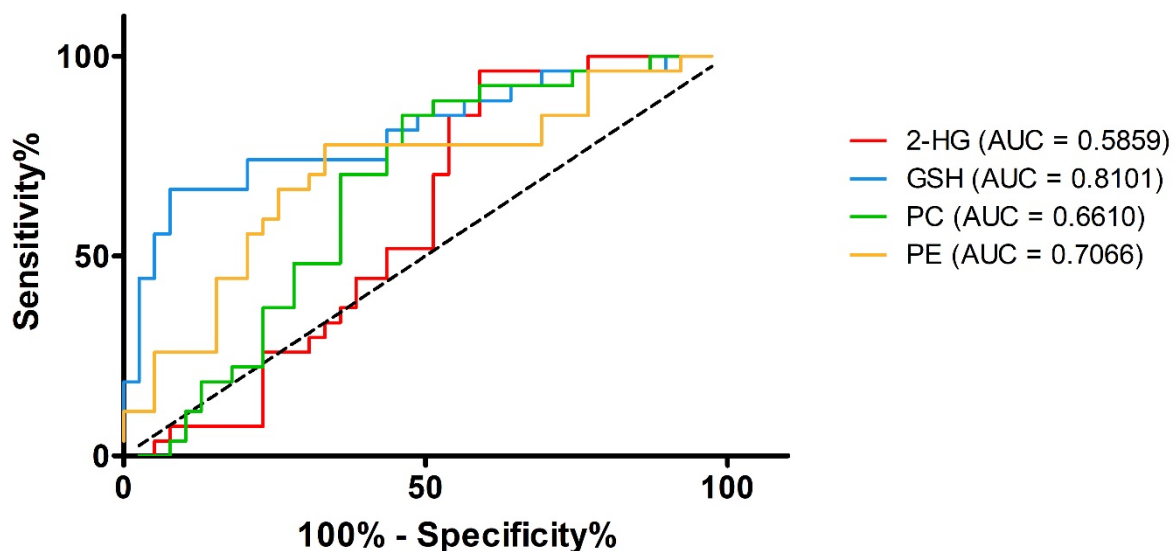


Figure 27. Courbes ROC et AUC pour les 4 métabolites discriminants retrouvés entre les patients de pronostic favorable (n = 16) vs défavorable (n = 14). Axe des ordonnées : taux de vrais positifs (sensibilité) ; Axe des abscisses : taux de faux-positifs (1-spécificité).

5.3.2. Survie globale

Pour la comparaison entre les patients vivants et décédés, 44 patients ont été pris en compte. 30 patients sont vivants à ce jour (68%) et 14 sont décédés (32%).

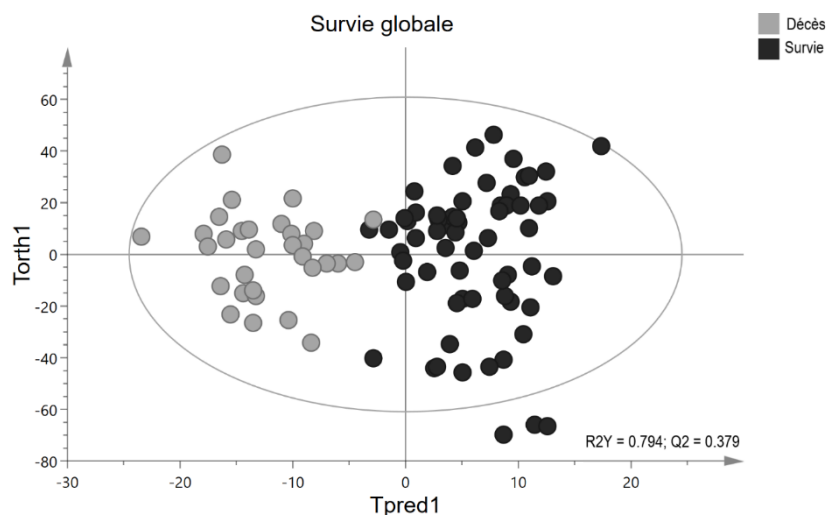


Figure 28. OPLS-DA du modèle de survie globale.

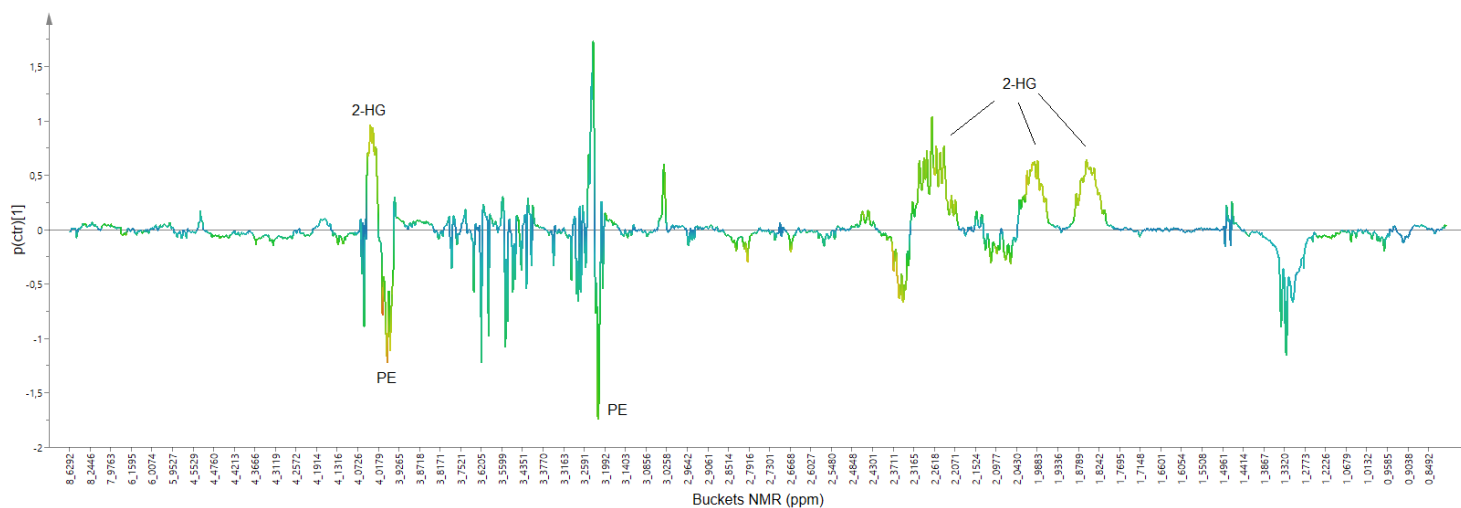


Figure 29. S-line du modèle de survie globale. 2-HG : 2-hydroxyglutarate ; PE : Phosphoéthanolamine.

Le profil des patients vivants montre une surexpression du 2-HG ($p = 0.006$), ainsi qu'une sous-expression de la phosphoéthanolamine ($p = 0.016$) (**Figure 30**).

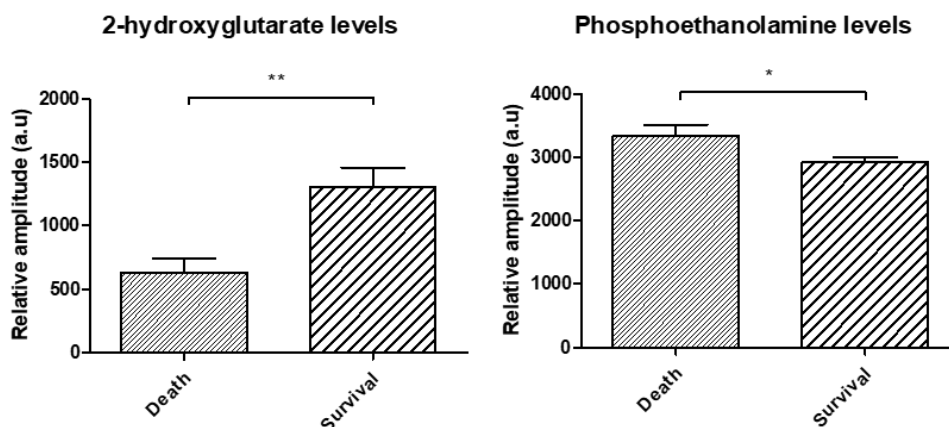


Figure 30. Variation quantitative des métabolites en fonction de la survie globale.
(* , $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$).

Dans le groupe de patients vivants, 10 patients sur 30 sont *IDH* muté, et dans le groupe de patients décédés, 1 patient sur 14 était *IDH* muté. Nous pouvons alors constater que la survie globale des patients est en lien avec l'augmentation intracellulaire de 2-HG.

Nous avons généré les courbes ROC pour ces deux métabolites (**Figure 31**). Nous remarquons que ces deux métabolites sont quasiment similaires au niveau de leur capacité à discriminer les patients vivants et décédés (AUC 2-HG : 0.6353 vs AUC PE : 0.6878).

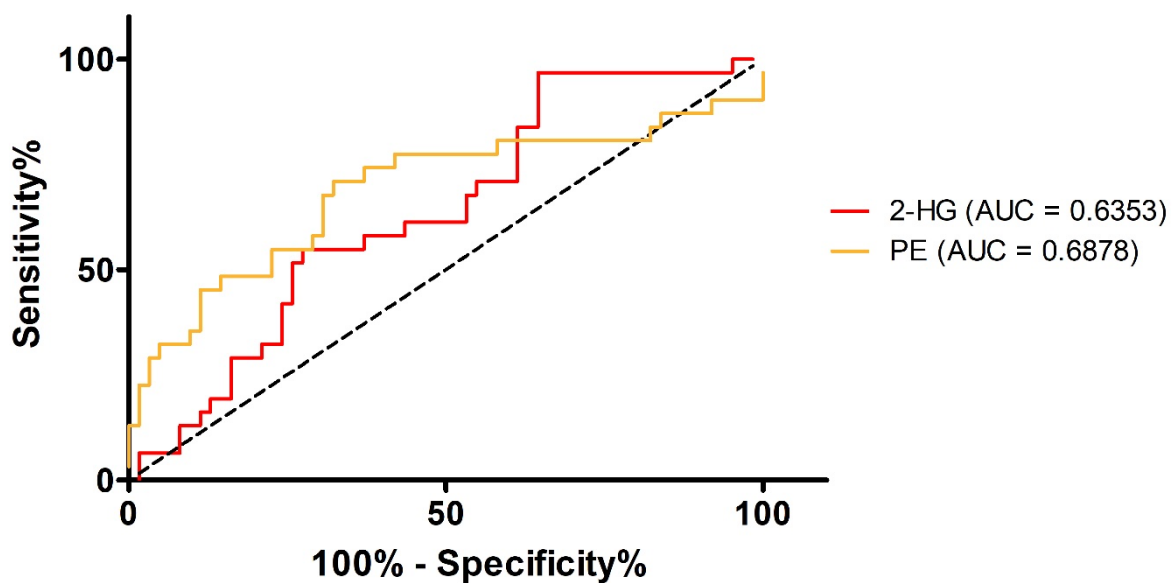


Figure 31. Courbes ROC et AUC pour les 2 métabolites discriminants retrouvés entre les patients vivants (n = 30) vs décédés (n = 14). Axe des ordonnées : taux de vrais positifs (sensibilité) ; Axe des abscisses : taux de faux-positifs (1-spécificité).

5.3.3. Réponse au traitement

Pour comparer la réponse des patients au traitement par chimiothérapie, 31 patients ont été pris en compte pour l'analyse. En effet, pour 13 d'entre eux, la réponse au traitement n'a pas été déterminée. Sur les 31 patients analysés, 25 ont été en rémission après l'induction de la chimiothérapie (81%) : nous les définirons comme étant « chimiosensibles » (CS) ; et 6 patients n'ont pas répondu au traitement (19%) : nous les définirons comme « chimiorésistants » (CR).

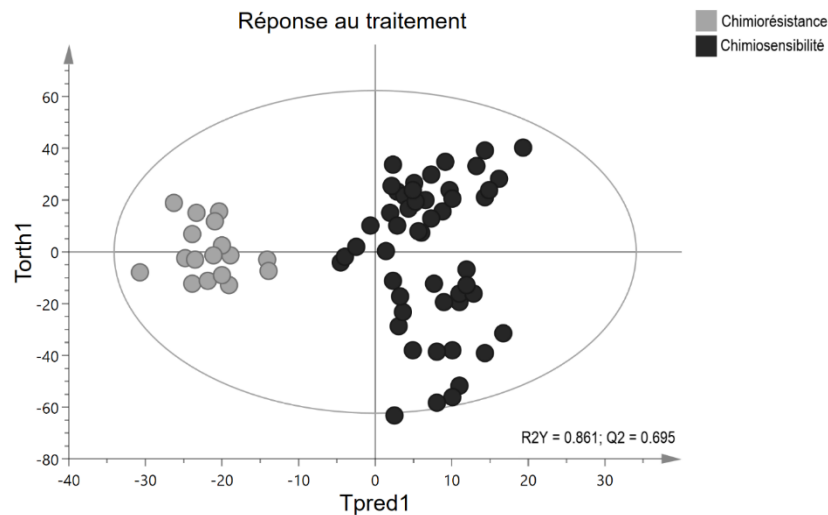


Figure 32. OPLS-DA du modèle de réponse au traitement par chimiothérapie.

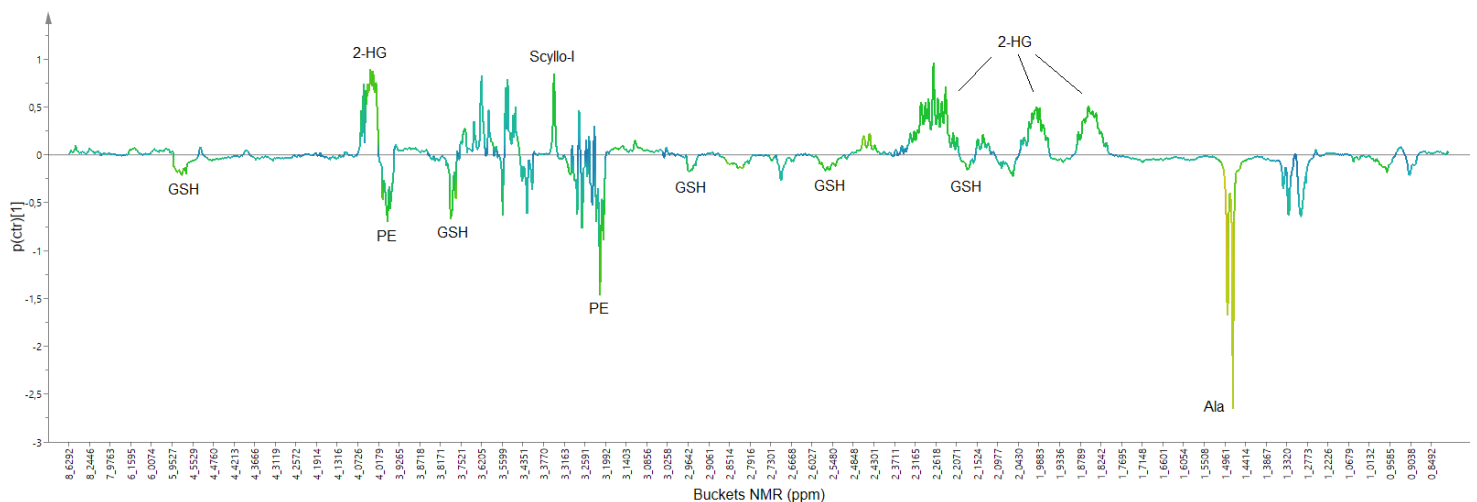


Figure 33. S-line du modèle de réponse au traitement par chimiothérapie. 2-HG : 2-hydroxyglutarate ; Ala : Alanine ; GSH : Glutathion ; PE : Phosphoéthanolamine ; Scyllo-I : Scylloinositol.

Les patients chimiosensibles montrent une surexpression du 2-HG ($p = 0.024$) et du scylloinositol ($p = 0.008$), alors que l'on retrouve surexprimés chez les patients chimiorésistants les mêmes métabolites que chez les patients de pronostic défavorable (*i.e.* glutathion, $p = 0.002$ et phosphoéthanolamine, $p = 0.008$), ainsi que l'alanine ($p < 0.0001$), que l'on retrouvait précédemment surexprimée chez les patients *FLT3*-ITD mutés (**Figure 18**).

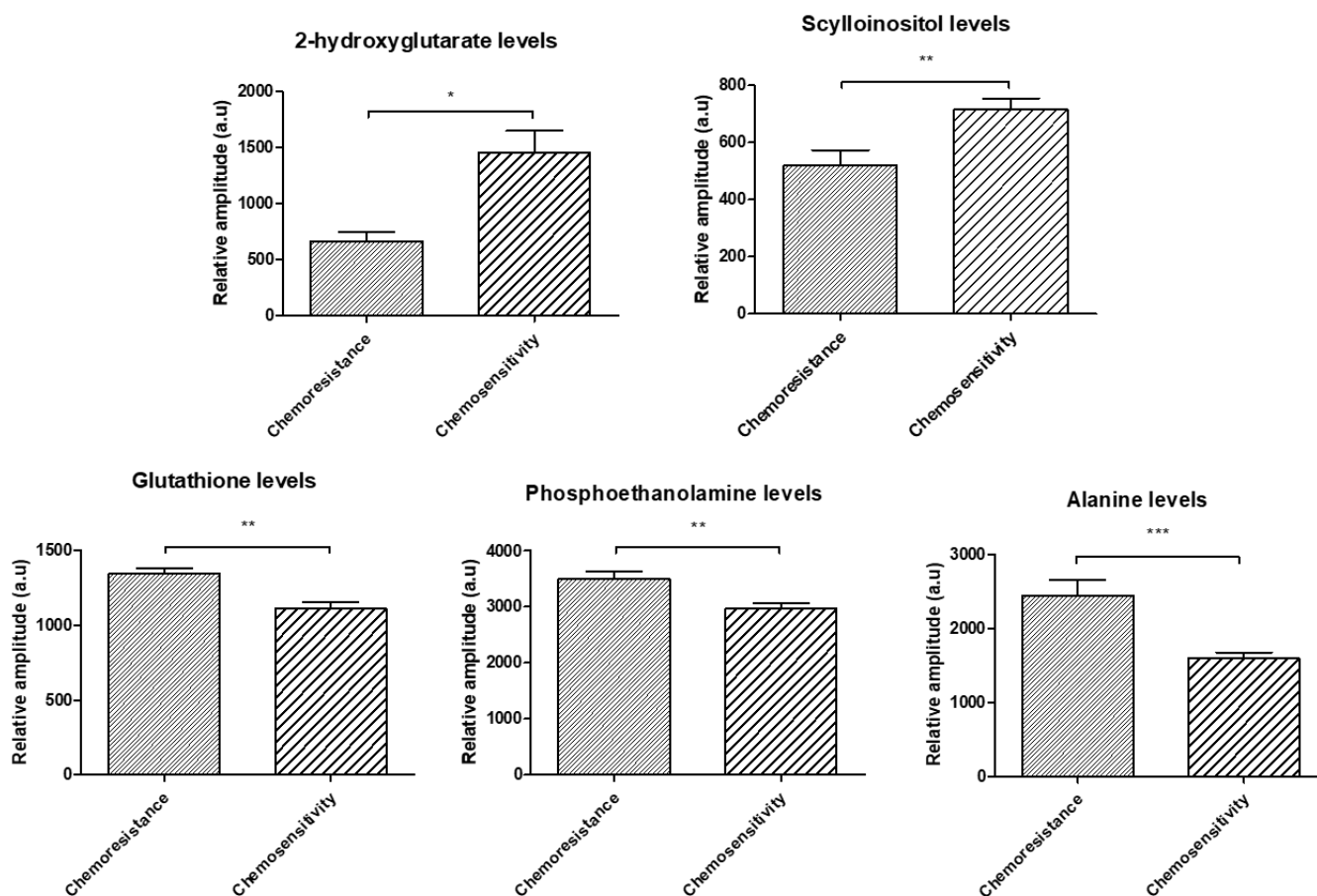


Figure 34. Variation quantitative des métabolites en fonction de la réponse au traitement par chimiothérapie. (*, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).

Dans le groupe de patients chimiosensibles, 10 patients sur 25 sont *IDH* muté, et dans le groupe de patients chimiorésistants, aucun patient n'est *IDH* muté. L'augmentation du 2-HG semble donc être également en lien avec la chimiosensibilité au traitement.

Les courbes ROC générées pour ces cinq métabolites sont regroupées dans la figure ci-dessous (**Figure 35**). Le meilleur marqueur discriminant entre les patients chimiosensibles et chimiorésistants est l'alanine, avec une AUC de 0.8076. Le GSH et le scylloinositol viennent ensuite, suivis de la phosphoéthanolamine et du 2-HG.

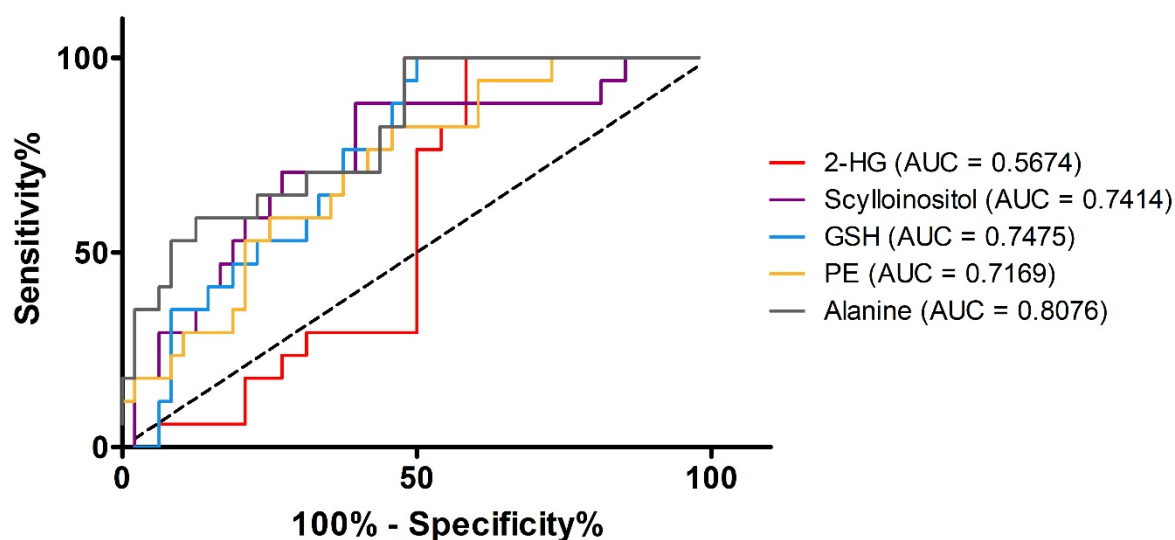


Figure 35. Courbes ROC et AUC pour les 5 métabolites discriminants retrouvés entre les patients chimiosensibles (n = 25) vs chimiorésistants (n = 6). Axe des ordonnées : taux de vrais positifs (sensibilité) ; Axe des abscisses : taux de faux-positifs (1-spécificité).

6. Découverte de biomarqueurs potentiels

D'après les résultats obtenus dans les précédentes analyses, nous pouvons établir une liste de potentiels biomarqueurs ayant un pronostic plutôt favorable ou défavorable. Ainsi, le 2-hydroxyglutarate et le scylloinositol apparaissent comme étant des marqueurs de pronostic favorable, à l'inverse de l'alanine, du glutathion, de la phosphocholine et de la phosphoéthanolamine qui apparaissent comme étant des marqueurs pronostiques défavorables (**Tableau IX**).

Métabolite surexprimé	Pronostic		Mutations						Survie		Réponse au traitement	
	Favorable	Défavorable	<i>NPM1</i>		<i>FLT3-ITD</i>		<i>IDH</i>		Survie	Décès	CS	CR
			wt	muté	wt	muté	wt	muté				
2-HG	+			+				+	+		+	
Scylloinositol					+						+	
Alanine						+	+					+
GSH		+										+
PC		+	+				+					
PE		+				+				+		+

Tableau IX. Biomarqueurs pronostiques potentiels dans les LAM. Le pronostic est évalué selon la classification de l'ELN, et la réponse au traitement correspond à la rémission complète (pour les patients chimiosensibles) ou non (pour les patients chimiorésistants) après induction de la chimiothérapie. 2-HG : 2-hydroxyglutarate ; CS : Chimiosensible ; CR : Chimiorésistant ; GSH : Glutathion ; PC : Phosphocholine ; PE : Phosphoéthanolamine.

Pour terminer, nous avons comparé la probabilité de survie des patients en fonction de la valeur seuil de 2-HG permettant la meilleure discrimination entre les patients mutés vs non mutés. Il en ressort, sur la courbe de Kaplan-Meier ci-dessous (**Figure 36**), que les patients avec un taux élevé de 2-HG (patients sécréteurs) ont une meilleure chance de survie après presque 3 ans écoulés depuis le diagnostic (plus précisément 2,8 années à la date de l'analyse), qui est quasiment significative ($p = 0.0521$) par rapport aux patients non porteurs de la mutation. Seul 1 patient était mal classé : en effet, il présentait un seuil de 2-HG supérieur à 1158 u.a. alors qu'il n'avait pas la mutation *IDH*.

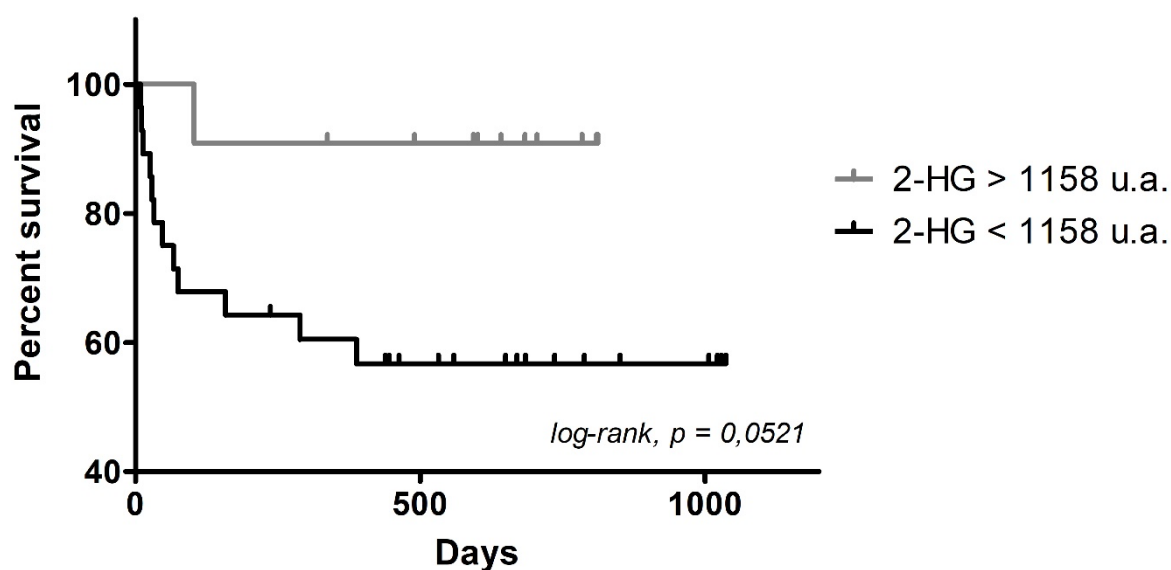


Figure 36. Courbe de Kaplan-Meier indiquant la survie des patients *IDH* muté ($n = 11$) vs *IDH* non muté ($n = 28$) avec un seuil de 2-HG fixé à 1158 u.a. en fonction du temps (jours).

Nous avons fait de même concernant le scylloinositol, qui apparaît comme étant de bon pronostic, et nous avons comparé la probabilité de survie chez les patients chimiosensibles et chimiorésistants, pour lesquels le scylloinositol est discriminant. Pour cette analyse, le seuil d'amplitude relative a été déterminé grâce à la courbe ROC de ce métabolite, et est fixé à 523 u.a.

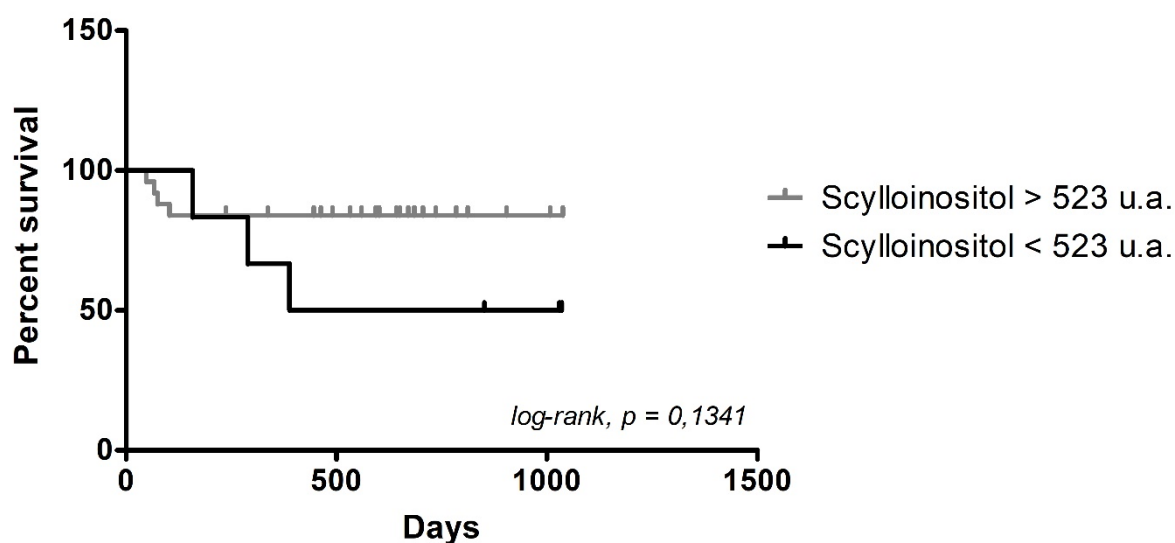


Figure 37. Courbe de Kaplan-Meier indiquant la survie des patients chimiosensibles (n = 25) vs chimiorésistants (n = 6) avec un seuil de scylloinositol fixé à 523 u.a. en fonction du temps (jours).

D'après cette courbe de Kaplan-Meier, les patients ayant le scylloinositol plus élevé (*i.e.* les patients chimiosensibles) n'ont pas une probabilité de survie significativement différente des autres patients ($p = 0.1341$) (**Figure 37**).

Discussion

Ces dernières années, le développement de la métabolomique basée sur la RMN-HRMAS a permis de mieux caractériser *in cellulo* les changements métaboliques associés au cancer. Dans cette étude, nous avons utilisé cette méthode pour affiner nos connaissances sur les caractéristiques métaboliques des progéniteurs leucémiques, afin d'élucider les mécanismes développés par ces cellules pour favoriser leur prolifération.

1. Les patients présentent des différences significatives de leur métabolisme selon leur sous-type cytologique et leur statut moléculaire

L'analyse globale des métabolites exprimés par les cellules leucémiques montrent que le spectre d'expression varie de façon assez importante entre les patients. Une première analyse selon le sous-type FAB permet d'identifier des différences nettes entre ces sous-types. Ceci est cohérent avec le fait que chaque sous-type de la pathologie est représenté par un ou plusieurs types cellulaires différents, en fonction du stade de différenciation et de maturation de la cellule leucémique, et aussi des marqueurs enzymatiques exprimés par les cellules. De façon intéressante, les différences entre sous-types FAB sont nettement plus significatives lorsque l'analyse exclue le 2-HG. L'impact du 2-HG sur le modèle statistique semble logique, car l'oncométabolite produit en présence de la mutation *IDH* est retrouvé dans tous les sous-types de LAM confondus et en grande quantité, ce qui masque les différences moins importantes dans les profils métaboliques des patients lorsqu'on les analyse tous ensemble. Dans la littérature, plusieurs équipes ont mesuré cette quantité de 2-HG par chromatographie liquide ou gazeuse couplée à la spectrométrie de masse,

dans des sérums provenant du sang périphérique chez des patients non mutés vs mutés. Elle peut alors varier d'un facteur 20 à 50 entre ces deux groupes de patients (61 ng/mL vs 3004 ng/mL en moyenne pour l'équipe de Dinardo¹⁰⁷, et 1,2 μ mol/L vs 21,2 μ mol/L pour l'équipe de Janin¹⁰⁸). Il n'a pas été observé de différence au niveau des quantités de 2-HG mesurées entre les mutations *IDH1* et *IDH2*.

2. Le lien entre métabolisme et statut moléculaire

Dans cette étude, nous avons pu analyser les différences métaboliques selon le statut de trois gènes : *IDH*, *NPM1* et *FLT3*. De façon intéressante, nous retrouvons des altérations métaboliques qui semblent corrélées au génotype des patients. Concernant la mutation *IDH*, le lien entre le statut moléculaire et le métabolisme est décrit depuis plusieurs années. Notre étude retrouve ce lien mais surtout montre, pour la première fois à notre connaissance, l'impact de la mutation sur la sécrétion intracellulaire de 2-HG. Ce lien est très significatif puisque nous avons pu déterminer à l'aide d'une courbe ROC un seuil permettant de discriminer avec presque 100% de spécificité les patients mutés vs non mutés. La quantité mesurée de 2-HG est cependant relative, car elle correspond à l'amplitude d'un des pics du 2-HG identifié en RMN. Cela nous a tout de même permis de déterminer un seuil à 1158 u.a. indiquant que les patients ayant une quantité de 2-HG supérieure à ce seuil sont porteurs de la mutation *IDH*. Également, des expérimentations sont actuellement en cours pour doser la quantité de 2-HG présente dans les plasmas sanguins des patients *IDH* mutés. Nous espérons pouvoir corréler ces mesures aux quantités relatives intracellulaires mesurées chez nos patients par RMN-HRMAS. Ainsi, la mesure intracellulaire du 2-HG pourrait être un biomarqueur très significatif de la

mutation. Concernant les mutations *NPM1* et *FLT3*, il existe des différences métaboliques mais moins significatives. En effet, les altérations métaboliques sont plus générales car elles ne touchent pas une enzyme clé du métabolisme comme dans le cas d'*IDH*. On observe plusieurs métabolites qui sont considérés comme discriminants entre les patients mutés et non mutés pour ces deux gènes. Ceci pourrait être le reflet de l'activation générale de la cellule leucémique au niveau métabolique, avec l'accélération de la production de phospholipides membranaires chez les patients mutés *FLT3*-ITD par exemple, mutation considérée comme de mauvais pronostic. En effet, lorsque le gène *FLT3* est muté dans les LAM, cela entraîne une prolifération et une différenciation plus importante des cellules cancéreuses, augmentant de ce fait leur survie et diminuant l'apoptose. De plus, la mutation conduit à une activation de plusieurs voies de signalisation, telles que PI3K/AKT et la voie des MAPK¹⁰⁹. D'autre part, la mutation du gène *NPM1* induit l'assemblage d'un grand nombre de protéines requises pour la biogénèse des ribosomes, et de ce fait contribue à la croissance et à la prolifération cellulaire¹¹⁰.

3. Impact du métabolisme sur le pronostic

L'activation et la dérégulation de certaines voies métaboliques étant des processus développés par les cellules cancéreuses pour favoriser leur survie – et donc favoriser la progression de la maladie –, il est très probable que la surexpression de certains métabolites et/ou de certaines voies métaboliques puissent avoir un impact sur le pronostic des patients. Notre étude a retrouvé plusieurs résultats en ce sens. Concernant l'analyse pronostique, nous avons comparé les profils métaboliques des patients classés dans les groupes favorable et défavorable selon les

recommandations de l'ELN de 2017. Une nette séparation entre les profils de ces deux groupes révèle plusieurs métabolites impliqués, et notamment le 2-HG, retrouvé surexprimé dans le groupe de pronostic favorable. Il est important de souligner le fait que l'augmentation du 2-HG est tout à fait reliée au pronostic favorable, du fait que 6 patients sur 16 sont mutés *IDH* dans ce groupe, alors que seulement 1 patient sur 14 est muté dans le groupe défavorable. De plus, cette information est corroborée par le fait que l'on retrouve également une surexpression du 2-HG chez les patients porteurs de la mutation *NPM1*, considérée comme de bon pronostic. Ces résultats suggèrent que le 2-HG pourrait impacter certaines voies de régulation de la prolifération des cellules leucémiques ou favoriser certains mécanismes anti-tumoraux. Une étude récente par RMN HRMAS, menée sur des patients atteints d'un type de gliome particulier (oligodendrogliome), révèle plusieurs marqueurs métaboliques prédictifs de la survie, dont le 2-HG, qui est un facteur de bon pronostic chez les patients. En effet, le 2-HG sensibiliserait les cellules tumorales à la chimiothérapie¹¹¹.

4. L'association des mutations *IDH* et *NPM1* confère un meilleur pronostic aux patients atteints de LAM *de novo*

Nous observons une meilleure survie chez les patients porteurs des mutations *IDH* et *NPM1*, par rapport aux patients mutés pour *NPM1* seulement. Nous sommes en contradiction avec d'autres études que l'on peut trouver dans la littérature concernant le fait que la mutation *IDH* confère un pronostic plutôt favorable aux patients qui en sont porteurs, surtout quand elle est associée à la mutation *NPM1*. Cependant, quelques résultats sont à approfondir concernant l'interprétation des données

retrouvées dans la littérature. En effet, sur une cohorte de 1414 patients, Schnittger *et al* montrent une diminution de la survie globale (OS) et de la survie sans évènement (EFS) chez les patients *IDH1* muté vs *IDH* wild-typ. Cependant, ce n'est plus vrai lorsqu'ils comparent les patients *NPM1+IDH-* avec les patients *NPM1+IDH+*, où aucune différence significative concernant la survie n'est retrouvée lorsque les patients présentent également la mutation *NPM1* ($p = 0.235$)¹¹². De la même façon, l'équipe de Yamaguchi montre une diminution de l'OS à 5 ans uniquement si le patient est porteur de la mutation *IDH*, et ayant un statut wild-type pour *NPM1*¹¹³. A l'inverse, Paschka *et al* retrouvent une diminution de l'OS et de l'EFS chez les patients mutés *IDH*, mais seulement chez les patients à caryotype normal et en présence de la mutation de *NPM1*, associée à l'absence de mutation *FLT3-ITD*¹¹⁴. Toutes ces études montrent qu'il existe alors plusieurs façons d'interpréter les données concernant l'impact de la mutation *IDH* sur le pronostic dans les LAM, et nous ne pouvons donc pas conclure à une réelle tendance pronostique pour cette mutation d'après les données de la littérature qui sont très controversées.

5. Les dérégulations du métabolisme phospholipidique ont un réel impact négatif sur le pronostic, la survie et la réponse au traitement

5.1. Les phospholipides en lien avec la mutation *IDH*

Nos différentes analyses des profils métaboliques révèlent une surexpression redondante de la phosphocholine associée à la phosphoéthanolamine dans plusieurs groupes de patients. En effet, on retrouve l'augmentation de ces deux métabolites

dans le groupe de pronostic défavorable, ainsi que chez les patients non porteurs de la mutation *IDH*. *A contrario*, le 2-HG est surexprimé chez les patients de pronostic favorable et bien évidemment chez les patients porteurs de la mutation *IDH*. Très récemment, l'équipe de Viswanath a montré que la synthèse *de novo* de PC et PE, ainsi que l'activité enzymatique des CK et EK (Ethanolamine Kinase) étaient considérablement diminuées chez les patients atteints de gliomes *IDH* mutés vs *IDH* wild-type. Ils ont notamment établi un lien entre cette régulation négative et le 2-HG, qui serait responsable de ces phénomènes *via* la stabilisation de HIF-1 α ¹¹⁵. Ceci est en complète corrélation avec ce que nous observons dans notre cohorte de patients, à savoir la diminution de l'expression de ces métabolites chez les patients porteurs de la mutation *IDH* vs les patients non mutés.

5.2. Les phospholipides sont responsables de la progression tumorale et de l'agressivité de la leucémie

D'autre part, ces deux métabolites sont largement décrits comme étant des marqueurs d'agressivité et de progression tumorale dans les cancers. Toujours au niveau neurologique, deux études ont montré que des patients ayant un gliome de bas grade ayant progressé en gliome de haut grade présentaient des niveaux beaucoup plus élevés de PC et PE^{116,117}. Une autre équipe a également détecté des taux élevés de ces métabolites dans des tissus de cancer du sein par rapport à des tissus sains. Ces précurseurs des phospholipides seraient donc des indicateurs biochimiques de la progression tumorale¹¹⁸.

On sait également que la surexpression des CK dans les cancers conduit à une élévation des niveaux de PC. Les cellules acquièrent un phénotype agressif, qui supporte le rôle des CK dans le contrôle de l'invasion cellulaire et de la résistance aux thérapies. Ceci fait de la PC un biomarqueur de l'agressivité des cancers¹¹⁹. De plus, dans notre étude, la PE est surexprimée chez les patients *FLT3*-ITD mutés, chez les patients décédés, ainsi que chez les patients chimiorésistants au traitement. Ceci est cohérent avec le fait que ce métabolite a un réel impact défavorable sur la survie globale. A l'inverse, le 2-HG est surexprimé chez les patients vivants et chimiosensibles, nous confortant encore une fois sur le fait que la mutation *IDH* a un impact plutôt favorable dans les LAM.

6. La surexpression du GSH au diagnostic de LAM est un désavantage considérable dans l'évolution de la pathologie

Les cellules leucémiques ont un métabolisme du glutathion aberrant. En effet, un équilibre redox altéré est fréquemment décrit dans les cancers, et en particulier dans les LAM⁸¹. Nous avons retrouvé une augmentation du GSH chez les patients associés à un pronostic défavorable au diagnostic. Dans les cellules cancéreuses, l'augmentation des niveaux de ce métabolite est associée à une réponse fortement proliférative, et ceci est essentiel pour la progression du cycle cellulaire⁵⁹. Cette augmentation de GSH peut être corrélée aux patients qui rechutent, et les patients classés dans le groupe défavorable sont plus à risque de rechute que les autres, de par leur caryotype complexe et les mutations associées¹²⁰. Nous avons également trouvé une surexpression du GSH chez les patients chimiorésistants au traitement. L'augmentation du GSH est un facteur majeur contribuant la résistance aux drogues

via différents mécanismes. Le GSH peut se lier ou réagir avec les molécules médicamenteuses, il peut interagir avec les ROS, et il permet d'éviter les dommages à l'ADN en participant à la réparation de celui-ci⁵⁹. De plus, une expression élevée de Glutathione-S-Transferase combinée à des niveaux de GSH élevés peut augmenter le taux de conjugaison et de détoxification des agents de chimiothérapie, réduisant considérablement leur efficacité¹²¹. En outre, il a été démontré que le GSH est un marqueur d'agressivité¹²² et que des niveaux élevés de GSH offrent une protection contre l'apoptose induite par le stress¹²³.

7. L'alanine : un marqueur de mauvais pronostic dans les LAM

Le lien entre alanine et cancer est très peu décrit dans la littérature, et une seule étude à notre connaissance montre des résultats concernant la surexpression d'alanine chez les patients atteints de SMD (Syndrome myélodysplasique) ou de LAM¹²⁴. Nous retrouvons une augmentation de l'alanine chez les patients chimiorésistants au traitement, et également chez les patients mutés pour *FLT3*-ITD et wild-type pour la mutation *IDH*. D'après nos précédentes conclusions, l'alanine aurait donc un impact négatif dans les LAM. Cette découverte va dans le sens des quelques études publiées concernant l'alanine dans les cancers. En effet, Tessem *et al* décrivent une augmentation de l'alanine dans des biopsies de cancer de prostate analysées par HRMAS¹²⁵, d'autres montrent une surexpression de l'alanine dans les méningiomes¹²⁶ ou encore dans les cancers qui évoluent de façon dramatique et qui se disséminent dans les méninges¹²⁷. Enfin, d'autres décrivent un effet prolifératif causé par l'augmentation d'alanine dans les cancers du sein¹²⁸.

Pour aller plus loin, une étude de l'activité enzymatique de *LKB1* chez les patients chimiosensibles et chimiorésistants pourrait nous permettre d'élucider certains mécanismes. Plus précisément, la délétion de *LKB1* suggère une régulation positive de l'expression de l'alanine, augmentant ainsi son niveau intracellulaire. Cette enzyme est régulée par la voie des MAPK. L'étude en parallèle de la phosphorylation de MAPK nous permettra de corrélérer les niveaux d'alanine intracellulaire avec l'activité de *LKB1* (MAPK est phosphorylée si *LKB1* est activée). Cette partie expérimentale est actuellement en cours de réalisation sur des lignées cellulaires leucémiques (K562 et KG1), dont une présente un fort taux d'alanine (K562) contrairement à l'autre qui n'en n'exprime quasiment pas (KG1).

Conclusion

THÈSE SOUTENUE PAR : Caroline LO PRESTI

TITRE :

REPROGRAMMATION METABOLIQUE DANS LES LEUCEMIES AIGUES MYELOIDES DE NOVO DE L'ADULTE : IMPACT CLINIQUE.

CONCLUSION :

Les leucémies aigues myéloïdes sont un ensemble de proliférations malignes conduisant à l'accumulation dans la moelle osseuse, le sang périphérique, et potentiellement d'autres organes, de progéniteurs myéloïdes immatures dérivés des cellules sanguines, qui ont partiellement ou complètement perdu leur capacité de différenciation. Outre les anomalies chromosomiques, il existe de nombreuses altérations génétiques, entraînant des dérégulations fonctionnelles favorisant la prolifération leucémique.

Il est connu que le métabolisme des cellules cancéreuses est fortement perturbé par rapport aux cellules saines. Ceci est largement décrit par l'effet Warburg, ainsi que pour de nombreuses voies métaboliques dérégulées telles que la glutaminolyse, le métabolisme des lipides ou encore le métabolisme des acides aminés. De façon similaire, le métabolisme des cellules leucémiques est un processus dynamique qui s'adapte au besoin des blastes et qui participent à l'initiation et à la progression des LAM. Notre étude avait pour objectif de caractériser ces dérégulation du métabolisme des progéniteurs leucémiques afin de mieux comprendre leur implication dans la leucémogénèse et leur impact clinico-biologique.

Nous avons tout d'abord montré qu'il existait des différences significatives de profils métaboliques entre les patients selon leur sous-type cytologique et selon leur génotype. En particulier, la sécrétion de 2-HG intracellulaire est fortement corrélée à la présence de la mutation *IDH*. D'autre part, nos travaux montrent que le pronostic des patients est fortement impacté par plusieurs métabolites. Nous avons montré que la production de 2-HG intracellulaire est fortement corrélée au pronostic global ; les patients présentant les valeurs les plus élevées de 2-HG ayant un meilleur pronostic. Ces patients étant tous mutés pour *IDH*, nos travaux sont en faveur de la valeur pronostique favorable de la mutation, qui probablement implique l'impact du 2-HG sur les mécanismes de contrôle de la prolifération des cellules leucémiques. A l'inverse, l'étude du métabolisme phospholipidique montre que la phosphocholine et la phosphoéthanolamine sont des marqueurs de progression tumorale et d'agressivité. De plus, l'augmentation du glutathion au diagnostic prédit une survie défavorable et une chimiorésistance au traitement, de même que la surexpression d'alanine.

Au total, cette étude a démontré la faisabilité d'une approche métabolomique basée sur la RMN HRMAS appliquée aux patients atteints de LAM. Cette approche nous a fourni des informations pertinentes sur les profils métaboliques des progéniteurs leucémiques. Nous avons également montré l'utilité de cette approche pour stratifier les groupes pronostiques, et corrélérer les données au statut moléculaire des patients (*IDH*, *NPM1*, *FLT3-ITD*). Pour conclure, il apparaît que certains métabolites pourraient représenter des biomarqueurs pronostiques utiles pour la décision thérapeutique, ainsi que des cibles pour des traitements visant directement les voies métaboliques impliquées dans le développement des LAM.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le : 09/09/2019

LE DOYEN

Pour
et pour
Pour
Le D
Michel SEVE

LE DIRECTEUR DE THESE :

CHU de GRENOBLE
Pôle de Biologie et de Pathologie
UF Hématologie Cellulaire
Pr Pascal MOSSUZ

LE TUTEUR UNIVERSITAIRE :

CHU de GRENOBLE
Pôle de Biologie et de Pathologie
UF Hématologie Cellulaire
Pr Pascal MOSSUZ

Références

1. Kayser, S. & Levis, M. J. Advances in targeted therapy for acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology* **180**, 484–500 (2018).
2. Defossez, G. *et al.* Synthèse - Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018 - Ref: SYNINC NAT19. Available at: <https://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Synthese-Estimations-nationales-de-l-incidence-et-de-la-mortalite-par-cancer-en-France-metropolitaine-entre-1990-et-2018>. (Accessed: 17th August 2019)
3. Schiffer, C. A. & Stone, R. M. Morphologic Classification and Clinical and Laboratory Correlates. *Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition* (2003).
4. Paessler, M. E., Helfrich, M. & Wertheim, G. B. W. Cytochemical Staining. in *Acute Myeloid Leukemia* (eds. Fortina, P., Londin, E., Park, J. Y. & Kricka, L. J.) **1633**, 19–32 (Springer New York, 2017).
5. Cruise, M. W. Immunohistochemistry in Acute Myeloid Leukemia. in *Acute Myeloid Leukemia* (eds. Fortina, P., Londin, E., Park, J. Y. & Kricka, L. J.) **1633**, 33–49 (Springer New York, 2017).
6. Arber, D. A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **127**, 2391–2405 (2016).
7. Prada-Arismendy, J., Arroyave, J. C. & Röthlisberger, S. Molecular biomarkers in acute myeloid leukemia. *Blood Reviews* **31**, 63–76 (2017).
8. Kwaan, H. C., Wang, J. & Boggio, L. N. Abnormalities in hemostasis in acute promyelocytic leukemia. *Hematological Oncology* **20**, 33–41 (2002).

9. De Kouchkovsky, I. & Abdul-Hay, M. 'Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update'. *Blood Cancer Journal* **6**, e441–e441 (2016).
10. The Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine* **368**, 2059–2074 (2013).
11. Döhner, H., Weisdorf, D. J. & Bloomfield, C. D. Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine* **373**, 1136–1152 (2015).
12. Castelli, G., Pelosi, E. & Testa, U. Emerging Therapies for Acute Myelogenous Leukemia Patients Targeting Apoptosis and Mitochondrial Metabolism. *Cancers* **11**, 260 (2019).
13. Dohner, H. *et al.* Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* **115**, 453–474 (2010).
14. Grimwade, D., Ivey, A. & Huntly, B. J. P. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood* **127**, 29–41 (2016).
15. Döhner, H. *et al.* Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* **129**, 424–447 (2017).
16. Patel, J. P. *et al.* Prognostic Relevance of Integrated Genetic Profiling in Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine* **366**, 1079–1089 (2012).
17. Dohner, K. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood* **106**, 3740–3746 (2005).

18. Estey, E. H. Acute myeloid leukemia: 2014 Update on risk-stratification and management: AML: 2014 Update on Risk-Stratification and Management. *American Journal of Hematology* **89**, 1063–1081 (2014).
19. Gratwohl, A. *et al.* One million haemopoietic stem-cell transplants: a retrospective observational study. *The Lancet Haematology* **2**, e91–e100 (2015).
20. Kassim, A. A. & Savani, B. N. Hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia: A review. *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy* **10**, 245–251 (2017).
21. de Thé, H., Le Bras, M. & Lallemand-Breitenbach, V. Acute promyelocytic leukemia, arsenic, and PML bodies. *The Journal of Cell Biology* **198**, 11–21 (2012).
22. Stock, W. Current treatment options for adult patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia & Lymphoma* **51**, 188–198 (2010).
23. Sanz, M. A. & Lo-Coco, F. Modern Approaches to Treating Acute Promyelocytic Leukemia. *Journal of Clinical Oncology* **29**, 495–503 (2011).
24. Stone, R. M. *et al.* Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a *FLT3* Mutation. *New England Journal of Medicine* **377**, 454–464 (2017).
25. Röllig, C. *et al.* Addition of sorafenib versus placebo to standard therapy in patients aged 60 years or younger with newly diagnosed acute myeloid leukaemia (SORAML): a multicentre, phase 2, randomised controlled trial. *The Lancet Oncology* **16**, 1691–1699 (2015).
26. Wang, E. S. *et al.* Low Relapse Rate in Younger Patients $\leq$ 60 Years Old with Newly Diagnosed *FLT3*-Mutated Acute Myeloid Leukemia (AML) Treated with

Crenolanib and Cytarabine/Anthracycline Chemotherapy. *Blood* **130**, 566–566 (2017).

27. Cortes, J. *et al.* Quizartinib, an FLT3 inhibitor, as monotherapy in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukaemia: an open-label, multicentre, single-arm, phase 2 trial. *The Lancet Oncology* **19**, 889–903 (2018).

28. Stein, E. M. *et al.* Enasidenib in mutant *IDH2* relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood* **130**, 722–731 (2017).

29. Davis, J. R., Benjamin, D. J. & Jonas, B. A. New and emerging therapies for acute myeloid leukaemia. *Journal of Investigative Medicine* **66**, 1088–1095 (2018).

30. Hills, R. K. *et al.* 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**, 986–996 (2014).

31. Uy, G. L. *et al.* Preliminary Results of a Phase 1 Study of Flotetuzumab, a CD123 x CD3 Bispecific Dart® Protein, in Patients with Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndrome. *Blood* **130**, 637–637 (2017).

32. Gill, S. *et al.* Preclinical targeting of human acute myeloid leukemia and myeloablation using chimeric antigen receptor-modified T cells. *Blood* **123**, 2343–2354 (2014).

33. Sill, H., Olipitz, W., Zebisch, A., Schulz, E. & Wölfler, A. Therapy-related myeloid neoplasms: pathobiology and clinical characteristics: Therapy-related myeloid neoplasms. *British Journal of Pharmacology* **162**, 792–805 (2011).

34. Gaidzik, V. & Döhner, K. Prognostic Implications of Gene Mutations in Acute Myeloid Leukemia With Normal Cytogenetics. *Seminars in Oncology* **35**, 346–355 (2008).

35. Steensma, D. P. Clinical consequences of clonal hematopoiesis of indeterminate potential. **2**, 7 (2018).
36. Shlush, L. I. *et al.* Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature* **506**, 328–333 (2014).
37. Corces-Zimmerman, M. R., Hong, W.-J., Weissman, I. L., Medeiros, B. C. & Majeti, R. Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 2548–2553 (2014).
38. Thomas, D. & Majeti, R. Biology and relevance of human acute myeloid leukemia stem cells. *Blood* **129**, 1577–1585 (2017).
39. Sánchez-Aguilera, A. & Méndez-Ferrer, S. The hematopoietic stem-cell niche in health and leukemia. *Cellular and Molecular Life Sciences* **74**, 579–590 (2017).
40. Chan, W.-I. & Huntly, B. J. P. Leukemia Stem Cells in Acute Myeloid Leukemia. *Seminars in Oncology* **35**, 326–335 (2008).
41. Figueroa, M. E. *et al.* Leukemic IDH1 and IDH2 Mutations Result in a Hypermethylation Phenotype, Disrupt TET2 Function, and Impair Hematopoietic Differentiation. *Cancer Cell* **18**, 553–567 (2010).
42. DeBerardinis, R. J. & Chandel, N. S. Fundamentals of cancer metabolism. *Science Advances* **2**, e1600200 (2016).
43. Counihan, J. L., Grossman, E. A. & Nomura, D. K. Cancer Metabolism: Current Understanding and Therapies. *Chemical Reviews* **118**, 6893–6923 (2018).
44. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* **324**, 1029–1033 (2009).

45. Bose, S. & Le, A. Glucose Metabolism in Cancer. in *The Heterogeneity of Cancer Metabolism* (ed. Le, A.) **1063**, 3–12 (Springer International Publishing, 2018).
46. Liberti, M. V. & Locasale, J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences* **41**, 211–218 (2016).
47. Wilson, W. R. & Hay, M. P. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* **11**, 393–410 (2011).
48. Dong, W., Keibler, M. A. & Stephanopoulos, G. Review of metabolic pathways activated in cancer cells as determined through isotopic labeling and network analysis. *Metabolic Engineering* **43**, 113–124 (2017).
49. Icard, P. & Lincet, H. A global view of the biochemical pathways involved in the regulation of the metabolism of cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **1826**, 423–433 (2012).
50. Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., Bougioukas, G. & Sivridis, E. Lung cancer: An organized cellular and metabolic domain. *Cancer Biology & Therapy* **6**, 1472–1475 (2007).
51. Anderson, N. M., Mucka, P., Kern, J. G. & Feng, H. The emerging role and targetability of the TCA cycle in cancer metabolism. *Protein & Cell* **9**, 216–237 (2018).
52. Rampal, R. & Figueroa, M. E. Wilms tumor 1 mutations in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Haematologica* **101**, 672–679 (2016).
53. Montalban-Bravo, G. & DiNardo, C. D. The role of *IDH* mutations in acute myeloid leukemia. *Future Oncology* **14**, 979–993 (2018).
54. Lu, C. *et al.* IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature* **483**, 474–478 (2012).

55. Dang, C. V. Glutaminolysis: Supplying carbon or nitrogen or both for cancer cells? *Cell Cycle* **9**, 3884–3886 (2010).
56. Gao, P. *et al.* c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature* **458**, 762–765 (2009).
57. Jin, L., Alesi, G. N. & Kang, S. Glutaminolysis as a target for cancer therapy. *Oncogene* **35**, 3619–3625 (2016).
58. Michalak, K. P., Maćkowska-Kędziora, A., Sobolewski, B. & Woźniak, P. Key Roles of Glutamine Pathways in Reprogramming the Cancer Metabolism. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2015**, 1–14 (2015).
59. Traverso, N. *et al.* Role of Glutathione in Cancer Progression and Chemoresistance. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2013**, 1–10 (2013).
60. Park, J. K., Coffey, N. J., Limoges, A. & Le, A. The Heterogeneity of Lipid Metabolism in Cancer. in *The Heterogeneity of Cancer Metabolism* (ed. Le, A.) **1063**, 33–55 (Springer International Publishing, 2018).
61. Menendez, J. A. & Lupu, R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 763–777 (2007).
62. Carracedo, A., Cantley, L. C. & Pandolfi, P. P. Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight. *Nature Reviews Cancer* **13**, 227–232 (2013).
63. Wang, J. *et al.* Low expression of ACLY associates with favorable prognosis in acute myeloid leukemia. *Journal of Translational Medicine* **17**, (2019).
64. Louie, S. M., Roberts, L. S., Mulvihill, M. M., Luo, K. & Nomura, D. K. Cancer cells incorporate and remodel exogenous palmitate into structural and oncogenic signaling lipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1831**, 1566–1572 (2013).

65. Currie, E., Schulze, A., Zechner, R., Walther, T. C. & Farese, R. V. Cellular Fatty Acid Metabolism and Cancer. *Cell Metabolism* **18**, 153–161 (2013).
66. Ramírez de Molina, A. *et al.* Choline kinase as a link connecting phospholipid metabolism and cell cycle regulation: Implications in cancer therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **40**, 1753–1763 (2008).
67. Bagnoli, M. *et al.* Choline Metabolism Alteration: A Focus on Ovarian Cancer. *Frontiers in Oncology* **6**, (2016).
68. Ridgway, N. D. The role of phosphatidylcholine and choline metabolites to cell proliferation and survival. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **48**, 20–38 (2013).
69. Gibellini, F. & Smith, T. K. The Kennedy pathway-De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life* n/a-n/a (2010). doi:10.1002/iub.337
70. Kamata, H. & Hirata, H. Redox Regulation of Cellular Signalling. *Cellular Signalling* **11**, 1–14 (1999).
71. Yahata, T. *et al.* Accumulation of oxidative DNA damage restricts the self-renewal capacity of human hematopoietic stem cells. *Blood* **118**, 2941–2950 (2011).
72. Piccoli, C. *et al.* Bone-marrow derived hematopoietic stem/progenitor cells express multiple isoforms of NADPH oxidase and produce constitutively reactive oxygen species. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **353**, 965–972 (2007).
73. Tothova, Z. & Gilliland, D. G. FoxO Transcription Factors and Stem Cell Homeostasis: Insights from the Hematopoietic System. *Cell Stem Cell* **1**, 140–152 (2007).

74. Hole, P. S. *et al.* Overproduction of NOX-derived ROS in AML promotes proliferation and is associated with defective oxidative stress signaling. *Blood* **122**, 3322–3330 (2013).
75. Zhou, F., Shen, Q. & Claret, F. X. Novel roles of reactive oxygen species in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Journal of Leukocyte Biology* **94**, 423–429 (2013).
76. Xu, Q. Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation. *Blood* **102**, 972–980 (2003).
77. Zeng, Z. *et al.* Simultaneous Inhibition of PDK1/AKT and Fms-Like Tyrosine Kinase 3 Signaling by a Small-Molecule KP372-1 Induces Mitochondrial Dysfunction and Apoptosis in Acute Myelogenous Leukemia. *Cancer Research* **66**, 3737–3746 (2006).
78. Sallmyr, A. *et al.* Internal tandem duplication of FLT3 (FLT3/ITD) induces increased ROS production, DNA damage, and misrepair: implications for poor prognosis in AML. *Blood* **111**, 3173–3182 (2008).
79. Farge, T. *et al.* Chemotherapy-Resistant Human Acute Myeloid Leukemia Cells Are Not Enriched for Leukemic Stem Cells but Require Oxidative Metabolism. *Cancer Discovery* **7**, 716–735 (2017).
80. Marlein, C. R. *et al.* NADPH oxidase-2 derived superoxide drives mitochondrial transfer from bone marrow stromal cells to leukemic blasts. *Blood* blood-2017-03-772939 (2017). doi:10.1182/blood-2017-03-772939
81. Mondet, J. *et al.* De novo adult acute myeloid leukemia patients display at diagnosis functional deregulation of redox balance correlated with molecular subtypes and overall survival. *Haematologica* haematol.2018.206821 (2019). doi:10.3324/haematol.2018.206821

82. Ferret, Y. *et al.* Clinical relevance of *IDH1/2* mutant allele burden during follow-up in acute myeloid leukemia. A study by the French ALFA group. *Haematologica* **103**, 822–829 (2018).
83. Dang, L. *et al.* Cancer-associated *IDH1* mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* **462**, 739–744 (2009).
84. Abdel-Wahab, O. & Levine, R. L. Metabolism and the leukemic stem cell: Figure 1. *The Journal of Experimental Medicine* **207**, 677–680 (2010).
85. Kreitz *et al.* Metabolic Plasticity of Acute Myeloid Leukemia. *Cells* **8**, 805 (2019).
86. Ward, P. S. *et al.* The Common Feature of Leukemia-Associated *IDH1* and *IDH2* Mutations Is a Neomorphic Enzyme Activity Converting α -Ketoglutarate to 2-Hydroxyglutarate. *Cancer Cell* **17**, 225–234 (2010).
87. Gross, S. *et al.* Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations. *The Journal of Experimental Medicine* **207**, 339–344 (2010).
88. Mossmann, D., Park, S. & Hall, M. N. mTOR signalling and cellular metabolism are mutual determinants in cancer. *Nature Reviews Cancer* **18**, 744–757 (2018).
89. Stuani, L., Sabatier, M. & Sarry, J.-E. Exploiting metabolic vulnerabilities for personalized therapy in acute myeloid leukemia. *BMC Biology* **17**, (2019).
90. Saito, Y., Chapple, R. H., Lin, A., Kitano, A. & Nakada, D. AMPK Protects Leukemia-Initiating Cells in Myeloid Leukemias from Metabolic Stress in the Bone Marrow. *Cell Stem Cell* **17**, 585–596 (2015).
91. Chen, W.-L. *et al.* A distinct glucose metabolism signature of acute myeloid leukemia with prognostic value. *Blood* **124**, 1645–1654 (2014).

92. Jones, C. L. *et al.* Inhibition of Amino Acid Metabolism Selectively Targets Human Leukemia Stem Cells. *Cancer Cell* **34**, 724-740.e4 (2018).
93. Jacque, N. *et al.* Targeting glutaminolysis has antileukemic activity in acute myeloid leukemia and synergizes with BCL-2 inhibition. *Blood* **126**, 1346–1356 (2015).
94. Gallipoli, P. *et al.* Glutaminolysis is a metabolic dependency in FLT3^{ITD} acute myeloid leukemia unmasked by FLT3 tyrosine kinase inhibition. *Blood* **131**, 1639–1653 (2018).
95. Willems, L. *et al.* Inhibiting glutamine uptake represents an attractive new strategy for treating acute myeloid leukemia. *Blood* **122**, 3521–3532 (2013).
96. Shi, J. *et al.* High Expression of CPT1A Predicts Adverse Outcomes: A Potential Therapeutic Target for Acute Myeloid Leukemia. *EBioMedicine* **14**, 55–64 (2016).
97. German, N. J. *et al.* PHD3 Loss in Cancer Enables Metabolic Reliance on Fatty Acid Oxidation via Deactivation of ACC2. *Molecular Cell* **63**, 1006–1020 (2016).
98. Pabst, T. *et al.* The plasma lipidome in acute myeloid leukemia at diagnosis in relation to clinical disease features. *BBA Clinical* **7**, 105–114 (2017).
99. Wang, Y. *et al.* Rapid Diagnosis and Prognosis of *de novo* Acute Myeloid Leukemia by Serum Metabonomic Analysis. *Journal of Proteome Research* **12**, 4393–4401 (2013).
100. Markley, J. L. *et al.* The future of NMR-based metabolomics. *Current Opinion in Biotechnology* **43**, 34–40 (2017).
101. Zhang, A., Sun, H., Xu, H., Qiu, S. & Wang, X. Cell Metabolomics. *OMICS: A Journal of Integrative Biology* **17**, 495–501 (2013).

102. Hollywood, K., Brison, D. R. & Goodacre, R. Metabolomics: Current technologies and future trends. *PROTEOMICS* **6**, 4716–4723 (2006).
103. Wishart, D. S. Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine. *Nature Reviews Drug Discovery* **15**, 473–484 (2016).
104. Beckonert, O. *et al.* High-resolution magic-angle-spinning NMR spectroscopy for metabolic profiling of intact tissues. *Nature Protocols* **5**, 1019–1032 (2010).
105. Mlynárik, V. Introduction to nuclear magnetic resonance. *Analytical Biochemistry* **529**, 4–9 (2017).
106. Nagana Gowda, G. A. & Raftery, D. Can NMR solve some significant challenges in metabolomics? *Journal of Magnetic Resonance* **260**, 144–160 (2015).
107. DiNardo, C. D. *et al.* Serum 2-hydroxyglutarate levels predict isocitrate dehydrogenase mutations and clinical outcome in acute myeloid leukemia. *Blood* **121**, 4917–4924 (2013).
108. Janin, M. *et al.* Serum 2-Hydroxyglutarate Production in *IDH1* - and *IDH2* - Mutated De Novo Acute Myeloid Leukemia: A Study by the Acute Leukemia French Association Group. *Journal of Clinical Oncology* **32**, 297–305 (2014).
109. Lagunas-Rangel, F. A. & Chávez-Valencia, V. FLT3–ITD and its current role in acute myeloid leukaemia. *Medical Oncology* **34**, (2017).
110. Heath, E. M. *et al.* Biological and clinical consequences of NPM1 mutations in AML. *Leukemia* **31**, 798–807 (2017).
111. Bund, C. *et al.* An integrated genomic and metabolomic approach for defining survival time in adult oligodendrogliomas patients. *Metabolomics* **15**, (2019).
112. Schnittger, S. *et al.* IDH1 mutations are detected in 6.6% of 1414 AML patients and are associated with intermediate risk karyotype and unfavorable prognosis in

adults younger than 60 years and unmutated NPM1 status. *Blood* **116**, 5486–5496 (2010).

113. Yamaguchi, S. *et al.* *IDH1* and *IDH2* mutations confer an adverse effect in patients with acute myeloid leukemia lacking the *NPM1* mutation. *European Journal of Haematology* **92**, 471–477 (2014).

114. Paschka, P. *et al.* *IDH1* and *IDH2* Mutations Are Frequent Genetic Alterations in Acute Myeloid Leukemia and Confer Adverse Prognosis in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia With *NPM1* Mutation Without *FLT3* Internal Tandem Duplication. *Journal of Clinical Oncology* **28**, 3636–3643 (2010).

115. Viswanath, P. *et al.* Mutant IDH1 gliomas downregulate phosphocholine and phosphoethanolamine synthesis in a 2-hydroxyglutarate-dependent manner. *Cancer & Metabolism* **6**, (2018).

116. Elkhalel, A. *et al.* Characterization of metabolites in infiltrating gliomas using *ex vivo* ^1H high-resolution magic angle spinning spectroscopy: CHARACTERIZATION OF METABOLITES IN INFILTRATING GLIOMAS. *NMR in Biomedicine* **27**, 578–593 (2014).

117. Jalbert, L. E. *et al.* Metabolic Profiling of IDH Mutation and Malignant Progression in Infiltrating Glioma. *Scientific Reports* **7**, (2017).

118. Ackerstaff, E., Glunde, K. & Bhujwalla, Z. M. Choline phospholipid metabolism: A target in cancer cells? *Journal of Cellular Biochemistry* **90**, 525–533 (2003).

119. Shah, T. *et al.* Choline kinase overexpression increases invasiveness and drug resistance of human breast cancer cells. *NMR in Biomedicine* **23**, 633–642 (2010).

120. Bansal, A. & Simon, M. C. Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance. *The Journal of Cell Biology* **217**, 2291–2298 (2018).

121. Yang, P., Ebbert, J. O., Sun, Z. & Weinshilboum, R. M. Role of the Glutathione Metabolic Pathway in Lung Cancer Treatment and Prognosis: A Review. *Journal of Clinical Oncology* **24**, 1761–1769 (2006).
122. Lash, L., Putt, D. & Jankovich, A. Glutathione Levels and Susceptibility to Chemically Induced Injury in Two Human Prostate Cancer Cell Lines. *Molecules* **20**, 10399–10414 (2015).
123. Circu, M. L. & Yee Aw, T. Glutathione and apoptosis. *Free Radical Research* **42**, 689–706 (2008).
124. Cano, K. E. *et al.* NMR-Based Metabolomic Analysis of the Molecular Pathogenesis of Therapy-Related Myelodysplasia/Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Proteome Research* **10**, 2873–2881 (2011).
125. Tessem, M.-B. *et al.* Evaluation of lactate and alanine as metabolic biomarkers of prostate cancer using ^1H HR-MAS spectroscopy of biopsy tissues. *Magnetic Resonance in Medicine* **60**, 510–516 (2008).
126. Howe, F. A. *et al.* Metabolic profiles of human brain tumors using quantitative in vivo ^1H magnetic resonance spectroscopy. *Magnetic Resonance in Medicine* **49**, 223–232 (2003).
127. An, Y. J. *et al.* An NMR metabolomics approach for the diagnosis of leptomeningeal carcinomatosis in lung adenocarcinoma cancer patients: NMR metabolomics approach. *International Journal of Cancer* **136**, 162–171 (2015).
128. Gu, Y. *et al.* Perioperative dynamics and significance of amino acid profiles in patients with cancer. *Journal of Translational Medicine* **13**, 35 (2015).



Serment de Galien



« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».

Caroline LO PRESTI

REPROGRAMMATION METABOLIQUE DANS LES LEUCEMIES AIGUES MYELOÏDES *DE NOVO* DE L'ADULTE : IMPACT CLINIQUE.

RÉSUMÉ :

Les leucémies aigues myéloïdes (LAM) sont un ensemble de proliférations malignes, caractérisées par l'accumulation de progéniteurs immatures dans la moelle osseuse et dans le sang périphérique. Leur pronostic est très péjoratif, et ceci est dû à la présence d'anomalies chromosomiques et moléculaires au diagnostic, mais aussi aux dérégulations métaboliques favorisant la prolifération des cellules leucémiques. Dans ce contexte, nous avons inclus 50 patients atteints de LAM *de novo* au diagnostic, et analysé leurs profils métaboliques par RMN HRMAS, technique innovante et robuste utilisée pour l'étude des profils métaboliques des cellules cancéreuses. Dans une approche de métabolomique, nous avons utilisé des méthodes statistiques puissantes pour trouver des métabolites caractéristiques d'un état donné. Grâce à cette étude, nous avons montré qu'il existait une diversité de profils métaboliques selon les sous-types cytologiques de LAM et selon le statut moléculaire des patients. De plus, le pronostic des patients était fortement impacté par plusieurs métabolites. En particulier, le 2-hydroxyglutarate (2-HG), oncométabolite produit par la mutation de l'isocitrate déshydrogénase (*IDH*) apparaît comme étant de pronostic favorable dans notre cohorte de patients. Le lien entre le métabolisme et le statut moléculaire des patients est très fort concernant ce métabolite, car sa production intracellulaire est directement liée à la présence ou non de la mutation *IDH*. A l'inverse, les dérégulations du métabolisme phospholipidique ont un impact négatif, *via* deux de ses métabolites principaux (phosphocholine et phosphoéthanolamine) qui peuvent être considérés comme des marqueurs de progression tumorale et d'agressivité. De plus, nous avons pu mettre en évidence une surexpression de glutathion et d'alanine chez certains patients chimiorésistants au traitement. Pour conclure, cette approche nous a permis de mieux caractériser les altérations métaboliques des patients atteints de LAM selon leur statut moléculaire, et d'établir une liste de biomarqueurs métaboliques pronostiques qui pourraient être utiles lors de la prise de décision thérapeutique au diagnostic de LAM.

MOTS CLÉS : leucémie aigüe myéloïde, RMN HRMAS, métabolomique, voies métaboliques, biomarqueurs pronostiques

FILIÈRE : Internat – Innovation Pharmaceutique et Recherche